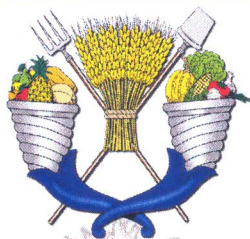


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



**DEPARTAMENTO DE
FITOTECNIA**

**Maestría en Ciencias en
Biotecnología Agrícola**



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

**RESPUESTAS *in vitro* Y EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE
L-FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL) EN
Myroxylon balsamum (L.) Harms. LEGUMINOSA
ARBÓREA TROPICAL**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

PRESENTA

IDROVO ESPÍN FABIO MARCELO

**Chapingo, Edo. De México,
Octubre de 2008**

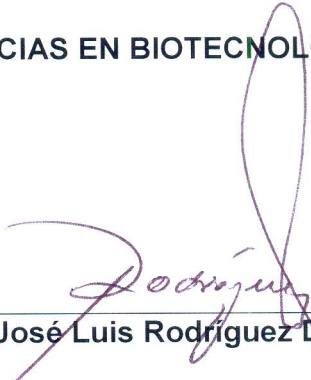


**RESPUESTAS *in vitro* Y EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE
L-FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL) EN *Myroxylon balsamum*
(L.) Harms. LEGUMINOSA ARBÓREA TROPICAL**

Tesis realizada por Fabio Marcelo Idrovo Espín 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 BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA.

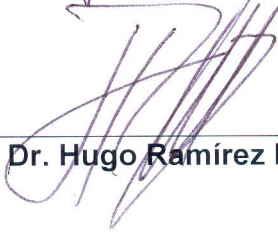
DIRECTOR:


Dr. José Luis Rodríguez De La O.

ASESOR:


Dr. Juan Porfirio Legaria Solano.

ASESOR:


Dr. Hugo Ramírez Maldonado.

DEDICATORIA

A la mémoire affectueuse de mon père bien-aimé, León. Merci pour ta patience, ton savoir et l'amour dont tu m'as entouré tout au long de ma vie. Jamais je ne t'oublierai.

A mi Madre querida y nuestra Familia en Ecuador que nos apoyan y dan fuerzas desde la distancia.

A mi amada Sophia por ser mi compañera total.

A mis hijos Omar y Adrián, mi alegría y orgullo.

AGRADECIMIENTOS

A Sophia por los valiosos aportes, comentarios y por facilitarme las plantas y semillas necesarias para mi investigación, a León⁺, Ruth, Rita, Fernando, Selene, Nicolás, Gilberto e Inés por su ayuda y aporte en los múltiples trámites previos para mi viaje y posterior estancia en México.

A mis profesores en Ecuador, Doctores Eduardo Mayorga, Wilson Parra, Arturo Bastidas, Alberto Calderón, Msc. Fernando Novillo y personal de la Secretaría de la Facultad de Ciencias Químicas; al Dr. Alejandro Rivera de la Embajada Mexicana en Ecuador; la Ing. Martha Carvajal Directora de Patentes del IEPI, Msc. Lorena Sandoval, Personal y Colegas de la Dirección de Patentes por su interés constante y por facilitarme según el caso, constancias y calificaciones de forma ágil y oportuna.

Al personal del Instituto Ecuatoriano de Crédito Educativo IECE por su ayuda en los trámites para ser favorecido con créditos económicos necesario para mi estancia en México.

Al Doctor Oscar Mascorro Gallardo por su constante apoyo antes de mi ingreso al Programa de Maestría y durante mis estudios.

A María Celia García Cadena por su incomparable ayuda en todos los trámites, información y gestiones relacionados con la Maestría.

A Jorge Alatorre y su familia por el apoyo en la difícil tarea de ubicación de la especie.

A mis Profesores, Doctores Mascorro, Rodríguez De La O, Legaria y a la Maestra Edith García, por todas sus enseñanzas que valoro mucho; a la Maestra Ernestina Cedillo por su apoyo respecto a la morfología y botánica de la especie.

