

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
CHAPINGO



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA

Micropropagación y análisis fitoquímico de cuachalalate

(*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.) de la Mixteca Poblana

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA

Jorge Sevilla Díaz

Chapingo, México, Diciembre de 2007



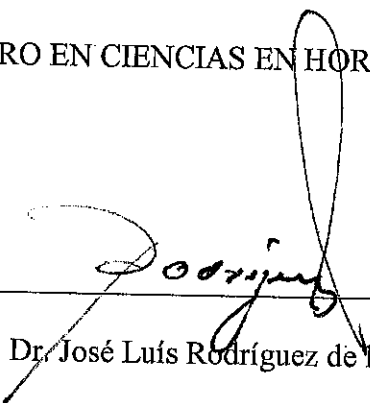
BIBLIOTECA

Micropropagación y análisis fitoquímico de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*
(Schltdl.) Standl.) de la Mixteca Poblana

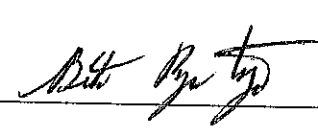
Tesis realizada por Jorge Sevilla Díaz bajo la dirección del comité asesor indicado,
aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Director:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

Asesor:


Dr. Benito Reyes Trejo

Asesor:


Dr. Jaime Sahagún Castellanos

DATOS BIOGRAFICOS.

Nacido en Atlixco, Puebla el autor realizó estudios de primaria en la Escuela primaria Federal “Ignacio Zaragoza”, de secundaria en la Secundaria Federal Número 2 “Doctor Gabino Barrera” y de bachillerato en el Centro de Bachillerato de Estudios Tecnológicos y de Servicios Número 16 en la ciudad de nacimiento

El autor de la presente tesis egreso de la Universidad Autónoma Chapingo en 1999 con el grado de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia.

Laboró como responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Centro de Desarrollo Tecnológico Salvador Lira López de FIRA en Morelia Michoacán del 2000 a 2002.

Ha laborado como docente en la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros Puebla de 2002 a 2004 y durante 2007. Además de dirigir el laboratorio de Biotecnología de la misma universidad por los mismos periodos.

MICROPROPAGACIÓN Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE CUACHALALATE
(*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.) DE LA MIXTECA POBLANA

MICROPROPAGATION AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF
CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.) FROM
MIXTECA POBLANA

Jorge Sevilla Díaz¹, José Luís Rodríguez de la O.²

RESUMEN.

Las respuestas morfogénicas de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.) se evaluaron tanto en ápices, segmentos de hojas y yemas axilares de tallo cultivados *in vitro*. La germinación de semillas fue promovida *in vitro* hasta obtener plantas completas. Nuevos brotes fueron obtenidos de yemas axilares cultivadas en un medio constituido de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 50%, suplementadas con 100 mg·L⁻¹ de myo-inositol, 0.4 mg·L⁻¹ de tiamina-HCl, 3% de sacarosa y 15 mg·L⁻¹ de zeatina. Las combinaciones de BA, ANA y 2,4-D promovieron la formación de callos y raíces a partir de los segmentos de hoja cultivados *in vitro*. Otras respuestas morfogénicas fueron limitadas principalmente por el necrosamiento de tejidos. La presencia de ácido 3 α -hidroximasticadienónico fue determinada en la corteza de los árboles colectados mediante RMN de ¹H

Palabras clave: *Amphipterygium adstringens*, Luz, Posición de Explante, Fitoquímica, Yemas, Semillas, Hojas, Ápices, Auxinas y Citocininas.

SUMMARY.

The morphogenetic responses of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.) were evaluated on shoot tips, segments of leaves and axillary buds of stem cultivated *in vitro*. The germination of seeds was promoted *in vitro* until the plants were fully-grown. New shoots obtained from cultivated axillary buds in a medium constituted of inorganic salts of Murashige and Skoog medium (1962) at 50%, supplemented with 100 mg·L⁻¹ myo-inositol, 0.4 mg·L⁻¹ thiamine-HCl, 3% sucrose and 15 mg·L⁻¹ zeatin. The combination of BA, ANA and 2,4-D promoted the formation of callus and roots from leaf segments cultivated *in vitro*. Other morphogenetic responses were limited because of browning of tissues. The presence of 3 α -hydroxymasticadienonic acid was determined in the bark of all tree collected by ¹H NMR.

Key words: *Amphipterygium adstringens*, Light, Explant position, Phytochemistry, Axillary buds, Seeds, Leaves, Shoot tips, Auxins and Cytokinins.

1 TESISTA
2. DIRECTOR

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. TAXONOMIA DEL CUACHALALATE.....	3
2.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	4
2.3 FITOQUÍMICA.....	6
2.3.1. Fitoquímica del cuachalalate:.....	8
2.4 MICROPROPAGACIÓN.....	10
2.4.1 Medio de cultivo.....	10
2.4.1.1. Sales inorgánicas.....	10
2.4.1.2. Vitaminas.....	12
2.4.1.3. Fuente de carbono.....	12
2.4.1.4. Necrosamiento y el empleo de antioxidantes <i>in vitro</i> :.....	12
2.4.1.5. Reguladores del crecimiento:.....	14
2.4.1.6. Materiales de soporte.....	14
2.5. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES LEÑOSAS.....	15
2.5.1 Ápices:.....	15
2.5.2. Hoja.....	15
2.5.3. Yemas axilares.....	16
2.5.4. Semillas:.....	17
2.6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN <i>IN VITRO</i>	18
2.6.1. La luz.....	18

2.7. FACTORES QUE ALTERAN LA SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE FENOLES	19
2.7.1. Luz.....	19
2.7.2. Nutrición.....	20
2.7.3. Infecciones.....	20
2.8. OXIDACIÓN DE FENOLES.	20
2.9. FENOLES Y LA REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i>	21
2.10. GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 LOCALIZACIÓN	24
3.2	24
3.2.1. Ápices como explantes.	24
3.2.2. Hojas como explantes.....	28
3.2.3. Semillas como explantes.	33
3.2.3.1. Semillas germinadas en condiciones <i>ex vitro</i>	33
3.2.3.2. Semillas germinadas en condiciones <i>in vitro</i>	34
3.2.4. Yemas axilares como explantes.....	38
3.3. FITOQUIMÍA.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1 De experimentos con ápices como explantes.	43
4.1.2 Desinfectación A1.	43
4.1.2 Citocininas A2.	44
4.1.3 Tamaño de ápices A3.	45

4.1.4. Comparación de L-cys vs PVP en ápices A4	47
4.1.5. Coadyuvantes en ápices A5.....	48
4.1.6. PVP en ápices A6.	49
4.1.7. BA vs 2ip en ápices A7.	50
4.1.8. Coadyuvantes 2 en ápices A8.....	51
4.2. De experimentos de hojas como explantes.....	52
4.2.1. Posición del explantes de hojas H1.	52
4.2.2 Posición del explante de hojas H2.....	53
4.2.3 Luz vs oscuridad en hojas H3.....	54
4.2.4 Carbón activado en hojas H4.....	57
4.2.5. Auxinas en hoja H5.	58
4.2.6. Citocininas en hojas H6.....	59
4.3. De Semillas como explantes.....	60
4.3.2. Semillas germinadas en condiciones <i>in vitro</i>	62
4.4. DE YEMAS AXILARES COMO EXPLANTES.....	68
4.5. ANÁLISIS FITOQUÍMICO	71
5. CONCLUSIONES.....	77
6. BIBLIOGRAFIA.....	80
7. ANEXO.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pagina
Cuadro 1.	Composición del medio de cultivo empleado en las evaluaciones de ápices.	25
Cuadro 2.	Modelos experimentales y tratamientos aplicados en las evaluaciones de ápices.	26
Cuadro 3.	Composición de medio de cultivo empleado en las evaluaciones de hoja	29
Cuadro 4.	Diseños experimentales y tratamientos empleados en las evaluaciones de hojas	30
Cuadro 5.	Comportamiento medio de la germinación y.....	64
Cuadro 6.	Comportamiento medio de la germinación y plántulas formadas <i>in vitro</i> por efecto del medio de cultivo en semillas cuachalalate.	65
Cuadro 7.	Comportamiento medio de la contaminación <i>in vitro</i> a los 7 días de la siembra por efecto del preaislamiento de semillas de cuachalalate.	65
Cuadro 8.	Comportamiento de la contaminación <i>in vitro</i> a los 7 días de la siembra por efecto del medio de cultivo en semillas cuachalalate.	66
Cuadro 9.	Comportamiento de germinación y plántulas formadas <i>in vitro</i> a los 7 días de la siembra por efecto del tipo de preaislamiento de semillas de cuachalalate.....	68
Cuadro 10.	Comportamiento de germinación y plántulas formadas <i>in vitro</i> a los 7 días de la siembra por efecto del medio de cultivo en semillas cuachalalate.	68
Cuadro 1A	Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por concentración del $\text{Na}(\text{OCl})_2$	91
Cuadro 2A	Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por el tipo de citocinina.....	91
Cuadro 3A.	Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21), tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por la concentración de citocininas.....	91
Cuadro 4A	Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por tipo de vareta empleada para obtener explantes.....	91
Cuadro 5A.	Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por el tamaño inicial del explante.....	92

Cuadro 6A. Comparaciones de rangos de las variables altura de exudados en el medio (ale7), ancho de exudados (ane7), tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados con dos antioxidantes.....	92
Cuadro 7A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados con 6 compuestos orgánicos.....	92
Cuadro 8A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t14) y necrosis (n14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por dos citocininas	93
Cuadro 9A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t14) y necrosis (n14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por la concentración de citocininas.....	93
Cuadro 10A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t14) y necrosis (n14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por el tipo de antioxidante	93
Cuadro 11A. Comparaciones de rangos de la variable necrosis (n14) de tejido mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por dos posiciones del explante.....	93
Cuadro 12A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y callos formados (cas14) mediante prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por tres posiciones del explante.....	94
Cuadro 13A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14), callos formados (cas14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados con Luz y oscuridad.....	94
Cuadro 14A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14), callos formados (cas14), color de exudados (ce14) y exudados (e14) en el medio de cultivo mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por la concentración de sales en el medio de cultivo.....	94
Cuadro 15A. Comparaciones de rangos de las raíces (r21) formadas mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados con carbón activado y por la concentración de 2,4.D de procedencia del material	95
Cuadro 16A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y peso de callo (p21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por el tipo de auxinas.....	95

Cuadro 17A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y peso de callo (p21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratadas por la concentración de auxinas (tratamiento)-	95
Cuadro 18A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y peso de callo (p21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por el tipo de citocinina	95
Cuadro 19A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21) germinación (g7) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratadas con NaOCl.....	96
Cuadro 20A. Comparaciones de rangos contaminación y germinación de semillas de cuachalalate <i>in vitro</i> , después de 21 días de tratadas con peróxido de hidrógeno.....	96
Cuadro 21A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21) plántulas formadas (plfor) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate expuestas a NaClO y Ca(ClO) ₂	96
Cuadro 22A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7), plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados por el daño causado a las semillas.....	96
Cuadro 23A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7), plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados por la concentración de sales del medio de cultivo (tratamiento).	97
Cuadro 24A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7) y plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados por con la eliminación de de la cubiertas (bloque).....	97
Cuadro 25A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7) y plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados con la concentración de sales en el medio de cultivo	98
Cuadro 26A. Comparaciones de rangos de las variables longitud de yemas (ly21) y porcentaje de yemas brotadas (pyb21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados con zeatina.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencias absolutas de contaminación y necrosis completa en ápices de cuachalalate después de 21 días de siembra	43
Figura 2. Comportamiento medio de la altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate después de 21 días de siembra por el tipo de regulador empleado (A) y la concentración empleada (B)	45
Figura 3. Comportamiento de la altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate después de 21 días de siembra por efecto del tipo de vareta (A), tamaño de explante (B), daño en base de ápice por cortes, afectando al meristemo (C).	46
Figura 4. Comportamiento medio de la altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate a los 21 días de la siembra	47
Figura 5. Comportamiento medio de la expansión de exudados en el medio de cultivo tanto horizontal como perpendicularmente a la superficie del medio de cultivo generados por ápices de cuachalalate a los 7 días de la siembra.....	48
Figura 6. Comportamiento de altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate después de 21 días de la siembra	49
Figura 7. Comportamiento de la altura (t21) y necrosis (n14) en ápices de cuachalalate después de 21 y 14 días de cultivo respectivamente por efecto del tipo de vareta (A), concentración de PVP en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ usada (B) y ápice con control de necrosis con $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de PVP (C).....	50
Figura 8. Comportamiento de la altura (t14) y necrosis (n14) en ápices de cuachalalate después de 14 días de siembra por efecto del regulador (A) y concentración empleada (B).	50
Figura 9. Comportamiento de la altura (t14) y necrosis (n14) en ápices de cuachalalate después de 14 días de siembra por efecto del antioxidante (A) y concentración empleada en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	52
Figura 10. Comportamiento del daño en explantes foliares de cuachalalate por efecto de la posición del explante, 14 días después de la siembra.	53
Figura 11. Comportamiento de necrosis (n14) y formación de callos (cas14) en discos foliares de cuachalalate, 14 días después de la siembra	54
Figura 12. Comportamiento de necrosis (n14), callos formados (cas14) [A,B], exudados en el medio (e14) y color de exudados (ce14) [C,D] por efecto de bloques -luz, oscuridad- [A,C] y concentración de sales MS-0,50 y 100 %- [B,D]	55
Figura 13. Formación de raíces en explantes foliares de cuachalalate inducidos a callo por efecto de tratamiento de inducción -2,4-D en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ -(A) y la aplicación de carbón activado (B), a los 21 días de cultivo	57
Figura 14. Comportamiento del daño y peso fresco de callo en explantes foliares de cuachalalate después de 14 y 21 días de siembra, por efecto del tipo de auxina empleada y la concentración	59

Figura 15. Comportamiento de necrosis (n14) y peso fresco de callo (p21) en explantes foliares de cuachalalate después de 14 y 21 días de siembra, por efecto del tipo de citocinina empleada y la concentración.....	59
Figura 16. Germinación de semillas en frutos de cuachalalate, A) Porcentaje de frutos germinados, B) Plántulas obtenidas de frutos germinados por repetición, C) Dos plántulas por fruto.	60
Figura 17. Calidad de semillas en frutos de cuachalalate.....	61
Figura 18. Plántula formada de semillas sin daño.	64
Figura 19. Efecto de la concentración de medio MS y BA en la brotación y crecimiento de yemas axilares.....	69
Figura 20. Efecto de la concentración de zeatina en la brotación y crecimiento de yemas axilares	70
Figura 21. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 1 de cuachalalate de la mixteca poblana.....	72
Figura 22. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 2 de cuachalalate de la mixteca poblana.....	73
Figura 23. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 3 de cuachalalate de la mixteca poblana.....	74
Figura 24. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 4 de cuachalalate de la mixteca poblana.....	75
Figura 25. Algunas estructuras anatómicas del cuachalalate (<i>Amphipterygium adstrinens</i>) de la Mixteca Poblana son: A) Copa de un árbol, B) Punta de rama de un árbol femenino, C) Hoja un tanto atípica, D) Inflorescencia masculina, E) Flores femeninas, F) Corte transversal de un fruto inmaduro donde se aprecian las semillas en desarrollo en color blanco y G) Fruto maduro	90

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Palabras
AHM	Ácido 3 α -hidroximasticadienónico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenacético
BA	Nº Bencil adenina
CA	Carbón activado
CFL	Campana de flujo laminar
CH	Caseína hidrolizada
CHS	Chalcona-sinthasa
CPA	Ácido 4-clorofenoxiacético
DFR	Dihidroflavonol-reductasa
DMS	Diferencia mínima significativa
EM	Extracto de malta
AHM	Ácido 3- α -hidroximasticadienónico
L-cys	L-cisteína
L-glu	L-glutamina
MS	Murashige y Skoog
PAL	Fenilalanina ammonialiasa"
PCa	Pantotenato de calcio
PVP	Polivinil pirrolidona
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SA	Sulfato de Adenina
CCF	Cromatografía de capa fina
2ip	2-isopentiladenia
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

1. INTRODUCCIÓN

El cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.) es una especie arbórea de la selva baja caducifolia, la cual se distribuye en los territorios de Oaxaca, Puebla, Guerrero, Morelos, Estado de México, Michoacán, Jalisco y Colima de manera frecuente (Pennington y Sarukhan, 2005). Con la corteza de esta especie se suele preparar una infusión para controlar la úlcera gástrica, dolor de garganta, dolor de estómago y otras afecciones por la población; el uso anterior y sobre todo el creciente comercio de la corteza de cuachalalate para emplearse en la práctica de la herbolaria ha ocasionado la reducción de las áreas de distribución de esta especie en áreas naturales del estado de Puebla, y en particular en el Municipio de Jolalpa (Hersch, 1999).

Diferentes estudios sobre la composición química de la especie han sido realizados, además de evaluaciones de la actividad de los compuestos identificados en el control de la úlcera gástrica como lo ha sido el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (AHM), no obstante no se han realizado trabajos de micropropagación en la especie. Además, no se han realizado estudios sobre la presencia del AHM en la corteza en los árboles de cuachalalate de la Mixteca Poblana lo cual fundamentará las bases de un aprovechamiento integral de esta especie al proporcionar las bases metodológicas de propagación de la especie en forma masiva partiendo de árboles que contengan el AHM.

Por todo lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Evaluar las respuestas morfogénicas en diferentes explantes de cuachalalate. y
2. Determinar la presencia del ácido 3α -hidroximasticadienónico en corteza y hojas de árboles de cuachalalate de la Mixteca Poblana, México .

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. TAXONOMIA DEL CUACHALALATE.

Acorde a Cronquist (1981) y Medina (2000). El cuachalalate es una especie ubicada en los siguientes taxa.

Reino: Plantae

División: Embryophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Orden: Julianales

Familia: Julianaceae

Género: *Amphipterygium*

Especie: *adstringens*

Especie: *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.

No obstante lo anterior, el mismo Cronquist (1981) menciona la existencia de características anatómicas muy parecidas entre las familias Julianaceae y Anacardiaceae; situación que ya había sido apreciada por Stern (1952), quien menciona que el estudio de las características del xilema secundario permiten sugerir que la familia julianacea está más relacionada con la Anacardiaceae.

2.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Las principales características morfológicas que describen a la especie de acuerdo con Medina (2000) y Pennington y Sarukhan (2005) son:

Forma: corresponde a un árbol de 4 a 8 metros de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 40 cm, con látex lechoso y ramificación simpodial con la copa aplanada (ver anexo Figura 25-A)

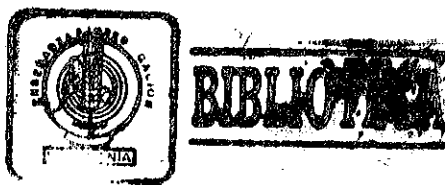
Corteza: De color un tanto variable de gris inclusive rojizo, presenta numerosas lenticelas perfectamente apreciadas como redondas y pálidas y en ocasiones protuberancias (escamas) suberificadas que asemejan a las formadas por el género *Ceiba*. La parte interna de unos 10 a 20 mm se caracteriza por: un color crema a rosado, fibrosa y con presencia de exudado de color blanco cremoso.

Madera: Es Esponjosa, de albura de color claro a crema rosado con olor picante y sabor astringente, vasos grandes muy numerosos y dispuestos en líneas tangenciales.

Hojas: De filotaxia helicoidal, entrenudos cortos, y ubicadas en la parte terminal de las ramas lo cual le da una apariencia de ser verticiladas, imparipinnadas, de 6 a 13 cm de largo, de 3 a 5 foliolos opuestos y sésiles, con el foliolo terminal mas grande; de forma ovada o elípticos, con el margen crenado o serrado apicalmente, densamente pilosos en haz y envés, aunque mas en el envés. Los árboles pierden las hojas por unos 6 meses desde noviembre hasta mayo (ver anexo Figura 25-B, C).

Flores: La especie se reporta como dioica, por lo que existen flores masculinas y femeninas. Las primeras, agrupadas en panículas aglomeradas en las axilas de hojas nuevas, de hasta 15 cm de largo, tomentosas, flores sésiles o sobre pedicelos de unos 3 mm de largo, actinomorfas, de 3 a 4mm de diámetro: perianto de 5 a 7 segmentos, de 1.5 a 2 mm de largo, estambres de 5 a 7, de 1 a 1.5 mm de largo; y las segundas, se reportan como flores solitarias o en inflorescencias en involucros aglomerados las cuales se ubican las axilas de las hojas, pistiladas, sin cáliz y corola, involucro cilíndrico, comprimido distalmente, connato, base angosta, gradualmente dilatado, con dos carpelos aplanados semiunidos y uniloculares, ápice dentado, ramificaciones del estilo con ápice espatulado-dilatados y emarginado. La floración se reporta desde mayo a junio (ver anexo Figura 25-D, E y F)

Frutos: Se reporta como una nuez abultada o samaroide, nutante cuando maduro, sobre los pedicelos aplanados y acrecentes hasta formar una especie de ala, las dimensiones del fruto son 2.5 a 5 cm de largo y 1.2 a 1.8 cm de ancho, de color moreno amarillentas o rojizas. Contienen de 1 a 2 semillas muy aplanadas de 5 mm de ancho (ver anexo Figura 25-E, F y G)



2.3 FITOQUÍMICA.

Los organismos vivos realizan una enorme cantidad de reacciones químicas las cuales permiten la manifestación de la vida, a este conjunto de reacciones también se le conoce como metabolismo y se divide en dos grandes grupos, las reacciones catabólicas y las anabólicas; en las primeras se comprende a todas aquellas reacciones en las cuales se degrada a las moléculas orgánicas y en las segundas a todas aquellas reacciones que forman nuevas moléculas. Producto del metabolismo se generan una gran diversidad de moléculas, algunas de ellas como los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos han sido identificadas como moléculas indispensables para la vida son conocidas como metabolitos primarios en tanto que otras moléculas de mucha menor presencia incluso de producción ocasional y cuya función no es muy clara en los organismos vivos se les conoce como metabolitos secundarios. (Mann, 1978)

La química de los productos naturales involucra al estudio de los compuestos orgánicos generados por plantas, animales u otro organismo vivo producto del metabolismo secundario de estos. La naturaleza de dichos compuestos se establece mediante su aislamiento, purificación e identificación estructural. Específicamente estos compuestos se denominan como metabolitos secundarios, algunos ejemplos son los fenoles, terpenos, taninos, flavonoides, alcaloides, entre otros.

Los terpenos son compuestos orgánicos asociados por derivar de la ruta de biosíntesis del ácido mevalónico los cuales comprenden a los subgrupos de compuestos conocidos como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (carotenoides) los cuales se conforman de la unión de varias unidades de isopreno, molécula constituida por 5 átomos de carbono (Mann, 1978).