A mi director de tesis Dr. José Luis Rodríguez De La O por su supervisión, consejos y apoyo en el desarrollo de mi investigación, y mis asesores, Doctores Juan Legaria y Hugo Ramírez por su tiempo y acertadas correcciones.

Al Dr. José Luis Romo Lozano Coordinador General de Posgrado de la UACH, por su valiosa ayuda.

Al personal de Laboratorio de Cultivo de Tejidos Norma y Gisela, y alumnos de estancia José Luis y Guadalupe por asistirme en mis labores con mucho entusiasmo, a Eugenio Olivar y Mateo Barrientos del Laboratorio de Semillas de Fitotecnia por su ayuda en el ensayo con tetrazolium.

A Halah, Efraín, Rocío, Lolita, Blanca, Agueda, Mónica y mis compañeros de maestría Ismael y Oscar, gracias por sus consejos, colaboración, conocimientos y amistad.

Al personal de Servicios Habitacionales, en especial a María del Socorro García Cadena y la Ing. Elvia Orozco por su ayuda en mi estancia en Chapingo.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez por su apoyo desde la Coordinación de Posgrado en el Departamento de Fitotecnia. A la Dra. Ernestina Valadez y Dr. Dante Rodríguez por facilitarme material, indispensable para mi investigación y al Técnico Gerardo Mendoza por su asistencia.

Al Dr. Emilio Maruyama por enviarme desde el Japón una copia de su artículo. A la Prof. Isabelle Lecrueau y el Dr. Flavio Contreras por sus aportes al presente trabajo.

Sin el interés demostrado por todos ustedes y su paciencia, mi investigación nunca se habría llevado a cabo, a todos mil gracias.

DATOS BIOGRÁFICOS

Fabio Marcelo Idrovo Espín, ecuatoriano de nacimiento cursa sus estudios de Química en la Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Química (1994-2002) donde obtiene su título de Químico Puro con Diploma de Honor por mejor puntaje del último año de carrera.

Participa como Investigador Científico del Programa de Mejoramiento del Sector Agropecuario PROMSA del Banco Mundial y la Fundación Wong en el Centro Científico Río Palenque, Los Ríos, Ecuador (2002-2003).

Se dedicó a la docencia universitaria (2003-2004) para luego desempeñarse como perito examinador externo del Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual IEPI, encargado del examen de patentabilidad de solicitudes extranjeras y nacionales en las áreas agroquímicas y farmacéuticas. Posteriormente es seleccionado y trabaja como perito examinador de fondo del mismo Instituto Gubernamental (2004-2006).

Cursa sus estudios de Maestría en Biotecnología Agrícola, en la Universidad Autónoma Chapingo (2006-2008).

**RESPUESTAS *in vitro* Y EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE L-FENILALANINA AMONIO
LIASA (PAL) EN *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. LEGUMINOSA ARBÓREA TROPICAL
RESPONSES *in vitro* AND ENZYMATIC EVALUATION OF L-PHENYLALANINE AMMONIA
LYASE (PAL) IN *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. TROPICAL ARBOREAL LEGUME**

Fabio Marcelo Idrovo Espín¹, José Luis Rodríguez De La O²

RESUMEN

Explantos de la leguminosa arbórea *Myroxylon Balsamum* (L.) Harms fueron cultivados en medios MS (1962) suplementados con diferentes promotores de crecimiento. Los resultados de todos los ensayos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$), usando el programa estadístico SAS.

A partir de segmentos nodales se obtuvieron los mayores diámetros promedios de callos con medios suplementados con 0.0 mg·L⁻¹ TDZ sin BA y 0.132 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA, ambos expuestos a intensidad de luz de 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los menores diámetros se obtuvieron con 0.088 mg·L⁻¹ TDZ sin BA y 0.0 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA en oscuridad. Los callos se necrosaron.

La longitud mayor de yemas axilares se obtuvo con 2.5 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA en oscuridad y las menores con 0.088 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA que no respondieron.