Técnicas de análisis

La cromatografía de capa fina (CCF) es una herramienta básica y ampliamente empleada en la separación de compuestos de extractos vegetales. Consiste en separar compuestos con base en la polaridad de estos y del eluyente en una placa de sílica gel dentro de una cámara cromatográfica, de tal forma que conforme asciende el disolvente, éste arrastra con facilidad a aquellos compuestos de igual polaridad y a los de menor o de polaridad distinta al eluyente se quedan en la base de la placa.

Resonancia magnética nuclear: Es un método físico empleado en la química moderna por la rapidez y la precisión de los análisis; en este método se introduce la muestra en un campo magnético intenso y uniforme el cual afecta diferencialmente a las sustancias. De la interacción de elementos como ^1H y ^{13}C átomo y el campo magnético se obtienen los espectros atómicos o bien de moléculas orgánicas a partir de los cuales se puede determinar la cantidad de hidrógenos o carbonos presentes en una molécula y la ubicación relativa de los átomos de hidrógeno en ésta (Ariza *et al.* 2006)

2.3.1. Fitoquímica del cuachalalate:

El empleo del cuachalalate en la herbolaria mexicana y el efectivo control de la gastritis y úlcera gástrica que tienen la infusión de la corteza de esta especie ha sido la base para el estudio fitoquímico de esta especie con la finalidad de aislar, determinar e identificar la estructura de los compuestos activos.

Algunos compuestos identificados en la especie son: El ácido instipolinácico un triterpeno (Domínguez *et al.* 1983); Amentoflavona y agathisflavona, ambos biflavonoides obtenidos de las hojas (Wannan y Quinn, 1988); el ácido cuachalaliónico un triterpeno de la corteza (Watson *et al.* 1987); ácido 6-pentadecil salicílico, ácido 6-hexadecil salicílico, ácido 6-heptadecil salicílico, ácido 6-nonadecyl salicílico y ácido 6-[15'(Z).nonadecil salicílico, todos ellos fenoles y algunos aldehídos como el 6-octadecil salicílico, 6-eicosil salicílico, 5-docosil salicílico de la corteza (Mata *et al.* 1991.); cinco triterpenos de tipo tirucallano de la corteza de cuachalalate (Makino *et al.* 2004) trabajos en los que emplearon diferentes técnicas como la cromatografía en papel, en columna y de gases para la separación, en tanto para la determinación de la estructura molecular la espectroscopia de rayos infrarrojos, espectrometría de masas y RMN de ^1H y ^{13}C .

De la identificación de los compuestos activos del cuachalalate fue necesario conocer la eficiencia de los compuestos en el control de gastritis. Algunos de los trabajos realizados con este fin son: La evaluación de la actividad antiulcerosa en ratas wistar realizada por Navarrete *et al.* (1990), al ensayar extracto acuoso de corteza aplicado al

8% sólo el 25% de individuos evaluados perecieron, lo cual fue más bajo que el control de cimetidina; en otro trabajo realizado por Navarrete *et al.* (1998) determino la presencia del ácido 3 α -hidroximasticadienónico como ingrediente activo (AHM) en el control de la gastritis en el extracto con cloruro de metileno, siendo la fracción P2 del extracto la mas rica en el AHM y la que redujo al 4.4% el área dañada de intestino en comparación con el 88.2 % de área dañada en el tratamiento con subsalicato de bismuto.

Por su parte Pérez *et al.* (1993) evaluaron el extracto etanolico de la corteza de cuachalalate, lo que permitió observar una reducción del ácido total y la pepsina y un incremento de la mucina en las secreciones gástricas de ratas y redujo la cantidad de lesiones duodenales en cerdos y Arrieta *et al.* (2003) aislaron al 3 α -hidroximasticadienónico, β -citosterol y al ácido 3-*epi*-oleanólico, de los cuales el primero y el ultimo mostraron la mayor actividad contra la gastritis en su forma individual.

El reporte mas reciente sobre la fitoquímica de cuachalalate es el de Navarrete *et al.* (2006) en el cual se estableció un protocolo para la determinación rápida y de alta resolución, la cual es capaz de detectar hasta 0.1 o 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del ingrediente activo con su isomero.

2.4 MICROPROPAGACIÓN

2.4.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo se compone de dos grandes grupos de compuestos: los Compuestos inorgánicos y los orgánicos, los cuales, en un balance adecuado permiten el desarrollo de los explantes obtenidos del material vegetal de interés. Por ello, en los inicios del cultivo de tejidos grandes esfuerzos se realizaron en investigar combinaciones de los compuestos inorgánicos y orgánicos para encontrar el balance adecuado para permitir la propagación de especies vegetales, siendo el resultado de ello los medio formulados por Gamborg, Murashige and Skoog (MS), Nish and Nish, White, entre otros (Conger, 1987)

2.4.1.1. Sales inorgánicas

En este grupo se consideran a las diferentes sales que aportan elementos esenciales para las plantas, para las cuales 16 elementos inorgánicos han sido considerados esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Salisbury y Ross 1996). De las formulaciones de medio de cultivo antes mencionadas, se ha sugerido que la formulación del Murashige y Skoog ha sido la más empleada a la fecha (Conger, 1987; Hurtado y Merino 2000)

En las especies leñosas, el tipo de medio de cultivo empleado ha mostrado efectos diferentes sobre el crecimiento; por ejemplo, Leva y Falcone (1990) reportan tan solo el medio MS con zeatina como promotor de la brotación de yemas axilares de *Anacardium occidentale* L. al compararlo con el medio Schenk-Hildebrandt (SH) complementado con zeatina.

En el estudio del establecimiento de híbridos de magnolia (*Magnolia spp*) realizado por Biedermann (1987) se evaluó medio MS, Anderson-Rhododendron (AR) y un medio con baja concentración de macronutrientes, siendo el último el que permitió el mejor desarrollo de las yemas.

De acuerdo con Sriskandarajah *et al.* (1990) el mejor medio para promover el desarrollo de yemas axilares en tres cultivares de manzana fue el medio MS al 100% en comparación en el medio al 50% de la concentración de sales inorgánicas con un 68 y 28% de regeneración. Sin embargo, el mismo autor cita mejores efectos en pera (*Pirus sp*) sobre medios a un cuarto y la mitad de la concentración de las sales inorgánicas.

En las evaluaciones de Ananthakrishnan *et al.* (2002) sobre la regeneración de brotes mediante explantes de cotiledones, encontró que el medio MS complementado con $4.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP se obtuvieron mejores resultados que al emplear la formulación WPM y la formulación de los macro y micronutrientes de los medios MS y B5.

En las evaluaciones de Mneney y Mantell (2002) el medio MS es el que permite la mayor respuesta en yemas sembradas en comparación con las formulaciones WPM, B5 y AND; además, el medio MS al 50% fue ligeramente superior que el medio al 100% aunque sin diferencias estadísticas.

2.4.1.2. Vitaminas.

Este grupo abarca a diferentes compuestos orgánicos considerados como importantes en la dieta para los organismos vivos al ser parte de cofactores (Leninger *et al.* 1995), acorde con Vasil (1982) las células vegetales en cultivo requieren de la tiamina lo cual concuerda con Conger (1987) quién menciona lo esencial de la tiamina en el crecimiento de callos de tabaco.

2.4.1.3. Fuente de carbono.

Como componente del medio de cultivo, es probablemente de los más importantes ya que a través de ella se aporta el carbono necesario para el desarrollo del tejido *in vitro*; al respecto, se ha reportado que la fuente de carbono mas adecuada para las plantas es la sacarosa (Gamborg, 1982; Conger, 1987 y Hurtado y Merino, 2000); aunque la glucosa y la fructosa también dan resultados por separado, en combinaciones con otros compuestos como el manitol mejora la brotación (Conger, 1987).

2.4.1.4. Necrosamiento y el empleo de antioxidantes *in vitro*:

En las especies forestales es frecuente pensar en los problemas de necrosamiento (Bhat y Chandel, 1991) la cual reduce la capacidad regenerativa del tejido *in vitro*, ante ello se han manejado dos grupos de estrategias para contrarrestar al máximo el efecto de la oxidación del tejido vegetal *in vitro* como: Agregar compuestos antioxidantes al medio de cultivo y Manejo. En la primera estrategia los compuestos mas empleados se encuentran el carbón activado (CA), polivinilpirrolidona (PVP), ácido cítrico, ácido ascórbico, L-cisteina, glutamina, arginina y asparagina y en las estrategias para el

control de la oxidación están: el cambio frecuente de medio de cultivo, mantener en oscuridad el corte del tejido, reducir la concentración de las sales del medio de cultivo, reducir el área de corte en el tejido, entre otras. (Pierik, 1990).

La función de los antioxidantes en el medio de cultivo es adsorber a las sustancias oxidables lo cual es realizado por el CA y el PVP, en tanto que el ácido cítrico, ácido ascórbico, L-cisteina impiden que se oxiden los fenoles presentes en el tejido y lo oscurezcan; en tanto, las estrategias de manejo se enfocan a evitar la exudación al reducción del área de corte y la reducción de sales en el medio de cultivo, evitar la acumulación en el medio de cultivo mediante un cambio frecuente del medio de cultivo, y evitar la foto oxidación a través de mantener los explantes en oscuridad (Pierik, 1990)

En el caso particular de la guayaba (*Psidium guajava* L.), la adición de L-cisteina, PVP y ácido cítrico con ácido ascórbico ha permitido reducir el daño causado al tejido vegetal *in vitro* siendo el PVP el que mejor controla éste problema (Concepción *et al*, 2005). Para el caso de *Discorea alata* L. sellar las herida del explante reduce notablemente el oscurecimiento del medio, además encontraron que una mayor cantidad de medio de cultivo favorece al explante en tanto que una reducida cantidad de este es letal para el mismo (Bhat y Chandel, 1991)

En *Schinopsis balansae* la evaluación del ácido cítrico, ácido ascórbico, L-cisteina libre y su clorhidrato cysteina -HCl a 100 mg·L⁻¹ permitieron el establecimiento de todos

los explantes obtenidos de plántulas obtenidas de la germinación de semillas, en tanto que se reduce drásticamente el establecimiento a menos de la mitad de los explantes sembrados que provenían de varetas.

2.4.1.5. Reguladores del crecimiento:

Los reguladores del crecimiento vegetal más empleados son el cultivo de tejidos son las auxinas y citocininas (Gamborg, 1982; Conger 1987; Hurtado y Merino, 2000), las giberelinas también se suelen emplear (Hurtado y Merino, 2000). Algunos otros reguladores del crecimiento o del desarrollo son el ácido abscísico, etileno, jasmonatos y brasinoesteroides (Jankiewicz, 2003). Las auxinas en general son responsables de la división celular, de la estimulación de raíces y se suelen emplear en concentraciones de 0.1 a 10 mg·L⁻¹ (Hurtado y Merino 2000) dentro de estos compuestos están el ácido 3-indolácetico (AIA), el ácido 3-indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 4-clorofenoxiacético (CPA) entre otros. Las citocininas son compuestos derivados de la adenina que promueven la formación de brotes y se suelen emplear desde 0.03 a 30 mg·L⁻¹ (Gamborg, 1982 y Hurtado y Merino 2000) dentro de estos compuestos están la zeatina, 6-bencil-aminopurina (BA), 6-furfuril adenina (cinetina) entre otros.

2.4.1.6. Materiales de soporte.

Dentro de este grupo se incluyen el agar el cual se emplea en los medios de cultivo para solidificarlos, aunque existen otros agentes gelificantes reportados como la sílica gel, la poliacrilamida y el papel filtro (Hurtado y Merino 2000)

2.5. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES LEÑOSAS

2.5.1 Ápices:

Contienen a los puntos de crecimiento aéreo continuo en las plantas, también llamados meristemas, a partir de estos explantes se han establecido *in vitro* especies leñosas como las siguientes: En guayaba (*Psidium guajava* L.) los trabajos de Concepción *et al.* (2005) mostraron que los ápices que mejor respondieron al cultivo *in vitro* fueron los provenientes de brotes de raíz, seguidos de los brotes del tronco y finalmente los brotes de la copa, obteniendo de ellos 1.56, 1.2, 1 brotes por ápice en promedio.

2.5.2. Hoja

Es de los órganos más grandes de las plantas dicotiledoneas y en el cultivo *in vitro* son la fuente de explantes más sencilla de manipular para la extracción de estos. Algunas evaluaciones conducidas en plantas leñosas con explantes foliares se comentan a continuación.

En el trabajo realizado por Nair *et al.* (1984) sobre regeneración de *Annona squamosa* Linn al aplicar solamente $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA obtuvieron 6 brotes por explante seguido de cinetina, 2ip y zeatina a la misma concentración, sin embargo, al combinar BA y cinetina obtuvieron 9.8 brotes por explante. La regeneración de brotes a partir de explantes foliares de 3 cultivares de manzana (*Malus x domestica* Borkl) fue logada por Sriskandarajah *et al.* (1990) al emplear el medio MS al 100% de sales y complementarlo con tidiazuron y ácido naftalenacetico a 0.6 y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. El tamaño del explante también fue evaluado y se encontró que

explantes grandes (mayores a 15 mm) regeneraron mejor en los tres cultivares que tamaños medios y pequeños, siendo la superficie de corte donde se formaron los brotes nuevos. En *Anacardium occidentale* se logró la inducción de callo en las áreas de corte y las nervaduras de los explantes foliares al tratarlas con BA y ANA o 2,4-D sin embargo no se obtuvo la morfogénesis de brotes o raíces (Sy y Martinelli, 1991). La utilización de hojas no sólo tuvo que ver con la producción de brotes a partir de explantes foliares de genotipos selectos de *Taxus*, además tallos y raíces, fueron empleadas para producir callo; el cual se utilizó para evaluar la actividad cancerostática (Parc *et al.* 2002)

2.5.3. Yemas axilares.

Las yemas axilares son uno de los explantes de mayor frecuencia de uso en la regeneración de plantas por ser puntos de crecimiento que pueden ser inducidos a la brotación para formar uno o varios tallos nuevos. En guayaba (*Psidium guajava* L.), se empleó el medio de cultivo MS al 50%, complementado con $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA para obtener 3.7 brotes por explante a al emplear material vegetal obtenido de plántulas de invernadero, no obstante cuando emplearon yemas de plántulas establecidas *in vitro*, logran obtener 3.9 brotes por explante al emplear solamente $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA (Ali *et al.* 2003). En pistacho (*Pistacia vera* L.) se empleó el medio de cultivo MS complementado con diferentes concentraciones de BA y 2ip. La concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ fue para ambas citocininas la que promovió la mejor respuesta en comparación con concentraciones menores y mayores, logrando obtener 3.8 y 2.6 brotes por tratamiento para BA y 2ip respectivamente (Onay, 2000). En *Schinopsis balansae*, una

especie de la familia de las anacardiaceas, se logró obtener un 75 % de explantes con mas de dos brotes de 5 mm de longitud en el medio MS al 25% y complementado con $2.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA lo cual superó a todos los tratamientos con concentraciones mayores y menores de BA y a los 2ip y cinetia (Sansberro *et al.* 2003)

En *Holostemma ada-kodien* una especie arbustiva, la mejor brotación de yemas axilares se logró con BA en combinación con cinetina al emplear 2.0 y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente y con ello obtuvieron 8.2 brotes por explante (Martin, 2002.). Se ha encontrado en *Morus latifolia* que las concertaciones de citocininas por si solas permitieron la brotación de las yemas axilares Lu (2002). Sin embrago, en *Leucaena leucocephala* la aplicación de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA mejoró la respuesta en la emisión de brotes que la sola aplicación de BA pero al mantener las concentraciones de las citocininas y aumentar la concentración de ANA, se redujo el número de brotes por explante (Goyal *et al.* 1985)

2.5.4. Semillas:

Varios trabajos de propagación *in vitro* de especies forestales han empleado explantes obtenidos de semillas (Nair *et al.* 1986; Leva y Falcone , 1990; Zel *et al.* 1998). En el caso de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. Frutos maduros fueron colectados, despulpados y las semillas fueron desinfectados con una solución al 0.1% de cloruro de mercurio por 15 minutos, enjuagados con agua destilada estéril y colocados en un medio MS con 3% de sacarosa, después de tres semanas, las plántulas se emplearon para la multiplicación vía ápices, nudos, hipocotilos epicotilos y cotiledones. Siendo el hipocotilo presentó respuestas de inducción de brotes (Shankar y Jagadish, 1987).

2.6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN *IN VITRO*.

Las condiciones ambientales en el cultivo *in vitro* deben ser controladas en la sala de incubación para lograr el mejor establecimiento, multiplicación y respuestas morfogénicas favorables; una de estas condiciones es la luz, la cual esta relacionada con la pigmentación del tejido vegetal y en la inducción y/o promoción de la organogénesis y/o embriogénesis somática.

2.6.1. La luz.

La luz ha tenido gran influencia sobre el desarrollo de las plantas; entre los efectos fácilmente observables se tiene la inducción floral que ha sido descrita ampliamente en fisiología vegetal al grado que hoy día se puede clasificar a las plantas por su respuesta a la inducción floral en plantas de fotoperiodo corto, largo e insensibles (Bidwell, 1993; Salisbury y Ross, 1996). Se ha demostrado el efecto de la luz en la inducción de pigmentos rojos, al lograr inducir estos pigmentos en callos de *Portulaca*, en donde el cultivo de explantes pigmentados al ser colocados en oscuridad tienden a degradar los pigmentos rojos y a promover la formación de callos blancos, en tanto que éstos colocados bajo luz a una intensidad de 6000 lux incrementó la síntesis de los pigmentos en particular de betaina en las primeras 30 horas de ser expuestos a la luz y lograra la pigmentación completa en los primeros 7 días de cultivo (Kishima *et al.* 1991). Otro ejemplo de la inducción de pigmentos en tejido cultivado *in vitro* se describe en *Fagopyrum esculentum* en la cual se han identificado flavonoides y antocianinas las cuales se concentraron más en tejidos cultivados en la luz que en cultivos en la oscuridad, donde la concentración fue menor con $0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco en tanto

que en luz se incrementa a más de $0.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco, otros pigmentos presentes son las procianidinas y la catequinas la cual presenta diferencias marcadas en la concentración respecto al tejido en oscuridad (Momout y Trotin, 1992)

En el caso de tejido radical de *Rhus javanica* Taniguchi *et al.* (2000) demostraron que la aplicación de luz a raíces permite la acumulación de taninos pero la mayor acumulación de taninos se logra en aquellas raíces que son mantenidas en la oscuridad, siendo en ambos casos la distribución de los pigmentos en las paredes celulares de la epidermis. Aparte de la inducción de pigmentos por efecto de la luz, este factor también afecta la morfogénesis de los tejidos, por ejemplo: La formación de bulbillos se ha logrado al emplear tallos florales de tulipán (*Tulipa* sp) y aplicarles $44 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con relaciones menores de 3.4 de proporción del espectro rojo / rojo lejano (Taeb y Alderson, 1990). En *Annona squamosa* Nair *et al.* (1984) lograron regenerar 13.6 brotes por explante foliar al colocarlos a una intensidad lumínica de 1000 lux en comparación 7 y 10.4 brotes por explante en intensidades de 500 y 2000 lux respectivamente

2.7. FACTORES QUE ALTERAN LA SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE FENOLES

2.7.1. Luz.

Se ha reportado que el la luz incrementa la actividad de muchas enzimas involucradas en la biosíntesis de fenoles como la Fenilalanina amonio-liasa “PAL” por sus siglas en ingles **Chalcona-sinthasa** (CHS) y **Dihidroflavonol-reductasa** DFR (Treutter, 2001),

así, se reporta que 15 minutos de luz a 365 nm causó la conversión del 40% de ácido trans-p-cumárico al ácido cis-p-cumárico, el cual inhibe menos a PAL en plántulas de *Cucumis*, permitiendo un incremento en la producción de fenoles (McClure, 1979)

2.7.2. Nutrición.

Tanto la falta como el exceso de nutrimentos en la planta altera el metabolismo completo de la misma, por lo que el balance de fenoles también se modifica, ya que son productos del metabolismo (McClure, 1979). En particular, la importancia del Boro se destaca por la deficiencia, la cual causa la formación de fenoles (Walker, 1975; McClure, 1979)

2.7.3. Infecciones.

Se ha establecido ampliamente que la presencia de microorganismos fitopatógenos en el tejido tiende a inducir la acumulación de fenoles como mecanismo de defensa, entre éstos se mencionan al ácido felúrico y cinámico a la luteína y cajanone, entre otros; los anteriores tienen la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de algunos hongos. (Dabler *et al.* 1968; Friend, 1979; Hammerschmidt, 2005).

2.8. OXIDACIÓN DE FENOLES.

La oxidación de los fenoles es un fenómeno normal en la interacción hospedero-patógeno mostrado por el oscurecimiento de células y tejidos Hammerschmidt (2005), la oxidación deriva en quinonas (Badui, 1984) y radicales libres los cuales pueden

inactivar parte de los mecanismos empleados por los patógenos. No obstante, las quinonas se consideran tóxicas también para las células vegetales (Walker, 1975). Por otra parte, Treutter (2001) menciona que los fenoles y los taninos pueden oxidarse mediante la polifenol oxidasa (PPO), por sus siglas en inglés, lo cual resulta en pigmentaciones de color café y amarillo, que han sido un indicador de la presencia de fenoles en el cultivo de tejidos (Bhat y Chandel, 1991; Concepción *et al.* 2005).

2.9. FENOLES Y LA REGENERACIÓN *IN VITRO*.

Una de las especies leñosas regeneradas *in vitro* ha sido la guayaba, en la cual, la clasificación de las yemas por la procedencia de las mismas de la planta ha mostrado diferencias significativas en la capacidad de regeneración, los explantes con una elevada concentración de fenoles en el tejido procedentes de copa son los que menos brotan, en tanto que los que tienen menor concentración de fenoles (procedentes de raíz) brotan mejor (Concepción *et al.* 2005).

2.10. GERMINACIÓN DE SEMILLAS.

Harman y Kester (1995) han dividido el proceso de la germinación de semillas para entender el proceso en las siguientes etapas:

- a) La primera etapa es la activación de la semilla mediante la imbibición con agua, lo cual se observa por el incremento en volumen de la misma, y en

consecuencia se activa el metabolismo de la semilla, siendo notable la germinación al momento de la emergencia de la radícula.

b) La segunda etapa es la digestión y translocación. En ésta, las reservas del endospermo se translocan al embrión permitiendo que éste se desarrolle.

c) La tercera etapa es el crecimiento de la plántula, en la que la división celular en ambos lados del eje embrionario permite la observación de radícula y posterior el tallo con su hipocotilo y epicotilo.

La germinación de semillas se realiza generalmente en condiciones *ex vitro* y en menor frecuencia bajo condiciones *in vitro*; siendo solamente las orquídeas las más propagadas en las ultimas condiciones, debido a que en los cultivos *in vitro*, se aportan los nutrientes necesarios para la germinación de las semillas de orquídeas que en la naturaleza son aportados a través de la simbiosis entre orquídea y microorganismos localizados en la corteza de árboles, toda vez que el embrión se encuentra inmaduro y carece de las reservas suficientes para lograr la germinación (Harmant y Kester, 1995).

En cuachalalate se ha realizado un trabajo de germinación de semillas *ex vitro* (Zarate, 1984) determinándose que no existen problemas de latencia en la semillas, sin embargo, el mejor tratamiento para germinar semillas tuvo poco más del 50% de germinación.

En algunas especies leñosas es particularmente difícil realizar la propagación *in vitro* al emplear material vegetal de plantas adultas, por ende, se inició con la germinación de semillas para utilizar el material establecido asépticamente en la inducción de yemas axilares o brotes (Nair *et al.* 1986; Shankar y Jagadish, 1987; Zel *et al.* 1988; Leva y Falcone, 1990.)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN. Los experimentos de propagación fueron realizados en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y el laboratorio de semillas del departamento de Fitotecnia, en tanto que los extractos de corteza y hoja se obtuvieron en el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola, todos de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2. Material vegetal. Para los experimentos de propagación se emplearon cuatro tipos de explantes (ápices, hojas, semillas y yemas axilares) que representan cuatro grupos de experimentos; los ápices y semillas se obtuvieron de plantas colectadas en Tilapa, Puebla, en tanto que hojas y yemas axilares de plántulas obtenidas en laboratorio.

3.2.1. Ápices como explantes. Desinfestación. Puntas de 2 cm de longitud fueron obtenidas de las varetas colectadas, éstas fueron lavadas con agua jabonosa y cepilladas con un escobillon, enjuagadas, sumergidas en alcohol al 70% por 30 segundos, enjuagadas, sumergidas en hipoclorito de sodio al 3.75% (p/v) por 20 minutos (excepto en el primer experimento) y finalmente enjuagadas con agua destilada estéril por tres ocasiones en campana de flujo laminar.

Medios de cultivo. Como medio de cultivo base se emplearon las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) complementado con tiamina-HCl al $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, myo-inositol a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido cítrico a $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido ascórbico a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, agar a $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con algunas modificaciones como se indica en cada experimento.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo empleado en las evaluaciones de ápices.

Experimento		Sales	Reguladores	Otros componentes
Descripción	Clave	MS	(mg·L ⁻¹)	(mg·L ⁻¹)
Desinfestación	A1-A1	100%	0.5 de cinetina y 1 de AIA	-----
Citocininas	A2-A4	50%	BA y cinetina	100 de PVP
Tamaño de ápice	A3-A5	50%	0.5 de BA	100 de PVP
L-cys vs pvp	A4-A10	50%	0.5 de BA	PVP y L-cys
Coadyuvantes	A5-A11	50%	0.5 de BA	EM, CH, SA, PCa, L-cys y, L- glu
PVP	A6-A13	50%	0.5 de BA	PVP
BA vs 2ip	A7-A15	50%	BA, 2ip	100 de PVP, 500 de CH
Coadyuvantes 2	A8-A24	50%	0.5 de BA	Ácido p-amino benzoico, Fluoroglucinol y Pirogalol.

En todos los medios de cultivo, el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 antes de esterilizar a 120°C y $1.5 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ por 20 minutos en autoclave

Tratamientos y Modelos experimental por evaluación. En cada uno de los experimentos realizados con ápices se aplicó el modelo de un criterio de clasificación (UC) o bien un modelo de dos criterios (DC) de clasificación considerados como los factores de variación ; el segundo factor fue confinado en el primer factor y de cada uno de éstos se hicieron varias observaciones como se indica en cada caso a continuación. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de rangos ($\alpha=0.05$) se determinaron diferencias estadísticas.

Cuadro 2. Modelos experimentales y tratamientos aplicados en las evaluaciones de ápices.

Experimento		Modelo	Primer factor	Segundo factor	Rep.*
Descripción	Clave				
Desinfectación	A1	DC	1.25, 3.75, 5, 8.75 [p/v] de NaOCl	10, 20 y 30 minutos de exposición	10
Citocininas	A2	DC	Cinetina y BA	0.5, 1.0, 1.5 y 2 mg·L ⁻¹ ,	5
Tamaño de ápice	A3	DC	vareta gruesa y delgada	ápices pequeños (0.4 a 0.7 mm) y grandes (0.8 a 1.1 mm)	10
L-cys vs pvp	A4	UC	Sin, PVP, L-cys, y PVP +L-cys a 0, 100, 100 y 100 + 100 mg·L ⁻¹ respectivamente	-----	5
Coadyuvantes	A5	UC	EM., CH., SA., PCa, L- cys y L-glu a 100, 500, 80, 0.5 y 100 mg·L ⁻¹	-----	5
PVP	A6	DC	Vareta gruesa y delgada	PVP a 50 , 100 y 200 mg·L ⁻¹	10
BA vs 2ip	A7	DC	BA y 2ip	0.5, 1.0 y 1.5 mg·L ⁻¹	10
Coadyuvantes 2	A8	DC	Ácido p-amino- benzoico, Fluoroglucinol y Pirogalol	50 y 100 mg·L ⁻¹ ,	10

*Rep. = Repeticiones, DC= Modelo de dos criterios de clasificación, UC= Modelo de un criterio de clasificación.

Unidad experimental. En todas las evaluaciones realizadas la unidad experimental fue un tubo de ensaye, medio de cultivo y un ápice como explante.

Las unidades experimentales fueron mantenidas a 16 horas luz y 8 horas oscuridad a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $21 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Variables evaluadas. Las variables evaluadas en cada evaluación fueron las siguientes, al final de ellas se anotó la clave del experimento en la cual evaluó.

Contaminación (c): Se asignaron valores con base a escala categórica al tipo de contaminación presente por unidad experimental y se registró el valor a los 14 días de establecido el experimento. Los valores asignados fueron: 1 para contaminación por bacterias, 2 para la contaminación por hongos y 3 para contaminación conjunta de bacterias y hongos. En A1, A2

Tamaño del ápice (t): Se evaluó con una regla de plástico y microscopio, con lo cual se midió la altura del ápice contando desde la base del explante hasta la parte más alta del mismo, los valores se registraron en mm. Las lecturas se realizaron a los 7, 14 y 21 días de iniciada la siembra, aunque en algunos casos se obvió reportar la secuencia de dichas evaluaciones por cuestiones de espacio. En A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8.

Necrosis (n): En una revisión visual de cada explante bajo microscopio a los 14 y 21 días de iniciada la siembra se evaluó el porcentaje del explante con tejido dañado, siendo observado el daño por la coloración oscura del explante. En A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8.

Necrosis completa de tejido(n): Para evaluar esta variable, se asignó el valor de 1 cuando el tejido del explante evaluado se encontraba completamente necrosado, y 0 cuando no lo estaba.; esta variable se evaluó en A1.

Exudados en el medio de cultivo (e14): Una escala sobre la presencia de exudados se empleó, en la cual se asignó el valor 0 cuando el tejido no desprendía sustancias al medio, 1 cuando el tejido liberaba poca cantidad de exudados hasta 2 mm alrededor del explante, 2 cuando el tejido liberaba una cantidad media de exudados de 2 mm a 4 mm alrededor del explante, 3 cuando liberaba una alta cantidad de exudados los cuales se extendían a más de 4 mm alrededor del explante. Lo anterior después de 14 días de cultivo en A4.

Ancho de exudados (ane): Se midió con una regla de plástico, la extensión en mm de los exudados en forma paralela al plano horizontal del medio de cultivo de cada explante del experimento a los 7 días de iniciada la siembra en A4

Profundidad de exudados (ale): Se midió con una regla de plástico la extensión en mm de los exudados en forma perpendicular al plano horizontal del medio de cultivo de cada explante del experimento a los 7 días de iniciada la siembra. En A4

3.2.2. Hojas como explantes. Material vegetal. Para todos los experimentos se emplearon hojas jóvenes obtenidas de plántulas de germinación *ex vitro*, siendo dichas plantas previamente tratadas con captan y agrimicin 500 a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Desinfestación. Las hojas se lavaron con agua jabonosa, enjuagadas, sumergidas en alcohol al 70% por 30 segundos, enjuagadas, sumergidas en hipoclorito de sodio al 1.25% (p/v) por 15 minutos y finalmente enjuagadas con agua destilada estéril por tres ocasiones en campana de flujo laminar.

Medios de cultivo. Como medio de cultivo base se emplearon las sales de Murashige y Skoog, 1962 (Sales MS) con tiamina-HCl al $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, myo-inositol a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, agar a $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, algunas modificaciones como se indica en la respectiva evaluación

Cuadro 3. Composición de medio de cultivo empleado en las evaluaciones de hoja

Experimento		Sales MS	Reguladores ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Otros compuestos
Descripción	clave			
Posición de explante	H1	Nitratos 50%	1 de BA	150, 100 y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, de ácido cítrico, ácido ascórbico y PVP
Posición de explante	H2	Nitratos 50%	1 y 2 de BA y AIA	150, 100 y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, de ácido cítrico, ácido ascórbico y PVP
Luz vs oscuridad	H3	MS	-----	-----
Carbón activado	H4	50%	1 y 0.5 de BA ANA	$100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de EM
Auxinas y Citocininas	H5 y H6	50%	AIA, ANA, 2,4-D y 2ip, cinetina, BA	150, 100, 100 y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, de ácido cítrico, ácido ascórbico, PVP y EM

En todos los medios de cultivo, el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 antes de esterilizar a 120°C y $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ por 20 minutos en autoclave

Tratamientos y diseño experimental por evaluación.

En cada uno de los experimentos realizados con hojas para analizar los datos se realizó con base un modelo de uno o dos criterios (UC o DC) de clasificación con interacción en el de dos criterios, con varias observaciones de cada combinación. Considerando a los factores de variación como criterios, el segundo factor fue confinado en el primer y de cada uno de éstos se hicieron varias observaciones como se indica a continuación. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de rangos ($\alpha=0.05$) se determinaron diferencias estadísticas.

Cuadro 4. Diseños experimentales y tratamientos empleados en las evaluaciones de hojas

Experimento						
Descripción	Clave	Modelo	Primer factor	Segundo factor	Rep.*	
Posición de explante	H1	UC	Haz y envés	-----	5	
Posición de explante	H2	UC	Envés, haz, vertical	-----	20	
Luz vs oscuridad	H3	DC	Luz, oscuridad	0, 50 y 100% de sales MS	5	
Carbón activado	H4	DC	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg·L ⁻¹ de 2,4-D	0 y 1 g·L ⁻¹ de carbón activado	5	
Auxinas	H5	DC	AIA, ANA y 2,4-D	0.01, 0.5, 1, 5, 10 mg·L ⁻¹	5	
Citocininas	H6	DC	2ip, cinetina y BA	0.5, 1, 3, 5 y 10 mg·L ⁻¹	5	

*Rep.= repeticiones, DC= Modelo de dos criterios de clasificación, UC= Modelo de un criterio de clasificación.

Unidad experimental. En todos las evaluaciones realizadas la unidad experimental fue un tubo de ensaye, medio de cultivo y un disco foliar de 6 mm² como explante, excepto

en la hoja 14 donde la unidad experimental se conformo de un frasco, con medio de cultivo, y 6 explantes foliares de 6 mm^2 .

Las unidades experimentales fueron mantenidas a 16 horas luz y 8 horas oscuridad a $25^\circ\text{C} \pm 2$ y $21 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o suprimiendo la iluminación por completo y manteniendo la temperatura

Variables evaluadas. Las variables evaluadas en cada experimento con hojas como explantes son las siguientes, además, al final se anota la clave del experimento en la cual se evaluó.

Contaminación (c14): Para evaluar esta variable se asignaron valores al tipo de contaminación presente por unidad experimental y se registró el valor a los 14 días de establecido el experimento. Los valores asignados fueron: 1 para la presencia exclusiva de contaminación por bacterias, 2 para la presencia exclusiva de contaminación por hongos y 3 para la presencia de bacterias y hongos en la misma unidad experimental. Esta se evaluó en H1, H2, H3, H4, H5 y H6

Necrosis (n): En una revisión visual de cada explante a los 7 o 14 días de iniciada la siembra, se calculó el porcentaje de la superficie del tejido dañado, para ello, toda área con coloración oscura se consideró dañada. H1, H2, H3, H4, H5 y H6

Callos formados (cas14): se cuantificó el número de callosidades presentes en el explante foliar después de 14 días. Con los datos obtenidos, se calculó la media aritmética de callos por tratamiento. H2 y H3

Exudados en medio de cultivo (e14): Una escala sobre la presencia de exudados se empleó, en la cual se asignó el valor 0 cuando el tejido no excretaba sustancias al medio que tuvieran un color diferente al medio de cultivo, 1 cuando apenas y se apreciaba un cambio de color en el borde del explante, acaso 1 mm de extensión a partir del explante, 2 cuando las sustancias se extendían mas haya de 1mm y hasta unos 8 mm, 3 cuando los exudados abanaban mas de 8 mm hasta 1.5 cm aproximadamente, y 4 cuando el medio de cultivo presentaba abundante cantidad de sustancias de color diferente al medio de cultivo y ampliamente extendidas en este más de 1.5 cm de profundidad a partir del explante, lo anterior después de 14 días de cultivo en H3.

Coloración de exudados en el medio de cultivo (ce14): Para cuantificar esta característica, se asignó el valor de 0 cuando no existía presencia de color diferente en el medio de cultivo, 1 cuando el color presente era amarillo, 4 cuando el color era café y 5 cuando el color era oscuro (negro). La variable se cuantificó a los 14 días de iniciado el cultivo en H3.

Número de raíces a los 14 días (r21). Se contabilizó el número de raíces formadas por explante después de 14 días de iniciado el tratamiento. Con el cual se calculó la media aritmética de raíces presentes en cada tratamiento y bloque. En H4

Porcentaje de disco foliar con callo (pdc14): a cada disco foliar se le calculo en forma aproximada mediante observación directa en microscopio, el porcentaje del disco foliar con callo después de 14 días, con los valores obtenidos se calculo la media aritmética de porcentaje de disco foliar con callo por tratamiento. En H5 y H6.

Peso fresco de callo (p): transcurridos 14 días de iniciada la incubación de los explantes, se extrajeron del tubo de ensaye y se cuantificó el peso (mg) de éstos con balanza analítica. En H5 y H6.

3.2.3. Semillas como explantes.

Material vegetal. Se emplearon frutos colectados de árboles ubicados en el municipio de Tilapa, Puebla perteneciente a la región de la Mixteca Poblana, colectados en enero de 2006.

3.2.3.1. Semillas germinadas en condiciones *ex vitro*.

Material vegetal. Una muestra de 99 frutos fue tomada al azar del conjunto de frutos colectados.

Desinfestación. Los frutos fueron lavados en solución jabonosa, enjuagados y sumergidos en solución de hipoclorito de sodio al 0.4 % por 10 minutos. Seguido de enjuagues y eliminación de las alas de los frutos. Terminado el procedimiento de

limpieza, se procedió a colocar tres repeticiones con 25 frutos y otra con 24 frutos en caja petri cubierta con papel filtro humedecido, siendo las cajas colocadas en la cámara de incubación a 25°C y 16 horas luz, 8 horas oscuridad.

Variables evaluadas.

Número de semillas germinadas. A los 21 días de la siembra se contó el número de radículas emergidas en cada fruto, y se calculó el porcentaje de frutos germinados

Número de semillas en formación. Se abrió cada fruto después de 21 días de la siembra y se determinó el número total de semillas en él. Se consideró que una semilla en formación tenía la categoría si presentaba las cubiertas seminales aunque no presentaran estructuras de reserva o bien que éstas estuvieran incompletas.

Número de semillas con cotiledones. Cada semilla se abrió para verificar la presencia de cotiledones. Únicamente las que tenían cotiledones se contabilizaron, aunque no hubieran germinado a los 21 días después de la siembra.

3.2.3.2. Semillas germinadas en condiciones *in vitro*

Material vegetal. Semillas con cubiertas fueron obtenidas de frutos; se desinfestaron y se aislaron con ayuda de microscopio en CFL para los siguientes experimentos: Exposición al hipoclorito de sodio y exposición al H_2O_2 , en tanto, semillas previamente aisladas (sin cubiertas) fueron empleadas para los siguientes experimentos: Hipoclorito de sodio vs hipoclorito de calcio, Integridad física de semilla y pre aislamiento.

Medios de cultivo. En cada una de las evaluaciones de semillas, se empleó las sales del medio de cultivo MS y se complementaron con tiamina-HCl al $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, myo-inositol a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido cítrico a $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido. ascórbico a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, PVP a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, agar a $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 antes de la esterilizar a 120°C y $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$, por 20 minutos en autoclave. Sin embargo, en algunos casos la concentración de las sales se modificó como se indica a continuación. Las sales al 50% se emplearon en el experimento exposición al hipoclorito de sodio y al H_2O_2 , al 100% en semillas expuestas a hipoclorito de sodio vs hipoclorito de calcio, al 100, 50 y 0% para integridad física de semillas y pre aislamiento.

Desinfestación. Las semillas empleadas en cada experimento fueron lavadas con solución jabonosa, enjuagadas, sumergidas en alcohol al 70% (v/v), enjuagadas y finalmente sumergidas en hipoclorito de sodio al 2.5 % (p/v) por 15 minutos, excepto en experimentos exposición al hipoclorito de sodio, al H_2O_2 y hipoclorito de sodio vs hipoclorito de calcio donde diferentes concentraciones, tiempos y tipo de desinfectantes fueron empleados como tratamientos, posterior al procedimiento de desinfección, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril por tres ocasiones dentro de CFL para ser sembradas en el medio de cultivo respectivo.

Tratamientos y modelos experimentales.

En exposición a Hipoclorito de sodio cuatro tratamientos se formaron con diferentes concentraciones del hipoclorito de sodio (0, 1.25, 2.5, 7.5 (p/v)). Cada tratamiento contó con 10 repeticiones y se empleó un modelo de un criterio de clasificación para

analizar los datos. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de rangos ($\alpha=0.05$) se determinaron diferencias estadísticas.

En exposición al H_2O_2 , tres tratamientos se formaron con los niveles del factor tiempo de exposición (24, 48 y 72 horas) a H_2O_2 (desinfestante) con agitación a 100 rpm; los tratamientos fueron aplicados a semillas con cubiertas, cada tratamiento contó con 10 repeticiones y se aplicó un modelo de un criterio de clasificación para analizar los datos. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de rangos ($\alpha=0.05$) se determinaron diferencias estadísticas.

En exposición a Hipoclorito de sodio vs hipoclorito de Calcio tres tratamientos a base de hipoclorito de sodio al 2.5 % (p/v) e hipoclorito de calcio al 4 y 10% (p/v). Cada tratamiento contó con 20 repeticiones y los datos se analizaron según un modelo de un criterio de clasificación. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de rangos ($\alpha=0.05$) se determinaron diferencias estadísticas.

En integridad física de la semilla se evaluó con base a un modelo de dos criterios de clasificación con interacción el efecto de la integridad física de la semilla como primer criterio de variación, con dos niveles (no dañada y dañada) en los cuales se confinaron tres concentraciones de las sales inorgánicas en el medio de cultivo (0, 50 y 100%) y de cada uno de estos se hicieron 10 observaciones. En segundo lugar el pre aislamiento de semillas se evaluó con base a un modelo de dos criterios de clasificación con interacción, el efecto de eliminar parte de la cubierta de los frutos con 60 días de

anticipación (semillas preaisladas) y la eliminación de la cubierta de los frutos el día anterior (semilla no preaislada) como primer factor de variación, en los cuales se confinaron las concentraciones de las sales inorgánicas en el medio de cultivo MS 0, 50 y 100% y de cada uno de éstos se hicieron diez observaciones. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de rangos ($\alpha=0.05$) se determinaron diferencias estadísticas.

La unidad experimental. Fue un tubo de ensaye con medio de cultivo y un explante (semilla), excepto en semillas germinadas *ex vitro* donde una caja petri con 25 frutos conformo la unidad experimental.

Condiciones de incubación: Las unidades experimentales fueron mantenidas a 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$,

Variables evaluadas.

Número de explantes contaminados (c). Se contabilizó el número de explantes contaminados a los 7 días después de la siembra en experimento integridad física de semilla y preaislamiento, en tanto que a los 21 días después de la siembra en experimentos de exposición al hipoclorito de sodio, al H_2O_2 y exposición al hipoclorito de sodio vs hipoclorito de calcio.

Número de semillas germinadas (g) Se contabilizó la cantidad de semillas con desarrollo de radícula de cada tratamiento; en exposición a hipoclorito de sodio y

exposición al H_2O_2 se evaluó a los 21 días y en integridad física de la semilla como en preaislamiento de semilla a los 7 días de la siembra.

Número de plántulas formadas (plfor): Se evaluó en cada una de las unidades experimentales a los 21 días de la siembra; si la semilla formó raíz, tallo y hojas se le asignó el valor de 1, en caso contrario se asignó el valor de 0 para cada tratamiento de hipoclorito de sodio vs hipoclorito de calcio y en integridad física de la semilla como en preaislamiento de semilla.

Intensidad media de contaminación (inc7): a cada unidad experimental se le asignó un valor con base en la siguiente escala: 0 sin contaminación, 1 escaso desarrollo del agente contaminante (apenas apreciable), 2 desarrollo visible del agente contaminante en el borde del explante y 3 cuando la contaminación se extendía más allá del borde del explante e inclusive abarcaba el 100% del medio de cultivo; con ello, se sumaron los valores de cada una de las unidades experimentales por cada nivel de cada factor y a dicha suma se dividió entre el total de las unidades experimentales de cada nivel de cada factor. Evaluada en integridad física de semilla y preaislamiento de semilla.

3.2.4. Yemas axilares como explantes.

Medio de cultivo. Se emplearon las sales de Murashige y Skoog, complementadas con tiamina-HCl al $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, myo-inositol a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido cítrico a $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido ascórbico a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, PVP a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, agar a $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; El pH se

ajustó a 5.7 ± 0.1 antes de esterilizar a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $1.5\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$, por 20 minutos en autoclave

Tratamientos. En un primer experimento de yemas se evaluó el efecto las concentración de sales del medio de cultivo MS al 50 y 100% en las cuales se confino las concentraciones de BA a 0.5, 1 y $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y de cada uno de éstos se hicieron cuatro observaciones. En un segundo experimento de yemas tan sólo se evaluó el efecto de la zeatina a 3, 6 y $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ como niveles del factor de variación, las sales del medio de cultivo MS se mantuvieron al 50%.

Modelo de evaluación.. En el primer experimento el análisis de los datos se hizo con base en un modelo de dos criterios de clasificación con interacción, con varias observaciones de cada combinación. El segundo experimento fue un modelo de un criterio de clasificación con tres tratamientos y 4 unidades experimentales por tratamiento. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de rangos ($\alpha=0.05$) se determinaron diferencias estadísticas.

Unidad experimental: La unidad experimental fue un tubo de ensaye, medio de cultivo y un micro esqueje.

Variables evaluadas.

Número de explantes contaminados (c21): Se registró el valor a los 21 días de establecido el experimento. Los valores asignados fueron: 1 para la presencia exclusiva de contaminación por bacterias, 2 para la presencia exclusiva de contaminación por hongos y 3 para la presencia de bacterias y hongos en la misma unidad experimental.