Con intensidad de luz de 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 1 mg·L⁻¹ BA, 0.5 mg·L⁻¹ KIN y 0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D produjo un mayor diámetro de callos y 3 mg·L⁻¹ BA, 3 mg·L⁻¹ KIN y 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D el menor diámetro.

Los folíolos y raquis a diferentes concentraciones de 2,4-D y ANA no respondieron.

No se encontró diferencia significativa en la germinación de semilla en medios suplementado con diferentes concentraciones de BA y AG₃. El mayor porcentaje de germinación (30 %) se obtuvo con 1 mg·L⁻¹ BA y 3 mg·L⁻¹ AG₃.

La evaluación enzimática de PAL en tres niveles de intensidad de luz se hizo con un espectrofotómetro midiendo, la variación de concentración de trans cinamato cada 30 minutos. Segmentos nodales de *M. balsamum* fueron cultivados en 1 mg·L⁻¹ BA, 0.5 mg·L⁻¹ KIN y 0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D y se obtuvo la mayor actividad (-75.648 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco) en oscuridad y la menor (-12.487 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco) con intensidad de luz de 49 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Palabras clave: *M. balsamum*, intensidad de luz, diámetro, longitud, PAL, evaluación enzimática.

¹ Tesista

² Director de tesis

ABSTRACT

Arboreal legume *Myroxylon Balsamum* (L.) Harms explants were cultivated in MS (1962) medium supplemented with different growth promoters. The results of all the assays were subjected to a variance analysis and mean comparison (Tukey $\alpha=0.05$), using the SAS statistical software.

From nodal segments were obtained the largest average diameters with medium supplemented with 0.0 mg·L⁻¹ TDZ without BA and 0.132 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA, both exposed to light intensity of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The smallest diameters were obtained with 0.088 mg·L⁻¹ TDZ without BA and 0.0 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA in darkness. The calluses necrosed.

The largest length of axillar buds was obtained with 2.5 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA in darkness and the smallest with 0.088 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA did not respond.

With light intensities of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 1 mg·L⁻¹ BA, 0.5 mg·L⁻¹ KIN and 0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D produced a larger callus diameter and 3 mg·L⁻¹ BA, 3 mg·L⁻¹ KIN and 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D the smallest diameter.

The leaflets and rachises at different concentrations of 2,4-D and NAA did not respond.

No significant difference was found in seed germination in medium supplemented with different concentrations of BA and GA₃. The largest percentage of germination (30 %) was obtained with 1 mg·L⁻¹ BA and 3 mg·L⁻¹ GA₃.

The enzymatic evaluation of PAL in three levels of light intensity was made with a spectrophotometer measuring the concentration variation of transcinamate every 30 minutes. Nodal segments of *M. balsamum* were cultivated in 1 mg·L⁻¹ BA, 0.5 mg·L⁻¹ KIN and 0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D and the largest activity (-75.648 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight) was obtained in darkness and the smallest (-12.487 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight) with light intensity of 49 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Key words: *M. balsamum*, light intensity, diameter, length, PAL, enzymatic evaluation.

¹ Thesis writer

² Thesis director

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos particulares	2
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Descripción y distribución.	4
4.2. Usos e importancia de <i>M. balsamum</i>	5
4.3. Conservación de <i>M. balsamum</i> y potencial de investigación biotecnológica.....	5
4.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>M. balsamum</i>	7
4.3.2. Enzimas.....	7
4.3.3. L-Fenilalanina amonio liasa	8
4.4. Cultivo <i>in vitro</i> de leguminosas arbóreas leñosas y leguminosas	12
4.5 Fotomorfogénesis	13
4.6 Cultivo de tejidos vegetales	15
4.6.1. Tipos de células vegetales	15
4.6.1.1 Meristemáticas	15
4.6.1.2. Parenquimáticas.....	16
4.6.1.3. Colenquimáticas	17