Yemas brotadas (yb21): Se contabilizó la cantidad de yemas brotadas en cada explante después de 21 días de la siembra, con lo cual se calculó el porcentaje de yemas brotadas por explante al dividir el número de yemas brotadas entre el total de yemas por explante y finalmente multiplicar por 100.

Longitud de yemas (lye21): a cada yema brotada se le midió la altura alcanzada en mm a los 21 días de la siembra y se calculó la media por tratamiento.

3.3. FITOQUIMICA

Purificación del ácido 3α -hidroximasticadienónico. 5.6 kg de corteza seca de cuachalalate fue triturada en molino manual, el triturado fue macerado con reflujo por 2 horas con hexano por tres ocasiones, La cortaza entonces fue macerada con reflujo por 2 horas metanol por tres ocasiones y a dicho extracto se le evaporo el metanol para obtener el extracto de metanol el cual fue extraído con agua destilada para obtener la fracción insoluble la cual se obtuvo con matraz de separación después de 12 horas de reposo; la fracción insoluble fue llevada a sequedad. Una vez obtenida la fracción insoluble en agua destilada, ésta fue extraída con CH_2Cl_2 por tres ocasiones y el

extracto fue llevado a sequedad para ser empleado en la separación por cromatografía de columna. 60 fracciones de 500 ml cada una fueron obtenidas de la cromatografía en columna, siendo separadas en 4 "pool" de 15 fracciones cada uno por el empleo de hexano, hexano:acetato de etilo (9:1), hexano:acetato de etilo (1:1) y acetato de etilo, mediante placa cromatografica se ubico en las fracciones 2 a 15 de hexano:acetato (1:1) de etilo la presencia de cristales y la elusión de un compuesto al mismo $R_F=0.325$ por lo que dichos cristales fueron lavados con metanol, se les determino el punto de fusión (entre 138-140 °C) y se determinó que dichos cristales corresponden al ácido 3 α -hidroximasticadienónico (AHM) mediante RMN de ^1H . los cristales fueron entonces empleados de referencia en las CCF para determinar la presencia del AHM en las muestras de árboles de la Mixteca poblana.

Material vegetal. De 4 árboles seleccionados en el sitio de colecta, se tomaron muestras de corteza (aproximadamente 100g) la cual fue cortada en trozos pequeños con la ayuda de un machete con la finalidad de acelerar la desecación del material, los trocitos obtenidos se colocaron sobre papel periódico, a la sombra y con buena ventilación. Una vez que el material se secó por espacio de 3 semanas, el material fue triturado con ayuda de un molino manual.

Extractos vegetales: Los extractos del material vegetal fueron realizadas acorde a la metodología de Navarrete *et al.* (1998). La corteza seca y triturada fue macerada con hexano por tres ocasiones y después con Metanol por tres ocasiones mediante maceración. Del extracto de metanol se evaporó el disolvente y el residuo se dejó a

sequedad; dicho extracto, fue entonces extraído con agua destilada estéril por tres ocasiones. El residuo del extracto acuoso fue entonces extraído con cloruro de metileno éste se llevó a sequedad mediante evaporación del disolvente a temperatura ambiente. Dada la pequeña cantidad de extracto de cloruro de metileno obtenida de cada corteza y hoja de cada árbol, en lugar de realizar un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, se realizó una separación por cromatografía en placa fina (CCF) preparativa empleando como eluyente Hexano: Acetato de etilo (4:1), siendo realizadas cuatro placas de 4X5 cm por cada muestra. De cada muestra se obtuvo mediante raspado de las placas de cada muestra la porción de silica gel a la cual eluye la muestra pura de la referencia del ácido 3 α -hidroximasticadienónico. La fracción de extracto en la silica gel de cada muestra fue extraída con hexano y acetato de etilo por maceración a temperatura ambiente por 3 Días. El extracto obtenido se filtro, se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente y finalmente los extractos se analizaron mediante RMN de ^1H para determinar la presencia del compuesto previamente observado en CCF con referencia del compuesto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 De experimentos con ápices como explantes.

4.1.2 Desinfección A1.

En la evaluación de la desinfección del material vegetal con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio se logró apreciar estadísticamente que el hipoclorito de sodio al 1.25% controló menos la contaminación a los 21 días de sembrados los ápices. Sin embargo, fue el que menos necrosó los explantes con una media de 0.1 parte del explante seguida de hipoclorito de sodio al 3.73% con una media de 0.23 partes de explante necrosado, en tanto que las demás concentraciones fueron estadísticamente iguales y ocasionaron incluso la necrosis completa de todos los explantes como lo muestra el análisis de varianza y la comparaciones de medias (anexo cuadro 1A).

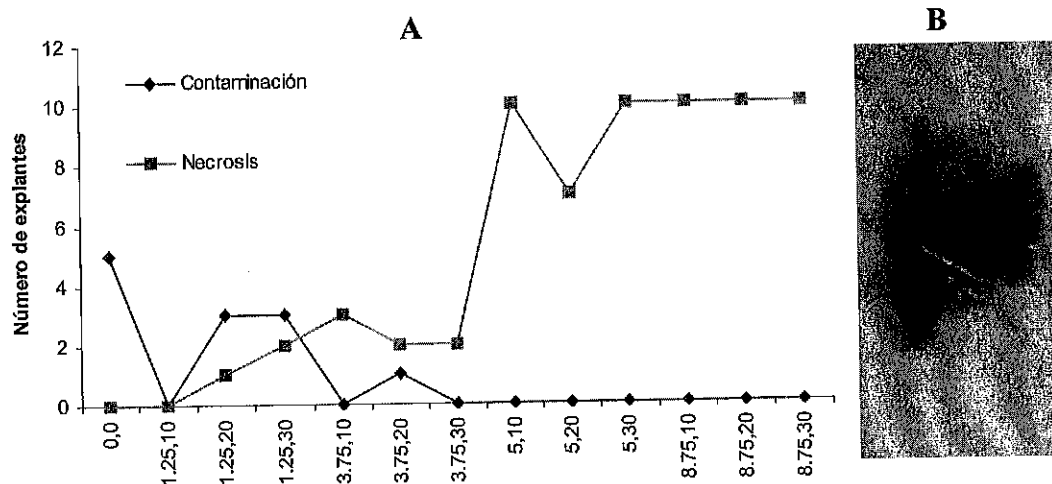


Figura 1. Frecuencias absolutas de contaminación (A) y necrosis completa en ápices (B) de cuachalalate después de 21 días de siembra

En referencia a los tiempos de exposición ninguno presentó diferencias estadísticas sobre la contaminación ni sobre la necrosis completa de los ápices sembrados. Sin

embargo, entre más se incrementaba la concentración del hipoclorito de sodio, mayor fue la necrosis de tejido correlacionando estos valores con un 0.7034 ($\alpha < 0.0001$) y menor la contaminación con una correlación de -0.2808 ($\alpha = 0.0019$), por lo que se decidió emplear la concentración de 3.75 % de hipoclorito de sodio y 20 minutos que permitió únicamente la contaminación de un explante y sólo dos ápices se necrosaron por completo como se muestra en la Figura 1A-B.

Al incrementar la concentración del hipoclorito de sodio se mejoró el control de los agentes contaminantes en el tejido vegetal, notándose en la disminución de explantes contaminados; sin embargo, la viabilidad de los explantes también se redujo

4.1.2 Citocininas A2.

Para la etapa del establecimiento aséptico de ápices se evaluaron las citocininas para promover la formación de nuevos brotes, de esta evaluación la variable altura de ápices representada en las gráficas como t21 no mostró diferencias estadísticas entre tipo de citocinina ni entre concentraciones, sin embargo, la aplicación de BA mostró ser menos eficiente para promover el crecimiento de ápices en comparación con cinetina (ver Figura 2A), además, las concentraciones de 1.5 y 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para ambas citocininas presentaron una media mayor de explantes completamente necrosados (1,6 y 1,4) del tejido que las concentraciones bajas (0,5 y 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) las que no dañaron el tejido por completo en los primeros 21 días de iniciada la siembra (ver Figura 2B y anexo cuadros 12, 13).

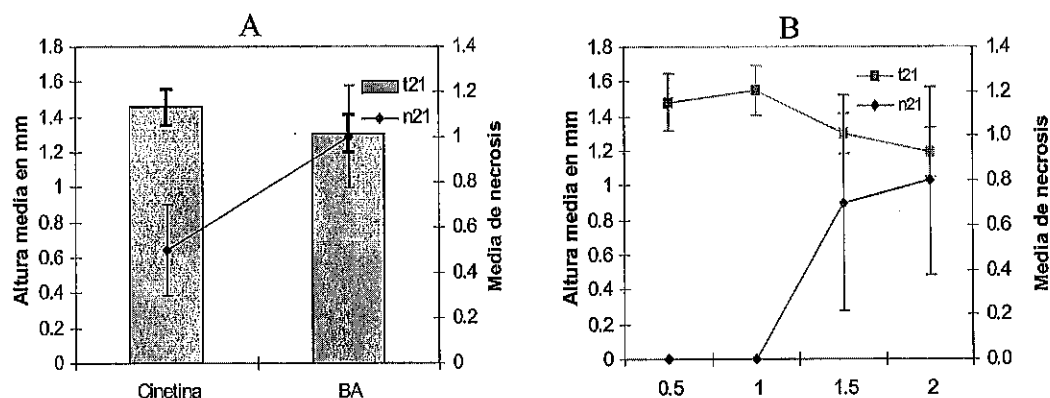


Figura 2. Comportamiento medio de la altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate después de 21 días de siembra por el tipo de regulador empleado (A) y la concentración empleada (B)

En los tejidos vegetales donde la necrosis no fue completa, se evaluó el grado de tejido necrosado por efecto de los componentes del medio de cultivo preparado para promover la formación de brotes nuevos o el crecimiento y desarrollo de los ápices como respuestas morfogénicas sobre ápices.

4.1.3 Tamaño de ápices A3.

En el caso de la obtención de plantas libres de virus, el tamaño del explante ha sido importante para lograr tal objetivo ya que el meristemo carece del tejido de conducción por cual se transportan los virus (Vine, 1968; Hurtado y Merino, 2000) en los ápices de cuachalalate se evaluó su tamaño y se encontraron diferencias estadísticas significativas en la altura y necrosis del explante después de 21 días de siembra (anexo cuadro 4A y 5A) tanto por tipo de vareta como por el tamaño del explante, obteniendo 1.8 mm de altura en ápices obtenidos de varitas gruesa en comparación con 1.4 mm de ápices obtenidos de delgadas, en tanto que ápices grandes alcanzaron 2.1 mm en

comparación con 1.1 mm de ápices pequeños (Figura 3). Sin embargo, sólo los ápices de varetas delgadas redujeron significativamente al daño por necrosis del tejido al 25.1 % del tejido en comparación con los ápices obtenidos de varetas gruesas que se necrosaron en una media de 48% del tejido; este ultimo tiene relación con la acumulación de sustancias en la corteza de los tallos ya que en ella se encuentra los canales resiníferos mencionados por Stern. (1952) los cuales exudaron sustancias como los fenoles (Mata *et al.* 1991) que al exponerse al aire por efecto de los cortes realizados en el tejido ocasionaron la necrosis. El necrosamiento se promovió al realizar los cortes en la base de los ápices durante el aislamiento de los mismos (Figura 3C) ocasionando el necrosamiento del meristemo -en la base del ápice- en los primeros 21 días de cultivo; la diferencia de alturas entre ápice grande y pequeño es atribuida a la mayor desarrollo de los primordio foliares en ápices grandes los cuales no se vieron afectados inicialmente como lo fue el meristemo que se encontraba más cercano a la base del explante.

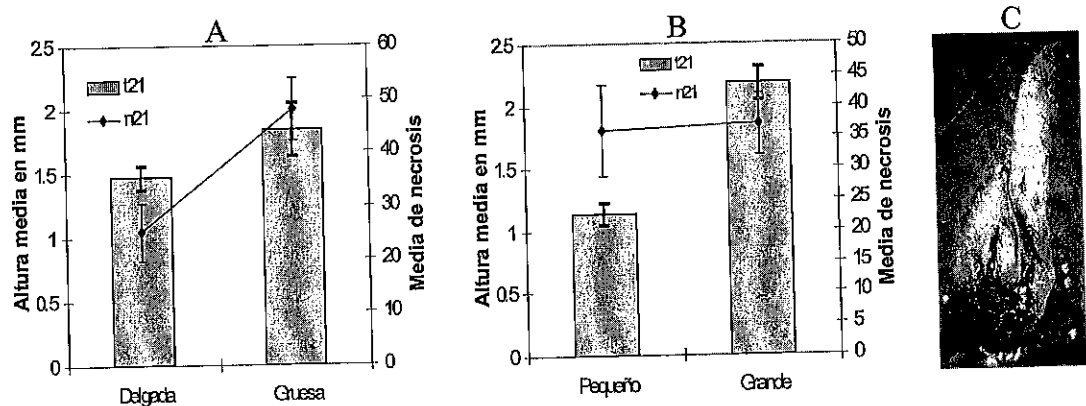


Figura 3. Comportamiento de la altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate después de 21 días de siembra por efecto del tipo de vareta (A), tamaño de explante (B), daño en base de ápice por cortes, afectando al meristemo (C).

4.1.4. Comparación de L-cys vs PVP en ápices A4

La adición de compuestos con actividad antioxidante como el PVP, la L-cys y la combinación de éstos permitió reducir significativamente la necrosis al 25% con PVP en comparación con no adicionarlo (88 % de necrosis), adicionar L-cys (56% de necrosis) ó combinarlo con L-cys (65% de necrosis) como se aprecia en la Figura 4, inclusive la reducción del necrosamiento fue similar a la observada por efecto de los ápices pequeños. Además, se logró una mayor altura de los ápices aunque estadísticamente los 2.9 mm de altura alcanzados por efecto del PVP fueron iguales con el resto de los tratamientos. Otro efecto interesante del PVP fue la reducción significativa de los exudados en el medio de cultivo (Figura 5, anexo cuadro 6A) tanto en profundidad (ale7) como en extensión horizontal (ene7) lo cual comprueba la capacidad del PVP como adsorbente de compuestos oxidables los cuales ven limitada su distribución en el medio de cultivo y su capacidad para oxidarse, permitiendo la absorción de los nutrientes en el medio por los ápices y un ligero incremento en altura que los demás tratamientos evaluados.

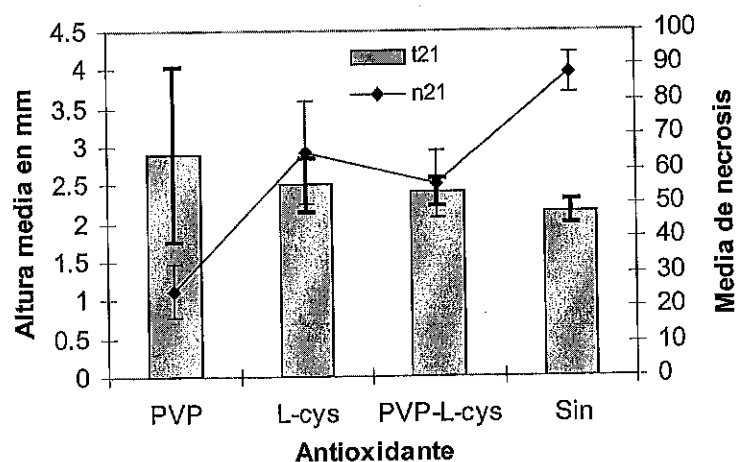


Figura 4. Comportamiento medio de la altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate a los 21 días de la siembra

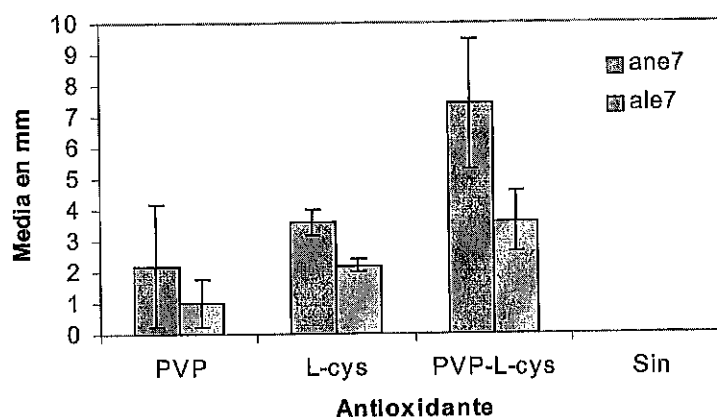


Figura 5. Comportamiento medio de la expansión de exudados en el medio de cultivo tanto horizontal como perpendicularmente al la superficie del medio de cultivo generados por ápices de cuachalalate a los 7 días de la siembra

La adsorción de las sustancias oxidantes en el medio de cultivo por el PVP redujo el daño sufrido por el tejido vegetal. Sin embargo, las sustancias susceptibles de oxidación en el tejido vegetal necrosaron al explante lo que se visualizó con un 88% del tejido cuando no se agregaron antioxidantes evaluados y con ello se redujo el crecimiento de los ápices en el tratamiento sin antioxidantes, por otra parte la L-cys y la combinación de ésta con PVP presentaron un crecimiento intermedio deduciendo que la L-cys no reduce la oxidación tanto como el PVP.

4.1.5. Coadyuvantes en ápices A5.

Otros compuestos orgánicos evaluados en ápices de cuachalalate no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellos como se muestra en la Figura 6 sobre la altura media alcanzada por los ápices y el daño en el tejido, inclusive han sido menos prometedores que la acción del PVP sólo (Figura. 5, 6 y anexo cuadro 7A) ya que

presentan más del 40% de tejido dañado en la media aritmética para dicha variable, sólo CH presentó permitió 3.4 mm de altura y redujo la necrosis del tejido al 42%.

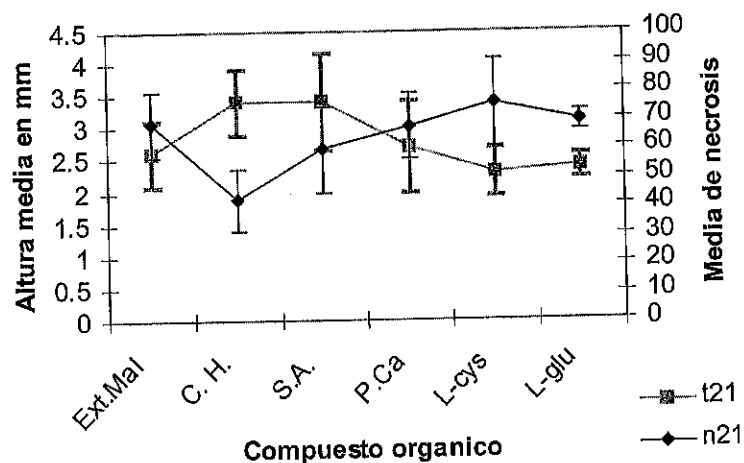


Figura 6. Comportamiento de altura (t21) y necrosis (n21) en ápices de cuachalalate después de 21 días de la siembra

4.1.6. PVP en ápices A6.

El uso del PVP y el tipo de vareta permitieron reducir significativamente el porcentaje de daño en el tejido en evaluaciones anteriores, por lo que se combinaron dichos factores para reducir el daño al tejido vegetal por necrosamiento e incrementar el desarrollo de los ápices (Figura 7C); en la Figura 7 ni el tipo de vareta ni la concentración aplicada de PVP permitió diferenciar respuestas estadísticamente diferentes en los ápices tratados, sin embargo, el comportamiento de necrosis por efecto del tipo de vareta fue similar al presentado en la Figura 3. Aunque el porcentaje de necrosis se incrementó, siendo atribuido este efecto a la fecha de colecta del material vegetal.

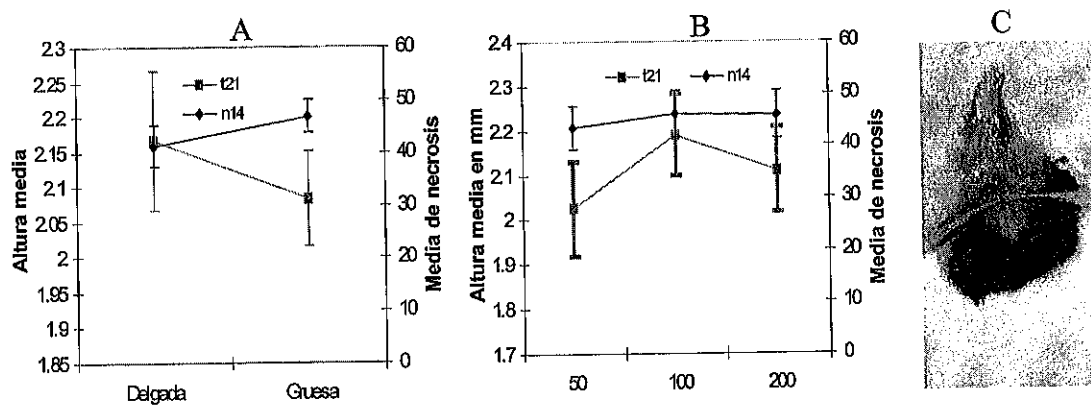


Figura 7. Comportamiento de la altura (t21) y necrosis (n14) en ápices de cuachalalate después de 21 y 14 días de cultivo respectivamente por efecto del tipo de vareta (A), concentración de PVP en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ usada (B) y ápice con control de necrosis con $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de PVP (C).

4.1.7. BA vs 2ip en ápices A7.

En la evaluación de 2ip y BA sobre ápices de cuachalalate, la diferencia de altura de ápices tratados con 2ip (2.15mm) fue significativamente diferente de la altura alcanzada por los ápices tratados con BA (1.68 mm), no obstante no se presentaron diferencias en la media de porcentaje tejido necrosado por efecto de las citocininas aplicadas (cuadro 8A y 9A) aunque BA causó ligeramente más daño como se muestra en la Figura 8.

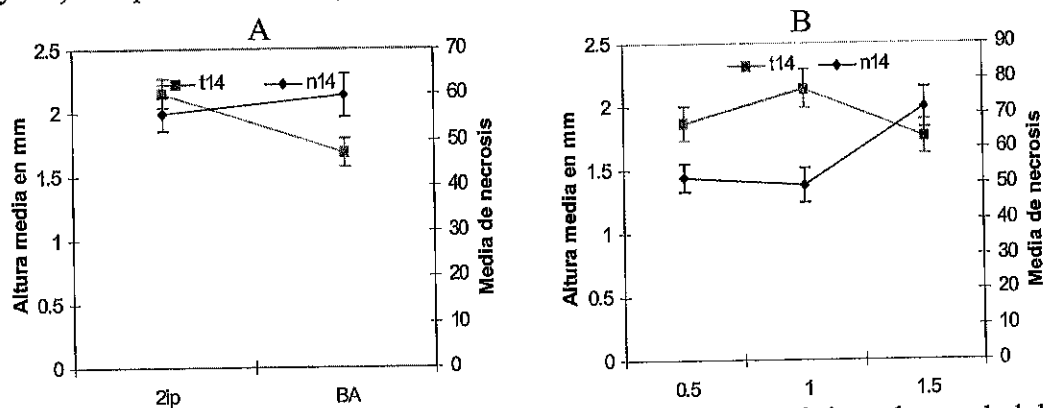


Figura 8. Comportamiento de la altura (t14) y necrosis (n14) en ápices de cuachalalate después de 14 días de siembra por efecto del regulador (A) y concentración empleada (B).

El comportamiento del necrosamiento en los tejidos presentó diferencias significativas entre la concentración más alta de citocinina con 71.6 % del tejido necrosado a la que

fueron expuestos los ápices en comparación con las concentraciones bajas que ocasionaron el 49.8 y 51.7 % de tejido necrosado. Sin embargo, no se tradujo en diferencias estadísticas significativas en la altura alcanzada por los ápices (cuadro 9A).

4.1.8. Coadyuvantes 2 en ápices A8.

Otros compuestos empleados para reducir el necrosamiento de tejido han sido evaluados en su efecto sobre la altura de ápices y el porcentaje de tejido necrosado, siendo en la Figura 9 donde podemos apreciar las diferencia entre dichos tratamientos.

De los resultados obtenidos fue estadísticamente diferente la reducción del porcentaje de tejido necrosado (38.5 %) en los explantes tratados con Fluoroglucinol que con los otros dos compuestos (66 y 77.7 %) y en altura los ápices fueron de 1.48 mm en fluoroglucinol que fue estadísticamente igual a 1.3 mm alcanzados por ápices en p-amino benzoico, pero estadísticamente diferente al compararlos con pyrogallol que se mantuvieron en el tamaño inicial de 1 mm; por otro lado (cuadro 10A), las concentraciones de los antioxidantes evaluados no presentó diferencias. Estas pequeñas diferencias como en las evaluaciones anteriores fueron insuficientes ya que en las transferencias sucesivas los ápices terminaban por necrosarse completamente evitando obtener plántulas de este tipo de explante.

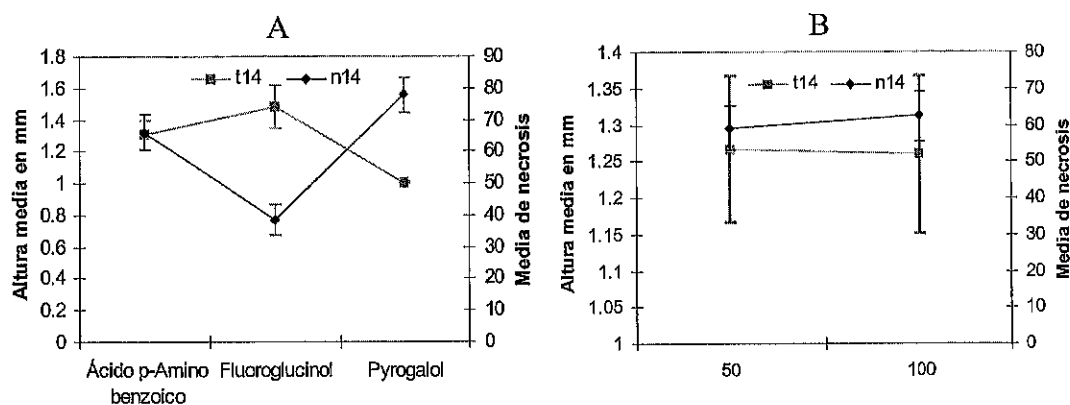


Figura 9. Comportamiento de la altura (t14) y necrosis (n14) en ápices de cuachalalate después de 14 días de siembra por efecto del antioxidante (A) y concentración empleada en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2. De experimentos de hojas como explantes.

En todas las evaluaciones de hojas no se apreció contaminación, lo cual indica que el manejo de la planta madre con agrimicin y captan a $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y fue adecuado para evitar el problema.

4.2.1. Posición del explantes de hojas H1.

Fue altamente significativo el efecto posición del explante en el medio de cultivo sobre el daño del tejido foliar (Figura. H1, cuadro 11A) ya que al evitar el contacto directo del envés del explante con el medio de cultivo se logró reducir a tan sólo 14% la superficie necrosada en comparación con el 94% de tejido necrosado con el envés en contacto directo con el medio de cultivo; siendo, los compuestos orgánicos como los fenoles los que se oxidan se infiere que en el haz de la hoja existe una mayor concentración de compuestos que promueven un rápido necrosamiento del tejido. Sin embargo, al estar el haz en contacto con el medio de cultivo dicho oscurecimiento se reduce significativamente debido a la presencia de antioxidantes en el medio de cultivo

que interactúan con mayor facilidad con dichos compuestos por estar mas cerca, reduciendo la necrosis del tejido.

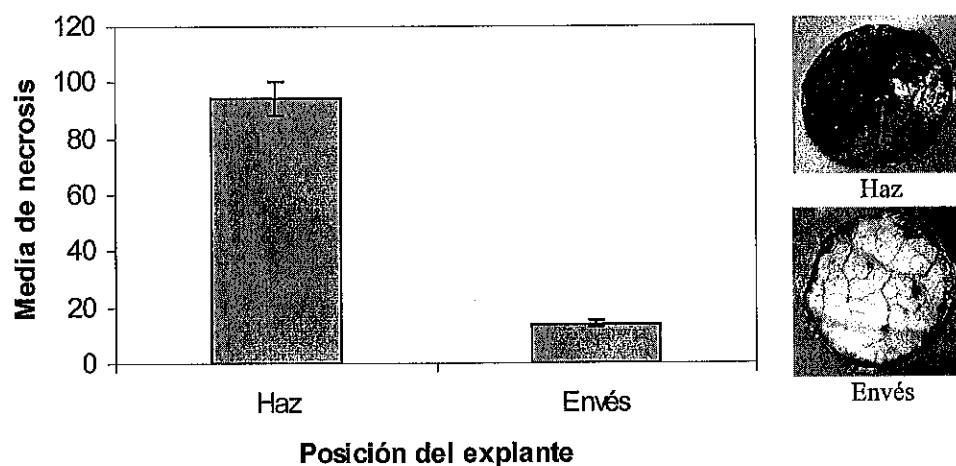


Figura 10. Comportamiento del daño en explantes foliares de cuachalalate por efecto de la posición del explante, 14 días después de la siembra.

4.2.2 Posición del explante de hojas H2.

Cuando se evaluó nuevamente el efecto de la posición del explante en el medio de cultivo sobre la necrosis, fue altamente significativa la diferencia entre el envés (11 %) y el haz (90.4%) (anexo cuadro 12A), de la necrosis en la posición vertical, (Figura. H2). De lo anterior se infiere que se deben estar generando un exceso de radicales libres (ROS) inducidos por el daño ocasionado al momento del corte (Slater *et al.* 2003) que al asociarse con la presencia de fenoles y flavonas del cuachalalate (Wannan y Quinn, 1988; Mata *et al.* 1991) ocasionan el necrosamiento del tejido. En cualquier caso el daño apreciado por el necrosamiento del tejido foliar (Figura 10) disminuyó la capacidad del tejido en la formación de callos a menos de 0.4 callos por explante (Figura 10 y 11.).

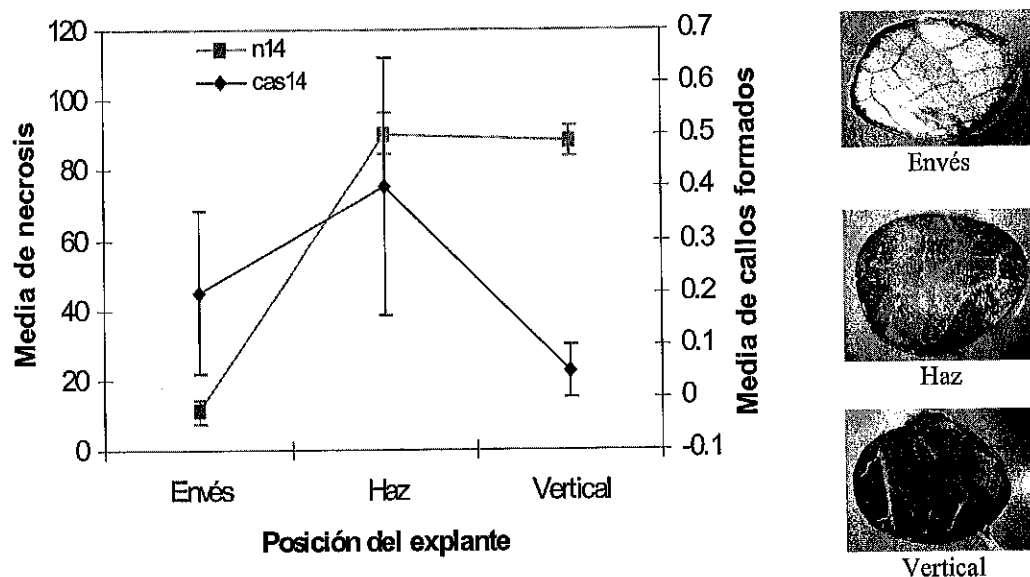


Figura 11. Comportamiento de necrosis (n14) y formación de callos (cas14) en discos foliares de cuachalalate, 14 días después de la siembra

4.2.3 Luz vs oscuridad en hojas H3.

En la Figura H3A se puede apreciar el significativo efecto de la luz sobre explantes foliares al necrosar el 70.7 % de la superficie del explante, en comparación el 25% de la superficie necrosada de los colocados en oscuridad ambos en posición haz (cuadro 13A) que en evaluaciones anteriores mostró ser la más afectada, por ello se infiere que es la luz un factor importantísimo involucrado en la degradación de compuestos dentro del tejido vegetal, los cuales están involucrados en el necrosamiento del tejido (Badui, 1984; Bhat y Chandel, 1991; Kishima *et al.* 1991; Moumou *et al.* 1992.; Slater *et al.* 2003) Contrariamente al efecto de la luz sobre el daño del tejido, la eliminación de la luz permite una mejor formación de callos aunque sin diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0.05$).

El efecto de la luz sobre la mayor o menor presencia de exudados en el medio de cultivo y sobre la coloración de los mismos fue limitada y no significativa (Figura 12C). Sin embargo, los exudados tienden a ser ligeramente más oscuros y menos dispersos en el medio en presencia de luz y menos oscuros y más dispersos en la oscuridad por lo que dicha tendencia esta relacionada con el fenómeno de la foto oxidación de compuestos (Salysburi y Ross, 1996)

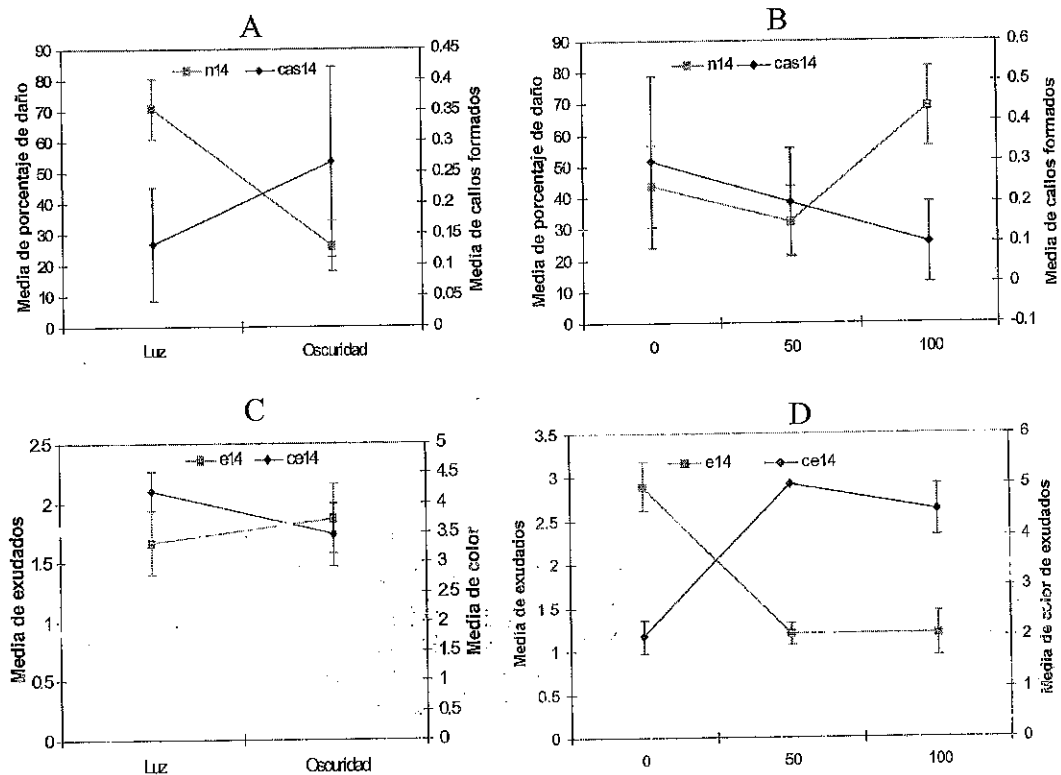


Figura 12. Comportamiento de necrosis (n14), callos formados (cas14) [A,B], exudados en el medio (e14) y color de exudados (ce14) [C,D] por efecto de bloques -luz, oscuridad- [A,C] y concentración de sales MS-0,50 y 100 %- [B,D]

Otro efecto analizado fue la cantidad de sales en el medio de cultivo, ya que en reportes sobre el establecimiento de especies leñosas se ha tenido éxito al diluir las sales del medio de cultivo MS al 50% o bien empleando medios con menor contenido de sales (Nair *et al.* 1984; Biedermann, 1987); en la evaluaciones realizadas se logró apreciar que

la reducción de las sales al 50% redujo el daño en el tejido aunque no de manera estadística ($\alpha \leq 0.05$) y una tendencia a reducir la capacidad del tejido foliar a la formación de callos conforme se incrementa la cantidad de sales en el medio de cultivo. Sin embargo, la gran variación en los resultados dentro de cada tratamiento no permitió establecer diferencias estadísticas ($\alpha \leq 0.05$) entre tratamientos que consolidaran la tendencia. Lo que si ha sido marcado es la reducida capacidad del tejido foliar para formar callos.

Donde se encontraron diferencias estadísticas significativas ($\alpha \leq 0.05$) fue en la evaluación la cantidad de exudados en el medio y la coloración de éstos por efecto de la concentración de las sales inorgánicas del medio de cultivo MS. La mayor presencia de exudados en el medio de cultivo se ubicó en medios con menor concentración de sales siendo el medio sin sales el que presentaba más exudados, seguido del medio con sales al 50% y después por el de 100%, y en conjunto con la mayor coloración de exudados en los medios con sales al 50 y 100% de sales en comparación con el medio con sales al 0% se infiere que las sales en el medio de cultivo inducen la oxidación de las sustancias y que una vez oscurecida (oxidada) se reduce la capacidad de los exudados para dispersarse en el medio de cultivo (Figura 12D). Se sustenta la información anterior con los trabajos de estrés oxidativo, donde altas concentraciones de sales en el suelo induce a la planta a la formación de especies reactivas de oxígeno o ROS por sus siglas en inglés (Slater *et al.* 2003), las cuales a su vez pueden inducir a la enzima Fenilalanina amonialiaca la cual permite o fomenta la síntesis de fenoles los cuales son fácilmente oxidados y transformados en sustancias coloridas (Walker, 1975, McClude, 1979;

Badui, 1984; Treutter *et al.* 2001); otra explicación más sencilla al necrosamiento de los tejidos es el hecho de que el tejido de antemano contenga las sustancias oxidables en grandes cantidades que podrían ser para el caso del cuachalalate los fenoles relativos a los ácidos anacárdicos (Mata *et al.* 1991) los cuales al entrar en contacto con las sales en el medio de cultivo se oxidan dando las coloraciones oscuras de los exudados.

4.2.4 Carbón activado en hojas H4.

La aplicación de carbón activado promovió la formación de raíces (rizogénesis) a partir de explantes con formación de callo (Figura 13B) marcando diferencias estadísticas significativas ($\alpha \leq 0.05$, cuadro 25) con los medios sin carbón activado. Los explantes en donde no existió la presencia de 2,4-D no formaron raíces y conforme se redujo la concentración del 2,4-D de 0.5 a 0.1 se indujo ligeramente más raíces por explante (Figura 13A), siempre en presencia del carbón activado. Por lo que el carbón activado absorbió los compuestos causantes del oscurecimiento (Pierik, 1990; Bhat y Chandel, 1991) y con ello permitió la inducción de raíces en los explantes que presentaron formación de callo.

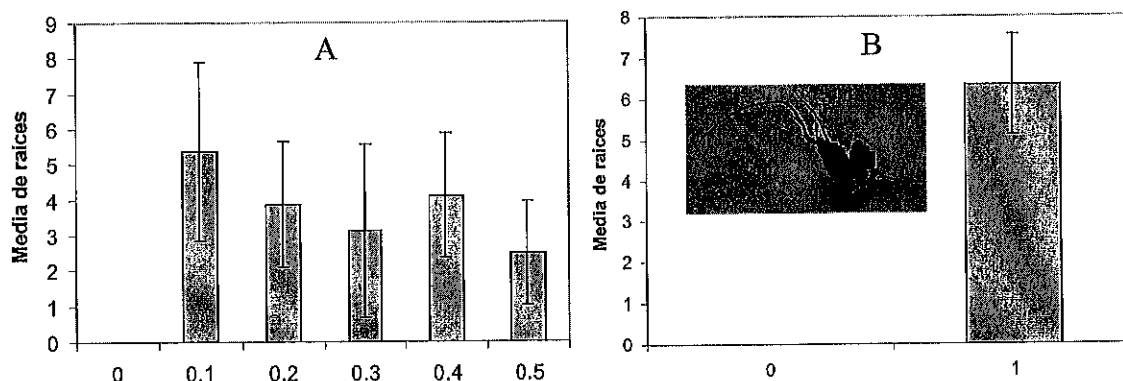


Figura 13. Formación de raíces en explantes foliares de cuachalalate inducidos a callo por efecto de tratamiento de inducción -2,4-D en mg·L⁻¹-(A) y la aplicación de carbón activado (B), a los 21 días de cultivo.

4.2.5. Auxinas en hoja H5.

El 2,4-D incrementó el peso fresco medio del callo a 48.3 mg, seguido de ANA y finalmente por AIA el cual tan sólo logró 18.4 mg como se aprecia en la Figura 14. Al incrementar la concentración de las auxinas de 0.5 a 5 mg·L⁻¹ el peso del callo de incrementó de 35.9 a 119.2 mg y al incrementar la concentración a 10 mg·L⁻¹ el peso de callo callo a 84.6 mg siendo esta disminución una baja por la elevada concentración que altera drásticamente la formación de callo y la cantidad de peso fresco. Todas las auxinas y sus concentraciones evaluadas ocasionaron diferencias estadísticas (Cuadro 16A y 17A)

Interesante es el comportamiento del porcentaje medio de tejido necrosado ya que éste se incrementó gradualmente conforme lo hizo la concentración del regulador y en igual forma descendió en la concentración más alta; ya que hasta las evaluaciones anteriores, el porcentaje de daño era menor al 27% al conjuntar la posición del explante en envés y reducir la concentración de las sales en el medio de cultivo al 50%, agregar extracto de malta y antioxidantes. Sin embargo, en esta evaluación, aun y con todo lo anterior, al incrementar de las auxinas se incrementó el porcentaje de necrosamiento y el peso fresco de callo, lo que significa que el fenómeno de daño está relacionado con el crecimiento, lo que es un tanto paradójico ya que si queremos inducir un crecimiento acelerado también estaremos incrementando el daño en el tejido. Por lo que es necesario entender mejor las causas del oscurecimiento y poder disminuir el daño sobre el tejido vegetal a propagar.

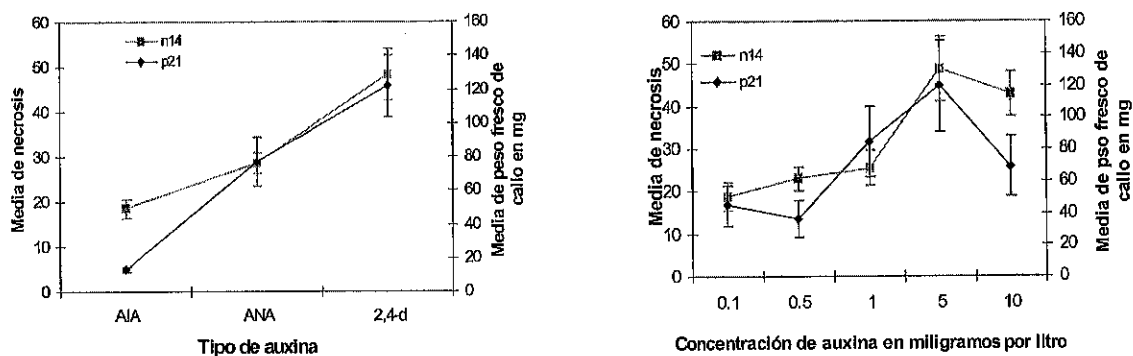


Figura 14. Comportamiento del daño y peso fresco de callo en explantes foliares de cuachalalate después de 14 y 21 días de siembra, por efecto del tipo de auxina empleada y la concentración

4.2.6. Citocininas en hojas H6.

Estadísticamente, ninguna auxina disminuyó significativamente el porcentaje de tejido necrosado en comparación con el BA (Figura 15, anexo cuadro 18A) al pasar de 12.6 a 22.8 el área media necrosada del explante por emplear 2ip y BA, respectivamente. A diferencia con las auxinas en dónde conforme se incrementaba la concentración de éstas, se incrementaban positivamente tanto el peso de callo como el daño (Figura 15), en las citocininas, el menor necrosamiento de tejido en concentraciones de 0.5 a 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (11.46, 14.3 y 15.4) logró más peso fresco de callo (25.3, 20 y 25 mg) aunque sin diferencias estadísticas significativas entre el tipo de citocininas y la concentración empleada con un alfa de 0.05 ver Figura H6.