4.6.1.4. Esclerenquimáticas	17
4.6.2. Producción <i>in vitro</i> de brotes	17
4.6.3. Medios de cultivo	18
4.6.4. Reguladores de crecimiento y hormonas	18
4.6.4.1. Auxinas.....	19
4.6.4.2. Citocininas	20
4.6.4.3. Combinaciones de auxinas y citocininas	22
4.6.4.4. Giberelinas	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Sitio de colecta	24
5.2. Medios y condiciones de cultivo.	25
5.3. Respuestas <i>in vitro</i> de <i>M. balsamum</i>	26
5.3.1. Segmentos nodales en Tidiazurón (TDZ) y Benciladenina (BA)	26
5.3.1.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en diferentes concentraciones de TDZ y dos niveles de intensidad de luz.....	27
5.3.1.1.1. Modelo estadístico.....	28
5.3.1.1.2. Análisis estadístico	29
5.3.1.2. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en TDZ y BA y dos niveles de intensidad de luz	29
5.3.1.2.1. Modelo estadístico.....	29
5.3.1.2.2. Análisis estadístico	30

5.3.2. Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D.....	31
5.3.2.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D y carbón activado.....	31
5.3.2.1.1. Modelo estadístico.....	31
5.3.2.1.2. Análisis estadístico	32
5.3.2.2. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D sin carbón activado	32
5.3.2.2.1. Modelo estadístico.....	33
5.3.2.2.2. Análisis estadístico	33
5.3.3. Peciolos, raquis y foliolos en 2,4-D y ANA	33
5.3.4. Semillas en AG ₃ , 2,4-D y BA	35
5.3.5. Ensayo enzimático	37
5.3.5.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, actividad de PAL en tres niveles de intensidad de luz.....	38
5.3.5.1.1. Modelo estadístico.....	38
5.3.5.1.2. Análisis estadístico	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1. Segmentos nodales en Tidiazurón (TDZ) y Benciladenina (BA).....	40
6.1.1. Segmentos nodales en diferentes concentraciones de TDZ y dos niveles de intensidad de luz.....	40
6.1.2. Segmentos nodales en TDZ y BA y dos niveles de intensidad de luz .	45
6.2. Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D	49
6.2.1. Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D y carbón activado.....	49

6.2.2 Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D sin carbón activado	50
6.3. Peciolos, raquis y foliolos en 2,4-D y ANA.....	52
6.4. Semillas en AG ₃ y BA	55
6.6. Ensayo enzimático.....	58
6.6.1 Actividad de PAL en tres niveles de intensidad de luz	58
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. LITERATURA CITADA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que inducen la respuesta de PAL.	8
Figura 2. Mecanismo de eliminación de amonio a partir de L-fenilalanina.	9
Figura 3. Biosíntesis de fenilpropanoides.	10
Figura 4. Promotores de genes pal en perejil.	12
Figura 5. Representación esquemática de la fotomorfogénesis.	15
Figura 6. Estructura química del Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.	19
Figura 7. Concentración de AIA libre en <i>Chenopodium rubrum</i> bajo diferentes regímenes de fotoperiodo.	20
Figura 8. Estructuras químicas de tres citocininas.	21
Figura 9. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas y su efecto en crecimiento y morfogénesis.	23
Figura 10. Sitios de colecta en el Edo. de Veracruz.	24
Figura 11. Ilustración de <i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms.	25
Figura 12. Explantes de <i>M. balsamum</i>	27
Figura 13. Diagrama de corte de explantes de <i>M. balsamum</i>	34
Figura 14. Fruto de <i>M. balsamum</i>	35
Figura 15. Semillas en AG ₃ , 2,4-D y BA.	36
Figura 16. Diámetro promedio de callos para segmentos nodales de <i>M. balsamum</i>	41
Figura 17. Diámetro promedio de callos en segmentos nodales de <i>M. balsamum</i> a diferentes concentraciones de TDZ y con dos niveles de intensidad de luz.	42
Figura 18. Longitud de yema con dos niveles de intensidad de luz.	43
Figura 19. Producción directa de múltiples brotes adventicios a partir de segmento nodal de <i>M. balsamum</i> con yema axilar.	45