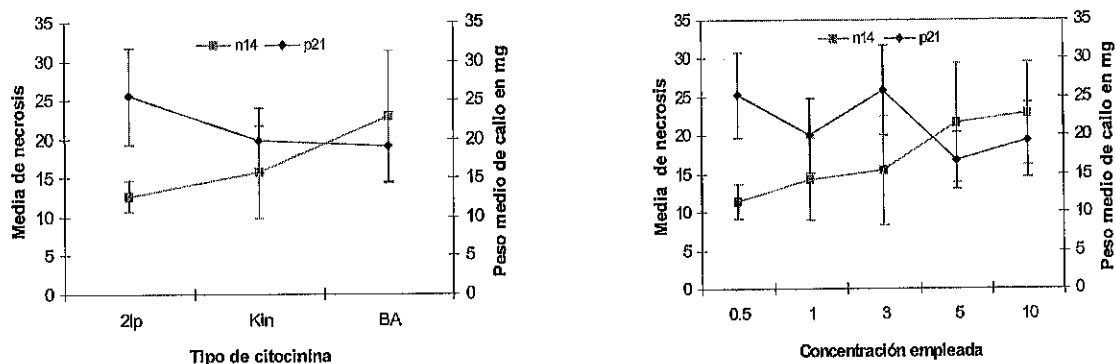


Figura 15. Comportamiento de necrosis (n14) y peso fresco de callo (p21) en explantes foliares de cuachalalate después de 14 y 21 días de siembra, por efecto del tipo de citocinina empleada y la concentración

4.3. De Semillas como explantes

4.3.1 Semillas germinadas en condiciones *ex vitro*

En la germinación de semillas *ex vitro*, se aprecia que el 15% de los frutos presentaron germinación (Figura 16A) el cual es mucho menor al porcentaje reportado por Zarate (1984) y sería aún más bajo al considerar que los frutos de cuachalalate pueden tener mas de una semilla por fruto (Pennington y Saraukhán, 2006), lo cual fue comprobado ya que en uno de los frutos de cuachalalate evaluados se obtuvieron dos plantas (Figura 16B y C), además, cuando los frutos sin germinar fueron analizados se encontró 116 semillas (de los 99 frutos evaluados) con cotiledones (Figura 17) las cuales representan las semillas con potencial de germinar.

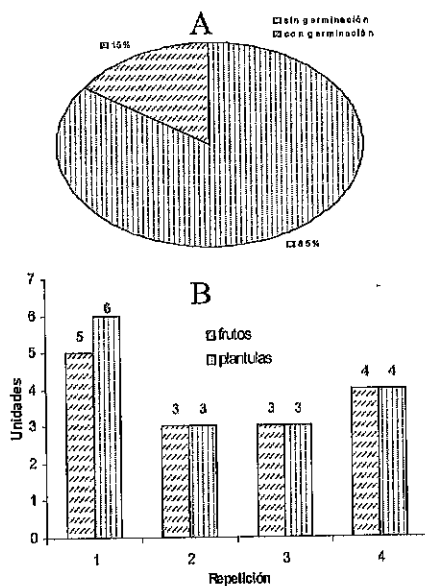


Figura 16. Germinación de semillas en frutos de cuachalalate, A) Porcentaje de frutos germinados, B) Plántulas obtenidas de frutos germinados por repetición, C) Dos plántulas por fruto.

Ya que ésta especie tiene la posibilidad de formar hasta 4 semillas por fruto (Figura 17) mencionadas como posibles, que solo 2 semillas de cada fruto tienen la posibilidad de formar una semilla con estructuras de reserva las cuales germinen, el hecho de encontrar más de una plántula por fruto y obtener menos plántulas implica la existencia de problemas no descritos en la investigación de Zarate (1984), problemas que tienen que ver con la disminución de la capacidad de germinación, como son: los factores ambientales adversos durante la formación de la semilla, problemas de incompatibilidad en la polinización, presencia de protandria o protoginia o inclusive de falta de manejo o cuidado para lograr la mayor germinación (Hartman y Kester, 1995).

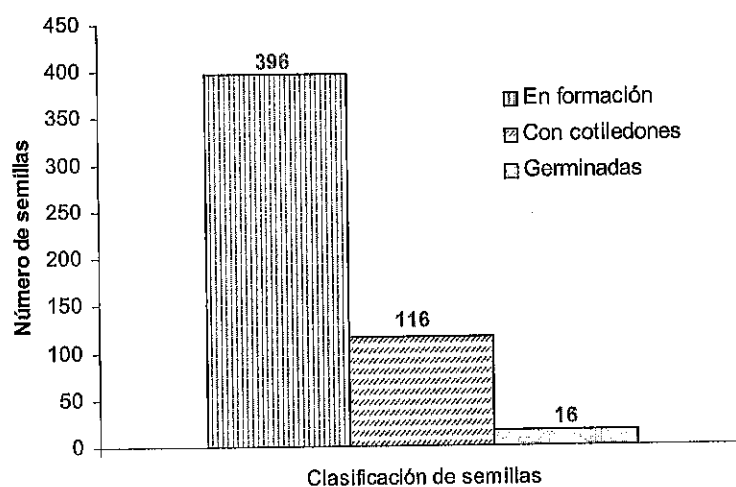


Figura 17. Calidad de semillas en frutos de cuachalalate.

El reducido 16% de germinación de frutos mostrado en la Figura S2, se ha asociado a dificultades para germinar en las semillas de los frutos por la deficiente acumulación de reservas en las semillas toda vez que existen 4 semillas por fruto para formarse y menos

de la mitad formó los cotiledones, lo cual es factible al considerar el exceso de demanda generada por las semillas posibles a formar y el restrictivo ambiente de la selva baja caducifolia en que se distribuye el cuachalalate, y que presenta un periodo prolongado de sequía, limitando la disponibilidad de agua necesaria para mantener activo al aparato fotosintético el cual año tras año es eliminado para soportar dicho estrés, además de crecer en suelos delgados y calcáreos como se apreció al momento de la colecta del material vegetal.

4.3.2. Semillas germinadas en condiciones *in vitro*.

En la evaluación de semillas expuestas a hipoclorito de sodio la cual fue la primera evaluación de semillas establecidas *in vitro*, se apreció una frecuencia de contaminación no menor del 80% y germinación nula de semillas (anexo cuadro 19A) de lo cual se infiere la existencia de un problema de contaminación de origen endógeno la cual incidió a la vez en la nula germinación.

En la evaluación semillas expuestas a H_2O_2 . La reducción de la contaminación y el porcentaje de plántulas formadas conforme se incrementó el tiempo de exposición al H_2O_2 (anexo cuadro 20A) descarta al H_2O_2 como agente desinfectante por no reducir la contaminación significativamente aun con el mayor tiempo de exposición (anexo cuadro 20A) y por reducir la germinación conforme se incrementó el tiempo de exposición.

En el análisis de semillas expuestas a hipoclorito de sodio vs hipoclorito de calcio no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos de desinfectación

con hipoclorito de calcio para contaminación, plántulas formadas, ni otra variable evaluada por lo que tampoco se considera un buen agente desinfectante al $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ por no reducir la contaminación, pero más aún por reducir la germinación. (anexo cuadro 21A).

El análisis de la intensidad de contaminación en la evaluación de integridad física de semillas demostró diferencias estadísticas significativas debidas al tipo de medio de cultivo empleado sobre la intensidad de la contaminación en el medio de cultivo y al daño en las semillas ya que permitió la salida del agente contaminante al medio de cultivo lo cual generó 2.53 de intensidad de contaminación en comparación con semillas sin daño que no facilita la salida del agente contaminante al medio por lo que el desarrollo de éste se ve limitado en el mismo y tan sólo generó 1.73 de intensidad de contaminación lo cual marcó una diferencia estadística mediante la prueba de Kruskal-Wallis y apreciable en el anexo cuadro 22A, acorde con lo anterior, la contaminación mas intensa se encontró en los medios mas ricos en nutrientes (sales al 50 y 100%) al generar 2.8 y 2.2 en la media de intensidad de contaminación del medio de cultivo, en tanto que en el medio mas pobre en nutrientes (sales al 0% de sales) tan sólo generó 1.4 de media de contaminación siendo coherentes los resultados dada la disponibilidad de nutrientes para el agente contaminante (anexo cuadro 23A).

La elevada frecuencia en la germinación de semillas apreciada en los cuadro 5 y 6 se puede interpretar como un elevado potencial de las semillas para formar una plántula ya que no todas alcanzaron a formar una planta nueva. La integridad de la semilla mostró

diferencias significativas sobre la germinación y el porcentaje de plántulas formadas, siendo mejor emplear semillas íntegras en lugar de dañadas durante el procedimiento de aislamiento; en semillas sin daño (íntegras) se logró germinar 25 semillas y formar 18 plántulas de 30 semillas sembradas (Figura 18) en comparación con 18 semillas germinadas y 3 plántulas formadas de las 30 semillas con daño (Cuadro 5)

Cuadro 5. Comportamiento medio de la germinación y plántulas formadas por efecto de la integridad física de la semilla en semillas cuachalalate sembradas *in vitro*

Integridad física	Germinación		Plántulas formadas	
	Fre.*	Media	Fre.	Media
Sin daño	25	2.50 ± 0.20 a	18	0.60 ± 0.09 a
Dañada	18	1.80 ± 0.27 b	3	0.10 ± 0.05 b

*Fre.= Frecuencia, medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$).

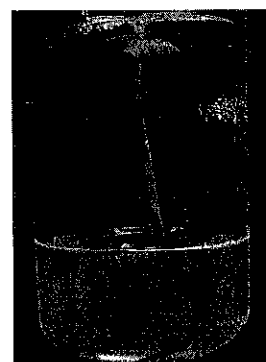


Figura 18. Plántula formada de semillas sin daño.

Por otro lado, la menor cantidad de plántulas formadas respecto al total de semillas germinadas tienen relación negativa con la contaminación de -0.2530 ($\alpha = 0.0511$) y con la intensidad de contaminación de -0.40023 ($\alpha = 0.0015$) debiéndose esta relación negativa en parte a la competencia por los nutrientes disponibles en el medio de cultivo (Cuadro 6) entre el agente de contaminación y el eje embrionario de la semilla, siendo notable que a mayor disponibilidad de nutrientes existe una mayor intensidad de contaminación y una menor cantidad de plántulas formadas (Cuadro 6)

Cuadro 6. Comportamiento medio de la germinación y plántulas formadas *in vitro* por efecto del medio de cultivo en semillas cuachalalate.

Tratamiento Sales MS (%)	Germinación		Plántulas formadas	
	Frecuencia	Media	Frecuencia	Media
0	14	2.10 ± 0.31 a	10	0.50 ± 0.11 a
50	16	2.40 ± 0.27 a	8	0.40 ± 0.11 a b
100	13	1.95 ± 0.32 a	3	0.15 ± 0.08 b

Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$)

En la evaluación de preaislamiento de semillas, el efecto de preaislar la semillas sin daño no fue notable, siendo estadísticamente igual la frecuencia de contaminación de las unidades experimentales (Cuadro 7, anexo cuadro 24A) tanto en semillas preaisladas como sin preaislamiento por lo que no es importante preaislar las semillas. Sin embargo, sí fue importante preaislar para reducir la intensidad de contaminación y dar una ligera ventaja a las semillas para formar una plántula como lo fue la ventaja dada a las semillas por utilizarlas sin daño (Cuadro 5)

Cuadro 7. Comportamiento medio de la contaminación *in vitro* a los 7 días de la siembra por efecto del preaislamiento de semillas de cuachalalate.

Preaislamiento	Contaminación		Intensidad de contaminación
	Frecuencia	Media	Media
No preaisladas	30	1.00 ± 0.00 a	2.43 ± 0.15 a
Preaisladas	28	0.93 ± 0.05 a	1.73 ± 0.22 b

Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$).

El efecto de la concentración del medio de cultivo empleado sobre la intensidad de contaminación presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos (Cuadro 8, anexo cuadro 25A) y al igual que las diferencias mostradas en intensidad de contaminación por efecto de la concentración del medio de cultivo presentado en la evaluación de semillas con y sin daño las concentraciones de 50 y 100% de sales presentaron la mayor intensidad de contaminación, en tanto que las sales al 50% tan sólo permitieron una media de 1.35 en intensidad de contaminación; (anexo cuadro 24A y 25A)

Cuadro 8. Comportamiento de la contaminación *in vitro* a los 7 días de la siembra por efecto del medio de cultivo en semillas cuachalalate.

Tratamiento Sales MS (%)	Contaminación		Intensidad de contaminación
	Frecuencia	Media	Media
0	18	0.90 ± 0.07 a	1.35 ± 0.20 b
50	20	1.00 ± 0.00 a	2.20 ± 0.24 a
100	20	1.00 ± 0.00 a	2.70 ± 0.19 a

Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$)

La presencia de microorganismos endógenos en tejido vegetal es posible ya sea como organismos fitopatógenos cuando la planta presenta síntomas de enfermedad, o bien en una asociación simbiótica como en el caso de frijol en donde la bacteria del género *Rizobium* permite a la planta obtener nitrógeno orgánico a partir del nitrógeno atmosférico a través de la fijación biológica realizada por la bacteria (Agrios, 2001; Salisbury y Roos, 1996). En el caso del cuachalalate se ha repetido en cada uno de los experimentos realizados una elevada frecuencia de semillas con contaminación la cual ha sido en su mayoría por bacterias no fitopatógenas, toda vez que la identificación de

los géneros *Klebsiella*, *Pantonoa* y *Gluconobacter* en las colonias bacterianas de las semillas forman parte de la microflora natural de plantas y aun existiendo la contaminación en el medio de cultivo las plantas pueden desarrollarse; siendo solamente la intensidad de contaminación mayor cuando se disminuye la posibilidad de obtener una planta a causa de la competencia por el medio de cultivo. La competencia por el medio de cultivo entre semillas en germinación y las bacterias fue patente, ya que conforme se incrementa la concentración de sales en el medio de cultivo se tuvo una mayor disposición de nutrientes que un microorganismo puede emplea para disparar su ciclo de vida el cual es muy corto en microorganismos que en plantas.

La evaluación de germinación de semillas después de 7 días en semillas parcialmente aisladas vs no preaisladas no presentó diferencias estadísticas significativas como lo muestra el Cuadro 9, no obstante, semillas que fueron preaisladas dos meses antes presentaron más germinación a aquella semillas no preaisladas, causando el aislamiento previo deshidratación externa de la semillas y de bacterias lo cual debió inactivar bacterias de las semillas del bloque de semillas preaisladas permitiendo una mayor germinación y formación de plántulas que en semillas no preaisladas.

Cuadro 9. Comportamiento de germinación y plántulas formadas *in vitro* a los 7 días de la siembra por efecto del tipo de preaislamiento de semillas de cuachalalate.

Preaislamiento	Germinación		Plántulas formadas	
	Frecuencia	Media	Frecuencia	Media
No preaisladas	24	2.40 ± 0.22 a	15	0.50 ± 0.09 a
preaisladas	25	2.50 ± 0.21 a	18	0.60 ± 0.09 a

Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$)

Los tratamientos aplicados a las semillas preaisladas mantuvieron la tendencia de incrementar la formación de plántulas cuando se disminuye la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo, Sin embargo, fueron estadísticamente iguales tanto en germinación como en la formación de plántulas.

Cuadro 10. Comportamiento de germinación y plántulas formadas *in vitro* a los 7 días de la siembra por efecto del medio de cultivo en semillas cuachalalate.

Tratamiento	Germinación		Plántulas formadas	
	Frecuencia	Media	Frecuencia	Media
Sales MS (%)				
0	18	2.70 ± 0.21 a	15	0.75 ± 0.10 a
50	16	2.40 ± 0.28 a	10	0.50 ± 0.11 a
100	15	2.25 ± 0.30 a	8	0.40 ± 0.11 a

Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$)

4.4. DE YEMAS AXILARES COMO EXPLANTES.

En los resultados de las evaluaciones realizadas, la presencia de contaminación fue nula por lo que no se reporta. La media aritmética de yemas brotadas por efecto de la

concentración porcentual de las sales MS en los medios empleados no presentaron diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, la brotación de yemas en medios con sales al 50% fue ligeramente mayor (69.4%) a la brotación de yemas en medios con el 100% de sales (68%) al calcular la media entre los tres tratamientos en cada concentración de sales de la Figura 19. Al considerar el porcentaje de yemas brotadas por efecto de la concentración de BA se puede apreciar en la Figura 19 que concentraciones menores a $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ promueven un poco mas la brotación de yemas que la concentración de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sin embargo dichas diferencias no fueron estadísticamente diferentes

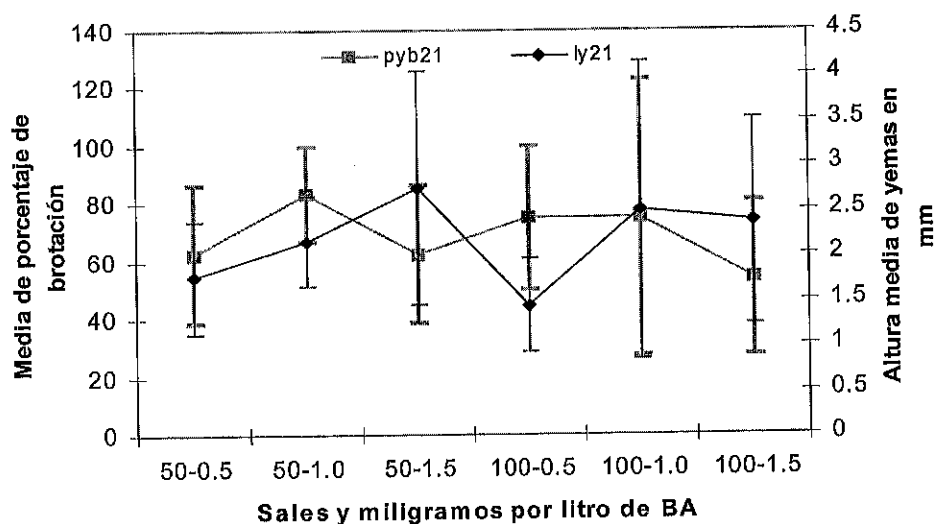


Figura 19. Efecto de la concentración de medio MS y BA en la brotación y crecimiento de yemas axilares

La longitud de yemas por efecto de BA en a concentración de sales al 50% fue mayor conforme se incremento la concentración de este y una situación ligeramente similar ocurrió en los medios con sales al 100%, por ende las concentraciones de BA no

estimula significativamente ni la inducción de yemas axilares ni la longitud de las yemas que se inducen a brotación

En el caso de yemas tratadas únicamente con zeatina en medio de cultivo con el 50% de las sales MS se encontraron diferencias estadísticas logrando superar el 90% de brotación de yemas en tratamientos con 3 y 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la longitud de las yemas brotadas fue superior en la yemas tratadas con 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, comparadas con las concentraciones menores Figura 20 (anexo cuadro 26A).

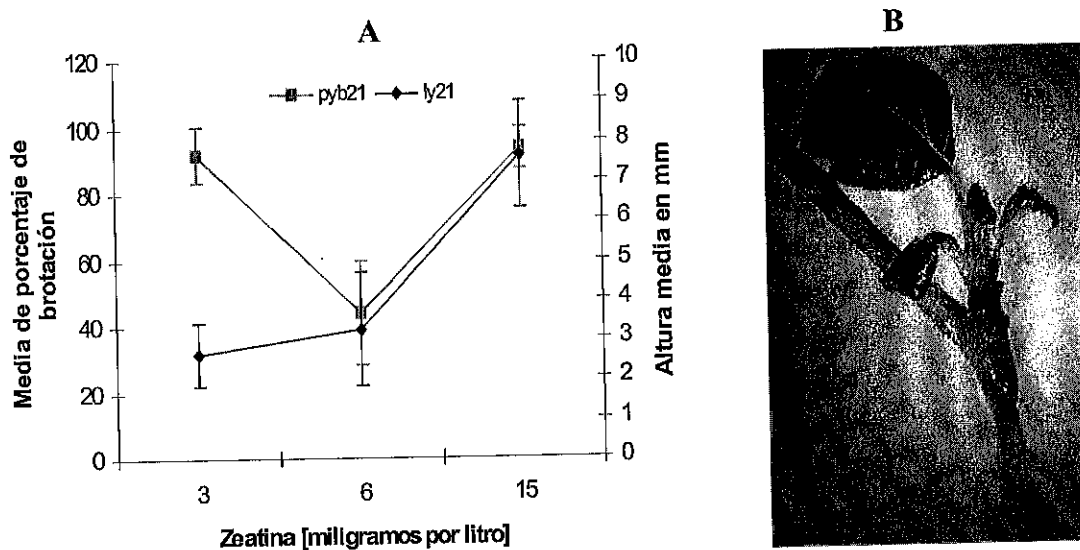


Figura 20. Efecto de la concentración de zeatina en la brotación (A) y crecimiento de yema axilar (B)

Comparativamente con el porcentaje de yemas brotadas y la altura de las mismas en los tratamientos con BA y Zeatina, la brotación y altura de yemas fue menor en BA y aunque el BA es un regulador vegetal sintético y mucho mas activa que la zeatina la

cual se encuentra en los tejidos vegetales (Jankiewicz, 2003), La zeatina mejoró la brotación de las yemas axilares *in vitro*.

En trabajos realizados por Onay (2000), Martin (2002) y Sansberro *et al.* (2003) la mejor brotación de yemas axilares se logro empleando BA a concentraciones de 1, 2 y 2.25 mg·L⁻¹ en comparación con Zip y cinetina a las mismas concentraciones. Sin embargo, la mejor respuesta sobre la media del porcentaje de yemas brotadas en el trabajo realizado de brotación de yemas se logró en las evaluaciones de zeatina, la cual, en el caso de cuachalalate tienen una mejor actividad que BA siendo esto atribuible a la degradación o inactivación del BA por unirse a moléculas de glucosa u otros compuestos, en tanto zeatina es posible que no presente dicho problema o bien la zeatina presenta una mejor estimulación de la brotación y alargamiento de las yemas por encontrar mejor afinidad con los receptores celulares (Jankiewicz, 2003)

4.5. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Es característico encontrar en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (RMN de ¹H) del 3α-hidroxiasticadienónico (AHM) 4 señales 6.1, 5.3, 3.5 y 1.9 ppm correspondientes a los hidrógenos H24, H7, H3 y del Metilo Me27, los cuales son básicos para determinar la presencia del compuesto en la solución analizada; de tal forma que, de los extractos obtenidos y analizados de placas raspadas que eluyeron a la misma altura que la referencia pura, podemos decir lo siguiente.

En corteza del árbol 1 (Figura 21) se encuentra presente el AHM, encontrarse en el espectro de RMN de ^1H sus 4 señales características, no obstante que en hojas del mismo árbol la señal en 5.3 ppm no se aprecia, las otras tres señales están presentes.

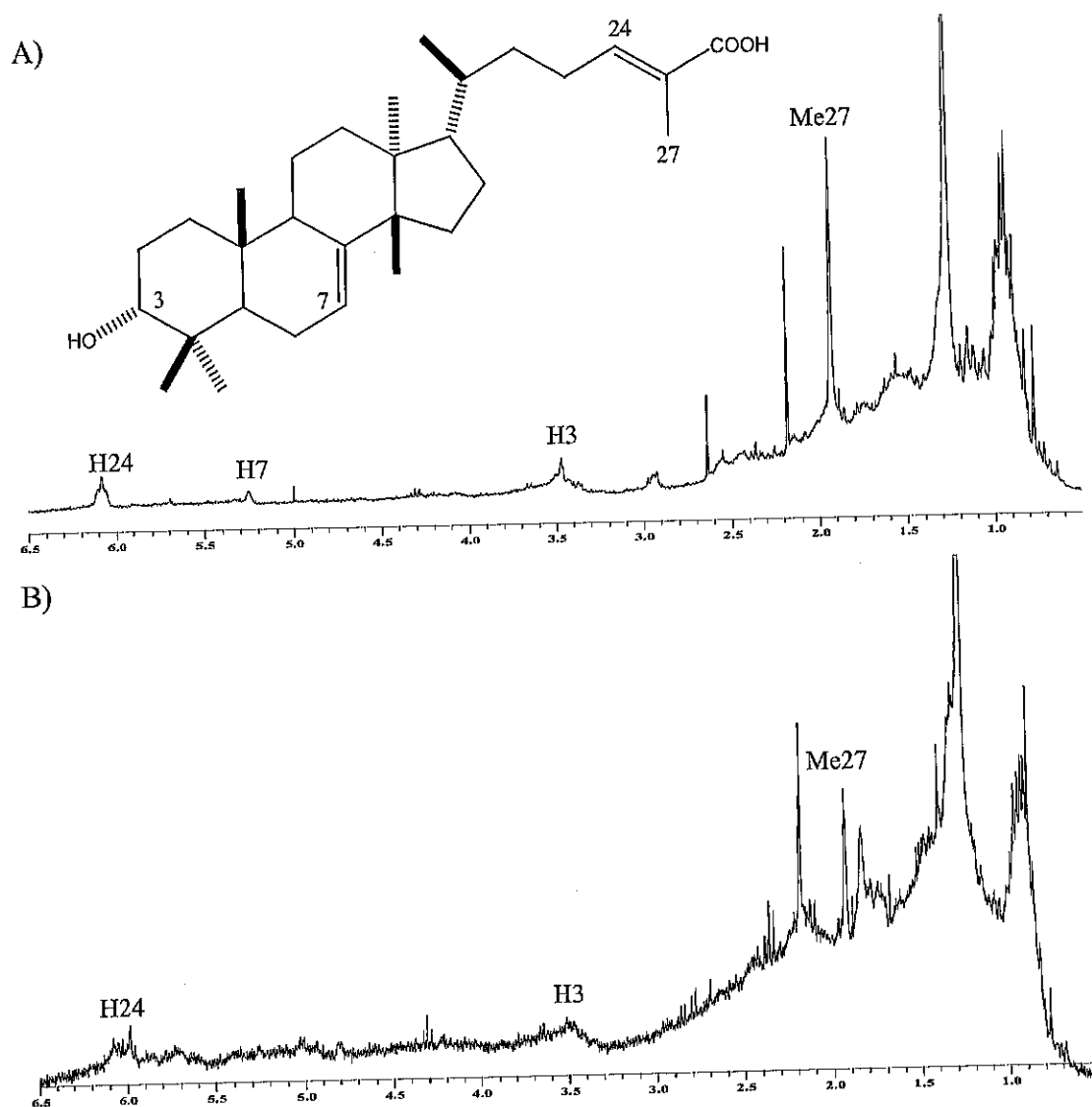


Figura 21. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 1 de cuachalalate de la mixteca poblana.

En árbol 2 (Figura 22) la corteza presenta en su espectro de RMN de ^1H las 4 señales características mencionadas por lo que se encuentra presente el AHM. Sin embargo, en las hojas la señal en 5.3 ppm no se aprecia claramente a pesar de apreciarse las tres restantes.

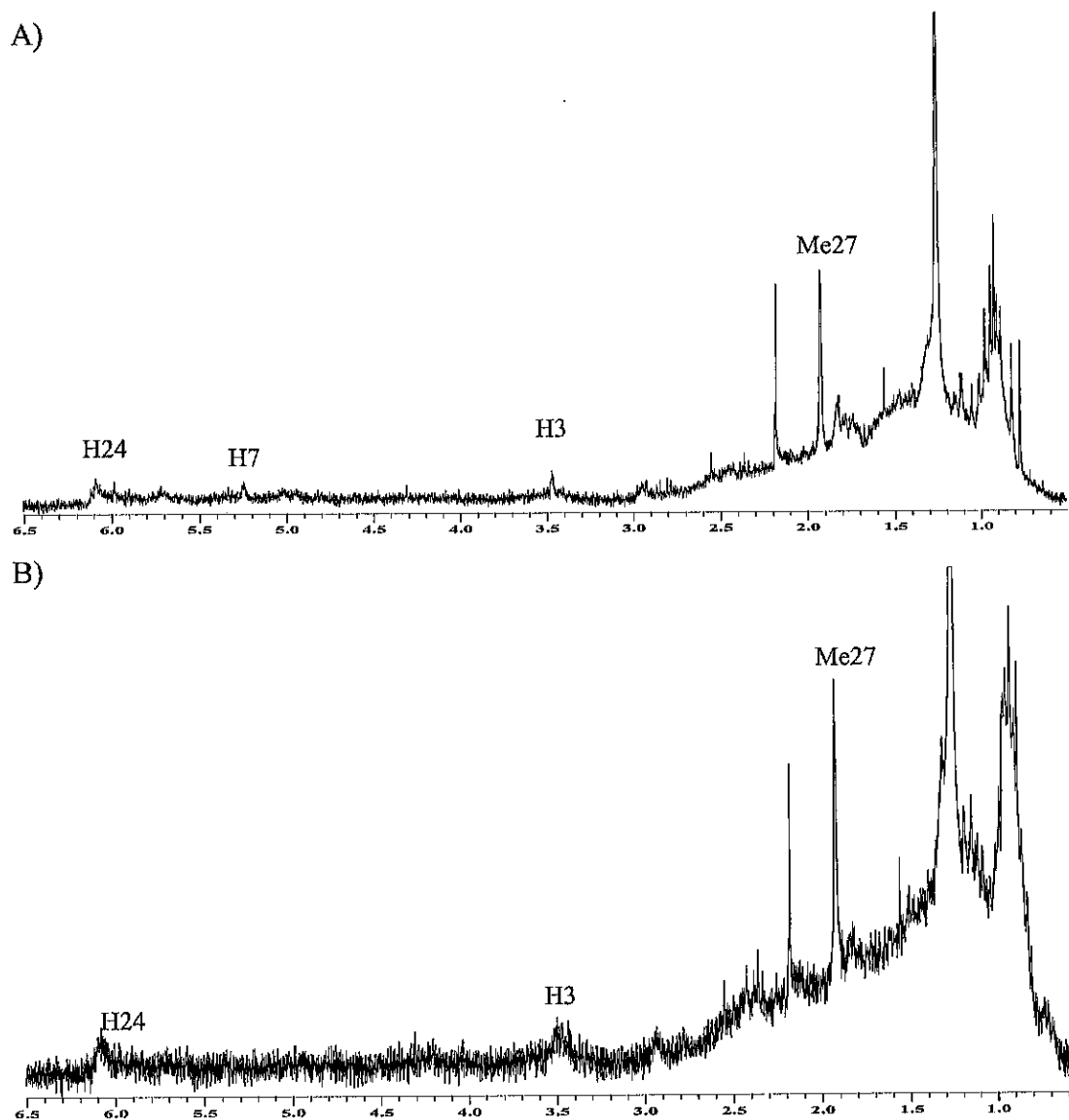
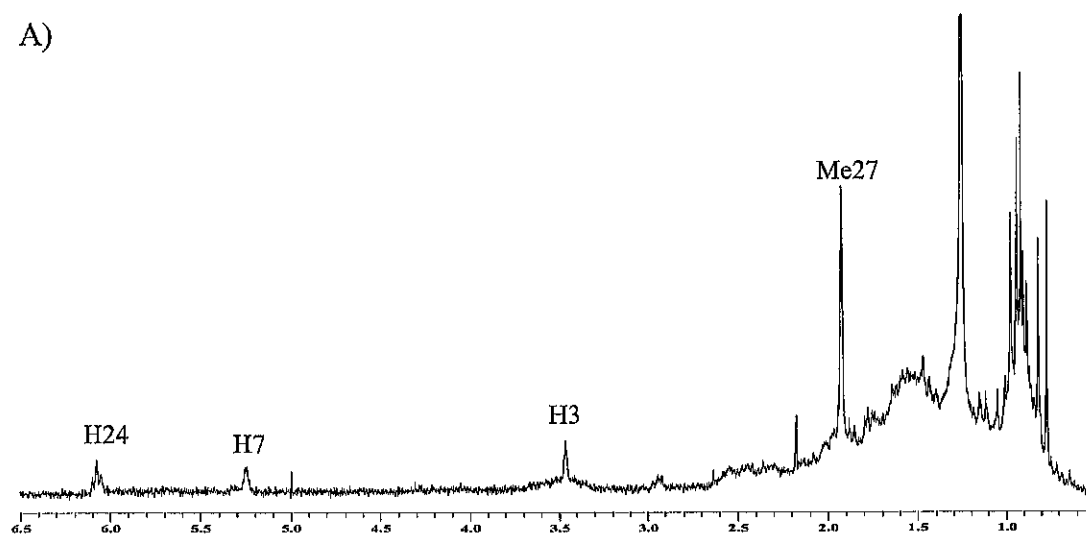


Figura 22. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 2 de cuachalalate de la mixteca poblana.

En el espectro de RNM de ^1H del extracto de corteza del árbol 3 (Figura 23) son muy claras las 4 señales características del AHM por lo que sin lugar a duda esta presente. Sin embargo, en hoja del mismo árbol, la señal en 5.3 ppm no se aprecia a pesar de encontrarse las tres restantes.

A)



B)

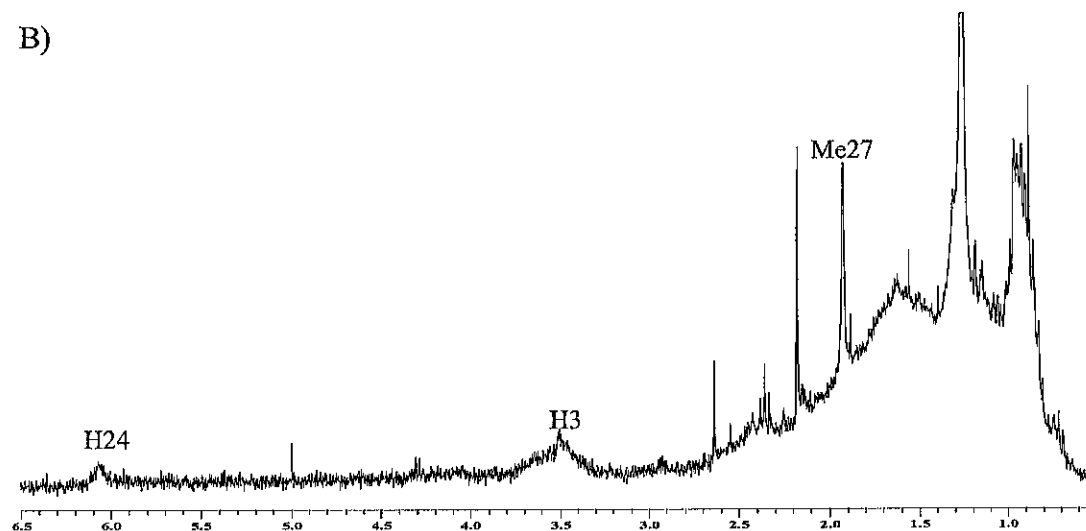


Figura 23. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 3 de cuachalalate de la mixteca poblana.

En los espectros de RMN de ^1H de los extractos de árbol 4 (Figura 24) la corteza muestra las 4 señales características del AHM. Sin embargo, la señal en 5.3 ppm no se observa en el espectro de hoja del mismo árbol no permitiendo aseverar que se trate del AHM.

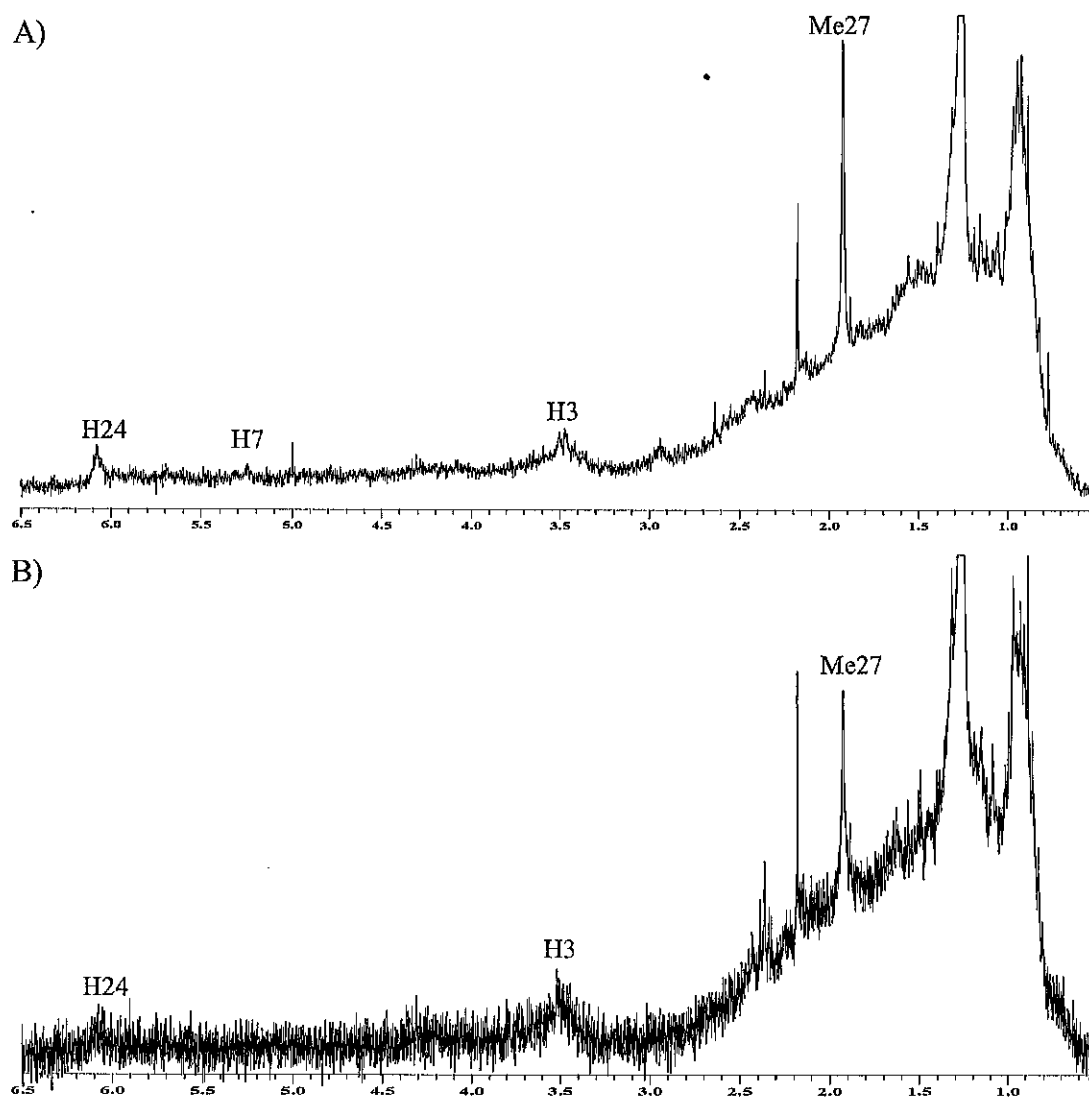


Figura 24. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H en CDCl_3 del extracto de corteza (A) y hojas (B) del árbol 4 de cuachalalate de la mixteca poblana.

Dados los resultados anteriores, es claro que en corteza de los árboles de cuachalalate colectados presentan el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (AHM) por lo que el área de la mixteca poblana es un área cuyos árboles pueden sintetizar el AHM. Sin embargo, de las hojas de cada árbol no se obtuvo un patrón característico del AHM, por la falta del hidrógeno de desplazamiento a 5.3 ppm lo cual significa que el compuesto presente en hojas es muy similar al ácido 3 α -hidroximasticadienónico dada la única ausencia de la señal mencionada en las figuras E1 a 4 y dado que esta señal representa a un hidrógeno, es factible relacionar a dicho compuesto con un precursor del AHM. Dado que algunos terpenos como el Fitol de la clorofila –un terpeno- se encuentra en los cloroplastos (Saisbury y Ross, 1995)

5. CONCLUSIONES

DE ÁPICES COMO EXPLANTES

El necrosamiento del tejido no permitió promover el crecimiento y formación de brotes vigorosos.

La aplicación de BA a bajas concentraciones redujo el necrosamiento de los ápices

Varetas pequeñas y ápices pequeños disminuyen el necrosamiento del tejido

El PVP solo redujo la necrosis de los ápices

DE HOJA COMO EXPLANTES

Colocar las hojas en posición de envés hacia arriba reduce la necrosis del tejido y promueve la formación de callo.

La luz limitó la formación de callo en los explantes, encontrando mejores respuestas morfogénicas al colocar los explantes foliares en la oscuridad.

Reducir la concentración de sales en el medio de cultivo permite reducir el necrosamiento en el tejido foliar

La adición de extrato de malta redujo el tejido dañado y permitió la inducción de callo

Las mayores concentraciones de 2,4-D favorecen la formación de callo en los explantes foliares de cuachalalate

El carbón activado y las auxinas en medio de cultivo favorecieron la inducción de raíces.

Las auxinas son promotoras de callo, siendo el 2,4-D la que mayor callo formo

Las citocininas no favorecieron la formación de callo, pero si redujeron el daño en el tejido foliar a concentraciones bajas.

DE SEMILLAS COMO EXPLANTES

El cuachalalate tiene la posibilidad de formar una gran cantidad de semillas, no obstante solo forma una o dos viables por fruto.

Ninguno de los procedimientos de desinfección mostró ser lo suficiente mente efectivo para reducir la contaminación.

Las semillas presentan microorganismos endógenos que dificultan el establecimiento aséptico *in vitro* y reducen la posibilidad de obtener plántulas.

Las semillas dañadas reducen la germinación y la cantidad de plántulas a formar

El medio de cultivo al 0% de sales favoreció la formación de más plántulas.

DE YEMAS COMO EXPLANTES

Las diferentes concentraciones de BA no tuvieron diferencias significativas sobre la brotación y longitud de las yemas axilares

La concentración de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zeatina promovió la mejor respuesta en yemas brotadas y longitud de yemas axilares.

Es importante continuar con la evaluación de antioxidantes y reguladores de crecimiento para mejorar los trabajos realizados enfocándose a determinar los compuestos involucrados en el necrosamiento del tejido vegetal.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Los árboles de cuachalalate de la Mixteca Poblana son fuente del ácido 3α -hidroximasticadienónico.

6. BIBLIOGRAFIA

Agrios, G.N. 2001. Fitopatología. Editorial Noriega. México. 838p.

Ali , N.; R.M.S. Mulwa.; M.A. Norton.; and R.M. Skirvin. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 78(5):739-741

Ananthakrishnan, G., R. Ravikumar.; S. Girija.; A. Ganapathi. 2002. *In vitro* adventitious shoot formation from cotyledon explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). Scientia Horticulturae 93(3-4): 343-355.

Ariza Castolo, A.; V. Bakhmutov; R. Contreras Theurel; N. Farfán García; A. Flores Parra; B. Gordillo Román; E. Juaristi Cossio; A. Paz Sandoval; Ma. J. Rosales Hoz; R. L. Santillán Baca. 2006. Ejemplos prácticos del uso de la resonancia magnética nuclear en química. CINVESTAV. México. 271p.

Arrieta, J.; J. Benitz; E. Flores; C. Castillo; A. Navarrete. 2003. Purification of Gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. Planta Medica 69(10): 905-909.

Badui D., Salvador. 1984. Química de los alimentos. Editorial Alhambra-UNAM. México. pp: 227-233.

Bhat, S.R. and K.P.S. Chandel. 1991. A novel technique to overcome browning tissue culture. Plant Cell Reports (10): 358-361.

Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. Segunda reimpresión de la Primera edición en español, traducido del inglés por G. G. Cano y Cano, y M. Rojas Garcidueñas. Editorial AGT. México. 784 p.

Biedermann, I. E.G. 1987. Factors affecting establishment and development of magnolia hybrids *in vitro*. Acta Horticulturae 212: 625-629.

Conger, B.V. 1987. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC editor. Fifth printing. Florida. U.S.A. 273p.

Concepción, O., L. Nápoles, A.T. Pérez, M. Hernández, N. Peralta y R. Trujillo. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. Cultivos Tropicales 25(1): 33-39

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Ed. Columbia University. New York. E.U.A. pp: 808-809.

Dabler, J.M., A.J. Pappelis, and J.N. BeMiller. 1968. Effect of phenolic acids and corn extracts upon spore germination of *diplodia zae*. *Phytopatology* 59(58): 1098-1101.

Domínguez, X.A.; R.Franco; S. García; Ma E. Porras; G. Vázquez; B. Amescua. 1983. Plantas medicinales mexicanas XLVIII. Estructura del ácido instipolinámico separado de la corteza del cuachalalate (*Amphyterygium adstringens*) Schl. *Revista Latinoamericana de Química*. 14(2): 99-100.

Friend, J. 1979. Phenolic substances and plant disease. *In*: Tom Swain, Jeffrey B. Harbone and Chris F. Van Sumere. Editors. *Biochemistry of Plant phenolics Recent advances in Phytochemistry* vol 12. Plenum. pp: 557-588.

Goyal, Y.; R.L. Bingham.; P.Felker. 1985. Propagation of the tropical tree, *Leucaena leucocephala* K67, by *in vitro* bud culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4(1): 3-10.

Hammerschmidt, R. 2005. Phenols and plant-pathogen interactions: The saga continues. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66(3): 77-78

Hartmann, H.T. y Kester, D.E. 1995. Propagación de plantas principios y prácticas. Editorial. C.E.C.S.A. México. 760p.

Hersch M., P. 1999. Destino común: los recolectores y su flora medicinal, el comercio de flora medicinal silvestre desde el suroeste poblano. Instituto nacional de antropología e historia editor. D.F. México. 262p.

Hurtado M., D.V. y Merino M., M.E. 2000. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. 232p.

Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas: Propiedades y acción. Editorial Universidad Autónoma chapingo y Mundi Prensa. México. 487p.

Kishima, K., K. Nozaki., R. Akashi., T. Adachi. 1991. Light-inducible pigmentation in *Portulaca* callus; selection of a high betalain producing cell line. Plant Cell Reports 10(6/7): 304-307.

Leninger A.L., D.L. Nelson., M.M. Cox. 1995. Principios de bioquímica. Segunda edición. Traducido del ingles por C. M. Cuchillo Foix y J.Vendrell i Roca. Editorial Omega. Barcelona España. 1013p.

Leva, A.R. and A.M. Falcone. 1990. Propagation and Organogenesis "in vitro" of *Anacardium occidentale* L. Acta Horticulturae 280: 143-145.

Lu, A.R. and A.M. Falcone. 1990. Propagation and Organogenesis "in vitro" of *Anacardium occidentale* L. Acta Horticulturae 280:143-145.

Mann, J. 1978. Secondary metabolism. Oxford university . U.K. 316p

Makino, M.; T.Motegi; and Fujimoto. 2004. Tirucalate-type triterpenes from *Juliana adstringens*. Phytochemistry 65(7): 891-896.