Figura 20. Diámetro promedio de callos en segmentos nodales de <i>M. balsamum</i> a diferentes concentraciones de TDZ + BA y con dos niveles de intensidad de luz.....	46
Figura 21. Longitud de yemas axilares para segmentos nodales de <i>M. balsamum</i>	47
Figura 22. Longitud promedio de yemas en segmentos nodales de <i>M. balsamum</i> en BA a diferentes concentraciones de TDZ y en dos intensidades de luz de luz.....	47
Figura 23. Diámetro promedio de callos y longitud de yemas en medio con TDZ y BA	48
Figura 24. Diámetro promedio de callos, Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D y carbón activado.	50
Figura 25. Diámetro promedio de callos y longitud promedio de yemas en segmentos nodales de <i>M. balsamum</i> con tres composiciones de medios de cultivo.	51
Figura 26. Variación del diámetro promedio de callos en relación con el contenido total de citocininas y 2,4-D.	52
Figura 27. Embrión de <i>M. balsamum</i>	55
Figura 28. Actividad de PAL en función de los niveles de tiempo.....	59
Figura 29. Explantes para ensayo enzimático.....	60
Figura 30. Actividad promedio de PAL en función del tiempo por nivel de intensidad de luz.....	61
Figura 31. Dependencia de la absorbancia en función del tiempo a tres niveles de intensidad de luz.	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Significancia de los factores individuales y su interacción.....	40
Cuadro 2. Significancia de los factores individuales y su interacción.....	45
Cuadro 3. Significancia para tratamientos con diferentes concentraciones de BA, KIN y 2,4-D.....	49
Cuadro 4. Significancia del tratamiento en diámetro de callos y longitud de yema, con diferentes concentraciones de TDZ y dos niveles de intensidad de luz.	50
Cuadro 5. Respuesta en raquis y raquilla a partir de explantes de <i>M. balsamum</i> obtenido en El Palmar.....	53
Cuadro 6. Respuesta en raquis con porción de raquilla a partir de explantes de <i>M. balsamum</i> proveniente de vivero.	53
Cuadro 7. Respuesta en raquis, folíolos y pecíolos a partir de explantes de <i>M. balsamum</i> proveniente de vivero.	54
Cuadro 8. Respuesta de semillas <i>M. balsamum</i> a la germinación mediante BA y CA. Ensayo 1.	56
Cuadro 9. Respuesta de semillas <i>M. balsamum</i> a la germinación mediante BA y CA. Ensayo 2.	56
Cuadro 10. Respuesta de semillas <i>M. balsamum</i> a la germinación mediante BA y GA ₃ . Ensayo 3.....	57
Cuadro 11. Significancia del tratamiento, actividad de PAL en tres niveles de intensidad de luz y tres niveles de tiempo.	59

I. INTRODUCCIÓN

Myroxylon balsamum (L.) Harms está considerada como una especie de interés comercial y de conservación, se encuentra dentro de la lista roja de especies amenazadas de Guatemala y Costa Rica. México debido a factores como el clima o la topografía, posee alrededor del 10 % de la flora del mundo, entre el 20 y el 30 % de las especies vegetales del país, son de tipo endémico y es además el centro de origen y diversidad de varias especies cultivadas. Actualmente, muchas de estas variedades están amenazadas por la destrucción de ecosistemas y la sustitución de cultivos tradicionales por variedades mejoradas (Knudsen, 2000).

El empleo de la micropropagación, ha sido para la producción comercial a gran escala y mejoramiento de especies forestales tradicionales como eucalipto, también para ornamentales leñosas temperadas como *Rhododendron* sp., lila *Syringa vulgaris*, o *Kalmia* sp. Hasta la presente fecha el único trabajo relacionado con cultivo *in vitro* de *M. balsamum* es el realizado por Maruyama *et al.* (1989).