Martin, K.P. 2002. Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. Plant Cell Reports 21(2): 112-117.

Mata, R.; F. Calzada; A.Navarrete; F. del Rio; G. Delgado. 1991. Long-chain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. Journal of ethnopharmacology 34(2-3):147-154.

Medina L., Rosalinda. 2003. Flora del valle de Tehuacan-Cuicatlán. Fascículo 30 Julianiaceae. Ed. Instituto de biología, UNAM. Pag. 1-5.

McClure, J.W. 1979. The Physiology of Phenolic compounds in plants. In: Tom Swain, Jeffrey B. Harbone and Chris F. Van Sumere. Editors. Biochemistry of Plant phenolics Recent advances in Phytochemistry vol 12. Plenum. pp: 525-556.

Mneney, E.E. and S.H. Mantell. 2002. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 77(6): 649-657.

Momout, Y., F. Trotin., J. Dubois., J. Vasseur., E. El-Boustani. 1992. Influence of culture conditions on polyphenol production by *Fagopyrum esculentum* tissue cultures. Journal of Natural Products. 55(1): 33-38.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays whit tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Nair, S.; P.K. Gupta.; M.V. Shirgurkar.; A.F. Mascarenhas. 1984. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Linn. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 3(1): 29-40.

Navarrete, A; B. Reyes T.; A. Silva M.; C. Sixtos A.; V. Islas P.; E. Estrada L. 1990. Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphypterygium adstringens* (Cuachalalate). Revista mexicana de ciencias farmacéuticas. 21(3):28-32.

Navarrete, A., L.S. Martínez-Urbe and B.Reyes.1998. Gastroprotective Activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. Phytotherapy Rseach.12(1): 1-4.

Navarrete, A; B. Avula; V. C. Joshi; X. Ji. 2006. Quantitative determination of triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by liquid chromatograph and thin-Layer Chromatography and Morphological Análisis of cuachalalate preparations Journal of AOAC International. 89(1): 1-7.

Onay, A. 2000. Micropropagation of pistacho from mature trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60(2): 159-162

Parc, G.; A. Canaguier; P. Landré.; R. Hocquemiller.; D. Chiqui.; M. Meyer. 2002. Production of taxoids whit biological activity by plants and callus culture from selected *Taxus* genotypes. Phytochemistry. 59(7): 725-730.

Pennington, T.D. y Sarukhán, J. 2006. Árboles tropicales de México, manual para la identificación de las principales especies. Editorial U.N.A.M. y Fondo de Cultura Económica México. 523p.

Pérez G., R. M.; M. S. Pérez G.; C. Pérez G.; R. Vargas S.; M.A. Zavala S.1993. Anti-ulcer activity of *Juliana adstringens* Schlecht. Internacional Journal of Experimental Botany. 54(2): 113-118.

Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 326p.

Salisbury, F.B. y Ross, C. W. 1996. Fisiología vegetal. Editorial Iberoamericana. México. 759 p.

Sansberro, P.; H. Rey.; and L. Mroginski. 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae). Trees 17(6): 542-546.

Shankar R., V. R.. and K.S. Jagadish C. 1987. Clonal propagation of *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. by tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 9(2): 81-88.

Slater, A., N. Scott., and M. Fowler. 2003. Plant biotechnology the genetic manipulation of plants. Ed. OXFORD university. NY, USA. pp:205-230.

Sriskandarajah, S., R.M. Skirvin, H. Abu-qaoud and S.S.Korban. 1990. Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*. Journal of Horticultural Science. 65(2): 113-121.

Stern, W.L. 1952. The comparative anatomy of the xylem and the phylogeny of the julianiaceae. American Journal of Botany. 39(3): 220-229.

Sy, M.O.; L. Martinelli. 1991. *In vitro* organogenesis and regeneration in cashew (*Anacardium occidentale* L.). Acta Horticulturae. 289: 267-268.

Taeb, A.G.; Alderson, P.G. 1990. Effect of photoperiod and quality of light on bulbing of tulip shoots regenerated *in vitro*. Journal of Horticultural Science. 65(1): 71-74.

Taniguchi, S., K. Yazaki., R. Yabu-uchi., K. Kawakami., H. Ito., T. Hatano, T. Yoshida. 2000. Galloylglucoses and riccionidin A in *Rhus javanica* adventitious root cultures. Phytochemistry. 53(3): 357-363.

Treutter, D. 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. Plant growth regulation 34(1): 71-89.

Gamborg, O.L. 1982. Plant Cell cultures: Nutrition and Media., *In* Cell culture and somatic cell genetics of plants. Indra K. Vasil (ed.) Academic press. U.S.A. pp: 19-26

Vine, S.J. 1968. Improved culture of apical tissues for production of virus free strawberries. Journal of Horticultural Sciences 43(3): 293-297

Walker, J.R.L. 1975. The biology of plant Phenolics. Edward Arnold. UK. 57p.

✱Wannan, B.S.; C. J. Quinn. 1988. Biflavonoides in the julianaceae. Phytochemistry 27(10): 3161-3162.

Watson , W.H.; X.A. Domínguez; G. Vázquez; S. García. 1987. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphytrygium adstringens*. Revista Latinoamericana de Química. 18(2): 89-90.

Zarate Aquino, M. A. 1984. Germinación de especies medicinales cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht) y chaparro amargoso (*Castela tortuosa* Liebm). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 56 p.

Zel, J.; N. Gogala; M. Camloh. 1988. Micropropagation of *Pinus sylvestris*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 14(3): 169-175.

7. ANEXO.

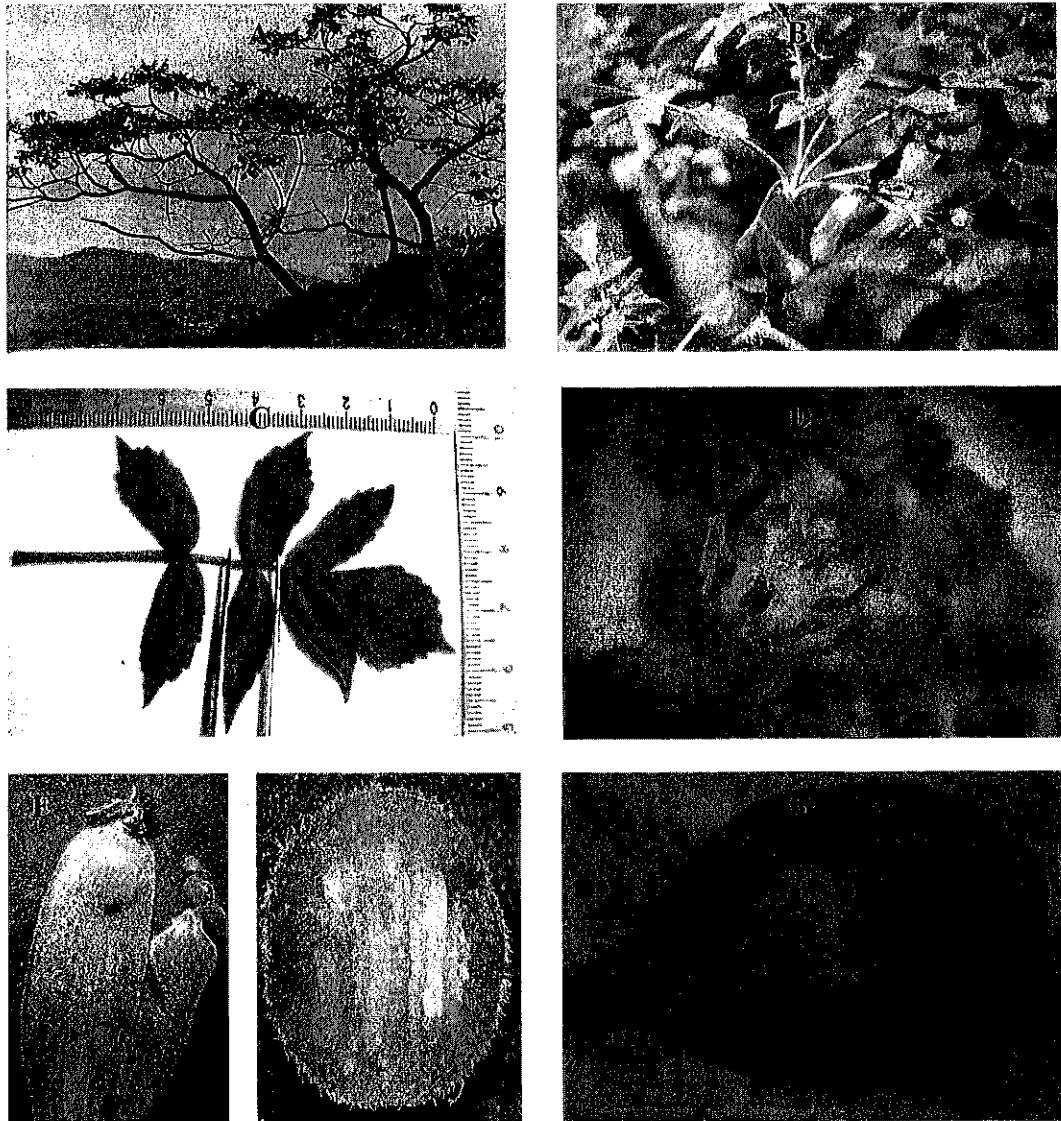


Figura 25. Algunas estructuras anatómicas del cuachalalate (*Amphipterygium adstrinens*) de la Mixteca Poblana son: A) Copa de un árbol, B) Punta de rama de un árbol femenino, C) Hoja un tanto atípica, D) Inflorescencia masculina, E) Flores femeninas, F) Corte transversal de un fruto inmaduro donde se aprecian las semillas en desarrollo en color blanco y G) Fruto maduro

Cuadro 1A Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por concentración del $\text{Na}(\text{OCl})_2$.

c21	DMS= 8.9996	n21	DMS=12.303
Media	Concentración	Media	Concentración
69.067 a (0.33)	1.25	87 a (1.0)	8.75
58.933 b (0.03)	3.75	81 a (0.9)	5
57.000 b (0.00)	5	41 b (0.23)	3.75
57.000 b (0.00)	8.75	33 b (0.1)	1.25

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 2A Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por el tipo de citocinina.

t21	DMS=	n21	DMS=6.1439
Media	Citocinina	Media	Citocinina
22.475 a (1.455)	Cinetina	23 a (1.0)	2 BA
18.525 a (1.305)	BA	18 b (0.5)	1 Cinetina

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 3A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21), tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por la concentración de citocininas.

t21	DMS=	n21	DMS= 7.7227
Media	Concentración	Media	Concentración
25.45 a (1.55)	1.0	29 a (1.6)	2.0
22.55 a (1.48)	0.5	27 a (1.4)	1.5
18.75 a (1.30)	1.5	13 b (0.0)	0.5
15.25 a (1.19)	2.0	13 b (0.0)	1.0

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 4A Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por tipo de vareta empleada para obtener explantes.

t21	DMS= 7.3177	n21	DMS=6.5908
Media	Vareta	Media	Vareta
22.85 a (1.84)	Gruesa	25.925 a (48.0)	Gruesa
18.15 a (1.47)	Delgada	15.075 b (25.1)	Delgada

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 5A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por el tamaño inicial del explante.

t21	DMS=4.6852	n21	DMS=7.449
Media	tamaño	Media	tamaño
29.375 a (2.18)	Grande	21.725 a (37.0)	Grande
11.625 b (1.13)	Pequeño	19.275 a (36.1)	Pequeño

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 6A. Comparaciones de rangos de las variables altura de exudados en el medio (ale7), ancho de exudados (ane7), tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados con dos antioxidantes.

ale7	DMS=6.7568	ane7	DMS=6.5648
Media	Antioxidantes	Media	Antioxidantes
16.0 a (3.6)	PVP L-cys	16.3 a (7.4)	PVP L-cys3
13.2 ab (2.2)	L-cys	13.0 ab (3.6)	L-cys
8.3 cb (1.0)	PVP	8.2 cb (2.2)	PVP
4.5 c (0.0)	sin	4.5 c (0.0)	sin

Continuación.

t21	DMS=11.008	n21	DMS=7.6569
Media	Antioxidantes	Media	Antioxidantes
11.4 a (2.9)	PVP	15.9 a (88)	sin
11.4 a (2.5)	L-cys	11.7 ab (65)	L-cys
11.0 a (2.4)	PVP L-cys	10.3 ab(56)	PVP L-cys3
8.2 a (2.14)	sin	4.1 b (25)	PVP

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 7A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t21) y necrosis (n21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados con 6 compuestos orgánicos.

t21	DMS=16.947	n21	DMS=17.148
Media	Coadyuvantes	Media	Coadyuvantes
20.0 a	CH	20.1 a	L-cys
19.5 a	SA	16.9 a	L-glu
14.8 a	EM	16.8 a	EM
14.8 a	PCa	16.6 a	PCa
12.1 a	L-cys	14.0 a	SA
11.80 a	L-glu	8.6 a	CH

Cuadro 8A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t14) y necrosis (n14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por dos citocininas

t14	DMS=8.1214	n14	DMS= 9.0266
Media	Citocinina	Media	Citocinina
36.4 a (2.15)	2ip	31.433 a (59.7)	BA
24.6 b (1.68)	BA	29.567 a (55.6)	2ip

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 9A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t14) y necrosis (n14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por la concentración de citocininas.

t14	DMS=12.493	n14	DMS=12.319
Media	Concentración	Media	Concentración
35.825 a (2.13)	1.0	40.150 a (71.6)	1.5
30.050 a (1.86)	0.5	26.175 b (51.7)	0.5
25.625 a (1.75)	1.5	25.175 b (49.8)	1.0

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 10A. Comparaciones de rangos de las variables tamaño (t14) y necrosis (n14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de ápices de cuachalalate tratados por el tipo de antioxidante .

t14	DMS=10.133	n14	DMS=10.474
Media	Antioxidante	Media	Antioxidante
36.450 a (1.48)	Fluoroglucinol.	41.025 a (77.75)	Pyrogallol.
33.475 a (1.30)	Ácido P-amino benzoico	34.600 a (66.00)	Ácido P-amino benzoico
21.575 b (1.00)	Pyrogallol	15.875 b (38.50)	2. Fluoroglucinol

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 11A. Comparaciones de rangos de la variable necrosis (n14) de tejido mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por dos posiciones del explante.

n14	DMS=1.606
Media	Posición
8 a (94)	haz
3 b (14)	envés

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 12A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y callos formados (cas14) mediante prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por tres posiciones del explante.

n14	DMS= 7.1261	cas14	DMS=6.9644
Media	Posición	Media	Posición
42.100 a (90.4)	haz	32.100 a (0.40)	haz
38.375 a (88.3)	vertical	30.475 a (0.20)	envés
11.025 b (11.0)	envés	28.925 a (0.05)	vertical

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 13A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14), callos formados (cas14) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados con Luz y oscuridad.

n14	DMS=5.0636	cas14	DMS=4.3174
Media	Luz	Media	Luz
20.90 a (70.73)	Luz	16.067 a (0.27)	Obs
10.10 b (25.93)	Obs	14.933 a (0.13)	Luz

Continuación.

e14	DMS= 6.1748	ce14	DMS=5.6835
Media	Luz	Media	Luz
16.4 a	2. Luz	16.667 a	1. Obs
14.6 a	1. Obs	14.333 a	2. Luz

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 14A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14), callos formados (cas14), color de exudados (ce14) y exudados (e14) en el medio de cultivo mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por la concentración de sales en el medio de cultivo.

n14	DMS=9.4059	cas14	DMS=6.4924
Media	Sales (%)	Media	Sales (%)
19.20 a (69.0)	100	16.15 a (0.3)	0
14.35 a (43.6)	0	15.90 a (0.2)	50
12.95 a (32.4)	50	14.45 a (0.1)	100

Continuación.

e14	DMS= 5.8726	ce14	DMS=4.3863
Media	Sales (%)	Media	Sales (%)
24.35 a (2.9)	0	21.0 a (5.0)	50
11.20 b (1.2)	50	19.0 a (4.5)	100
10.95 b (1.2)	100	6.5 b (2.0)	0

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 15A. Comparaciones de rangos de las raíces (r21) formadas mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados con carbón activado y por la concentración de 2,4-D de procedencia del material

r21	DMS=7.1184	r21	DMS=2.77
Media	2,4-D	Media	CA
28.500 a (5.37)	2. 0.1	34.00 a (6.3)	CA
27.813 a (4.12)	5. 0.4	15.00 b (0.0)	Sin
27.375 a (3.87)	3. 0.2		
25.063 a (3.12)	6. 0.3		
23.250 a (2.50)	4. 0.5		
15.00 b (0.00)	1. 0.0		

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 16A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y peso de callo (p21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por el tipo de auxinas.

n14	DMS=12.20	p21	DMS= 10.965
Media	Auxinas	Media	Auxinas
52.180 a (48.36)	2,4-D	53.06 a (121.9)	2,4-D
39.840 b (28.56)	ANA	42.92 a (76.84)	ANA
21.980 c (18.48)	AIA	18.02 b (13.10)	AIA

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 17A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y peso de callo (p21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratadas por la concentración de auxinas (tratamiento)-

n14	DMS= 18.75	p21	DMS=21.048
Media	Concentración	Media	Concentración
52.933 a (48.800)	5.0	48.667 a (119.20)	5.0
51.900 a (42.867)	10	45.100 a b (84.69)	1.0
32.967 b (25.533)	1.0	39.600 a b (68.84)	10
30.300 b (23.00)	0.5	30.700 a b (44.41)	0.1
21.900 b (18.800)	0.1	25.933 b (35.93)	0.5

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 18A. Comparaciones de rangos de las variables necrosis (n14) y peso de callo (p21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 14 y 21 días de iniciada la siembra de hojas de cuachalalate tratados por el tipo de citocinina

n14	DMS=11.827	p21	DMS=13.056
Media	citocininas	Media	Citocininas
42.12 a (22.88)	BA	44.20 a (25.486)	2ip
36.62 a (15.80)	cinetina	36.54 a (19.844)	cinetina
35.26 a (12.68)	2ip	33.26 a (19.000)	BA

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 19A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21) germinación (g7) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratadas con NaOCl.

c21	DMS=12.919	g21	DMS= 0
Media	Concentración	Media	Concentración
27.05 a (2.4)	2.5	20.5 a (0.0)	0.0
20.30 a (1.8)	7.5	20.5 a (0.0)	1.25
19.10 a (1.7)	1.25	20.5 a (0.0)	2.5
15.55 a (1.4)	0.0	20.5 a (0.0)	7.5

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 20A. Comparaciones de rangos contaminación y germinación de semillas de cuachalalate *in vitro*, después de 21 días de tratadas con peroxido de hidrógeno.

Horas en H ₂ O ₂	Contaminación		Germinación	
	Frecuencia	Media	Frecuencia	Media
24	7	17.0 a (0.7)	2	17.5 a (0.6)
48	6	15.5 a (0.6)	0	14.5 a (0.0)
72	5	14.0 a (0.5)	0	1.5 a (0.0)
	DMS	8.4688	DMS	4.0489

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 21A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c21) plántulas formadas (plfor) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate expuestas a NaClO y Ca(ClO)₂.

c21	DMS= 10.544	plfor	DMS=11.514
Media	Desinfectante	Media	Desinfectante
32.10 a (0.8)	NaClO al 2.5%	32.5 a (0.50)	NaClO al 2.5%
30.25 a (0.75)	Ca(ClO) ₂ al 4%	31.0 a (0.45)	Ca(ClO) ₂ al 4%
29.15 a (0.70)	Ca(ClO) ₂ al 10%	28.0 a (0.35)	Ca(ClO) ₂ al 10%

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 22A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7), plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados por el daño causado a las semillas.

c7	DMS=2.7817	inc7	DMS=7.8556
Media	Daño	Media	Daño
31.5 a (1.0)	1. Dañada	36.9 a (2.53)	1. Dañada
29.5 a (0.93)	2. Integra	24.1 b (1.73)	2. Integra

Continuación.

g7	DMS=6.864	plfor21	DMS=6.4061
Media	Daño	Media	Daño
34 a (2.5)	2. Integra	38 a (0.6)	2. Integra
27 b (1.8)	1. Dañada	23 b (0.1)	1. Dañada

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 23A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7), plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados por la concentración de sales del medio de cultivo (tratamiento).

c7	DMS=4.0569	inc7	DMS=10.74
media	Sales (%)	Media	Sales (%)
31.5 a (1.0)	100	40.85 a (2.8)	100
31.5 a (1.0)	50	31.00 a (2.2)	50
28.5 a (0.9)	0	19.65 b (1.4)	0

Continuación.

g7	DMS=10.453	plfor21	DMS=10.626
Media	Sales (%)	Media	Sales (%)
33.0 a (2.40)	50	35.0 a (0.50)	0
30.0 a (2.10)	0	32.0 a (0.40)	50
28.5 a (1.95)	100	24.5 a (0.15)	100

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 24A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7) y plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados por con la eliminación de de la cubiertas (bloque).

c7	DMS=2.78717	inc7	DMS=8.1612
media	Aislamiento	media	Aislamiento
31.5 a (1.00)	No pre aisladas	35.967 a (2.43)	No pre aisladas
29.5 a (0.93)	Pre aisladas	25.033 b (1.73)	Pre aisladas

Continuación.

g7	DMS=6.0967	plfor21	DMS=7.8061
media	Aislamiento	media	Aislamiento
31 a (2.50)	Pre aisladas	32 a (0.60)	Pre aisladas
30 a (2.40)	No preaisladas	29 a (0.50)	No pre aisladas

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 25A. Comparaciones de rangos de las variables contaminación (c7), intensidad de contaminación (inc7), germinación (g7) y plántulas formadas (plfor21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 7 y 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados con la concentración de sales en el medio de cultivo

c7	DMS=4.056		inc7	DMS=10.765	
	Media	Sales (%)		Media	Sales (%)
	31.5 a (1.0)	100		40.2 a (2.70)	100
	31.5 a (1.0)	50		32.7 a (2.20)	50
	28.5 a (0.90)	0		18.5 b (1.35)	0
Continuación.					
g7	DMS=8.9446		plfor21	DMS=11.131	
	Media	Sales (%)		Media	Sales (%)
	33.0 a (2.70)	0		36.5 a (0.75)	0
	33.0 a (2.40)	50		29.0 a (0.50)	50
	28.5 a (2.25)	100		26.0 a (0.40)	100

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable

Cuadro 26A. Comparaciones de rangos de las variables longitud de yemas (ly21) y porcentaje de yemas brotadas (pyb21) mediante prueba tukey ($\alpha=0.05$) después de 21 días de iniciada la siembra de semillas de cuachalalate tratados con zeatina.

ly21	DMS=5.1974		pyb21	DMS=4.4329	
	Media	Concentración		Media	Concentración
	10.125 a (7.625)	15		8.5 a (93.75)	15
	4.875 b (3.250)	6		8.1a (91.67)	3
	4.500 b (2.625)	3		2.8b (43.75)	6

Los datos entre paréntesis son la media aritmética de la variable