Por la importancia forestal, maderable y medicinal de la especie *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, el presente trabajo busca evaluar las condiciones *in vitro* que permitan obtener un protocolo de multiplicación clonal de esta leguminosa arbórea tropical. Además, debido a que *M. balsamum* es considerado como una especie tolerante a la sombra (Souza y Válio, 2003), se pretende determinar la respuesta fotomorfogénica en explantes de segmentos nodales *in vitro*, y realizar la evaluación enzimática de Fenil alanina amonio liasa (PAL) en explantes de segmentos nodales a niveles de luz diferentes, información que no se conoce hasta el momento para esta especie.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan definir un protocolo para la propagación de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms.

2.2. Objetivos particulares

1. Evaluar las respuestas *in vitro* de segmentos nodales de *M. balsamum* en diferentes concentraciones de tidiazurón, benciladenina y 2,4-D bajo dos niveles de intensidad de luz.
2. Evaluar las respuestas morfogénicas en peciolos, raquis y foliolos de *M. balsamum* en diferentes concentraciones de 2,4-D y ácido naftalén acético y dos niveles de intensidad de luz.
3. Evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *M. balsamum* bajo diferentes concentraciones de ácido giberélico y benciladenina.
4. Comparar la actividad de PAL en células obtenidas a partir de segmentos nodales de *M. balsamum* en tres niveles de intensidad de luz.

III. HIPÓTESIS

Se plantearon las siguientes:

1. Existe diferencia entre las respuestas *in vitro* de segmentos nodales de *M. balsamum* a diferentes concentraciones de tidiazurón y benciladenina en dos niveles de intensidad de luz.
2. Existe diferencia entre las respuestas *in vitro* de segmentos nodales de *M. balsamum* a diferentes concentraciones de benciladenina, cinetina y 2,4-D.
3. Existe diferencia entre las respuestas *in vitro* de peciolo, raquis y folíolos de *M. balsamum* a diferentes concentraciones de 2,4-D y ácido naftalén acético y dos niveles de intensidad de luz.
4. Existe diferencia entre las respuestas *in vitro* de semillas de *M. balsamum* a diferentes concentraciones de ácido giberélico y benciladenina.
5. Existe diferencia entre la actividad enzimática de PAL en células obtenidas a partir de segmentos nodales de *M. balsamum* en tres niveles de intensidad de luz.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Descripción y distribución.

De acuerdo con Vivero *et al.* (2006), el nombre aceptado de esta especie es *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, conociéndose además diversas sinonimias como *Myroxylon balsamum* var. *pereirae* (Royle) Harms o *M. toluiferum* A. Rich.

En México se encuentra distribuido en el Golfo, Veracruz, Oaxaca, la Península de Yucatán y Chiapas (Pennington y Sarukhán, 2005).

Se distribuye también en Guatemala, Belice, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Brasil, Ecuador, Colombia, Perú y Venezuela (Vivero *et al.* 2006;; Villacrés, 1995).

M. balsamum es un árbol que alcanza alturas de 45 m y de diámetro normal de 1 m. Se encuentra en bosques primarios lluviosos perennes, a elevaciones de entre 100 a 700 msnm en climas muy húmedos. Preferentemente en suelos calcáreos o en aquellos derivados de materiales ígneos o en riscos, también en áreas planas totalmente drenadas (Vivero *et al.* 2006).

Las plantas pueden sobrevivir bajo condiciones diferentes de luz modulando el desarrollo de sus hojas de acuerdo con la luz ambiental, las hojas de sombra se forman bajo condiciones de luz baja. Este tipo de hojas son más anchas y de menor espesor, con razones de respiración y fotosíntesis menores en comparación con las hojas de luz (Ferjani *et al.*, 2008).

La tolerancia a la sombra es una combinación de mecanismos que mejoran la captura de luz reduciendo el gasto energético a través de la actividad respiratoria (Smith, 2000) Souza y Válio (2003) clasifican a *M. balsamum* como un árbol tolerante a la sombra.

4.2. Usos e importancia de *M. balsamum*

En Nicaragua, *M. balsamum* es usado para elaborar artesanías, en Panamá para fabricar parquet, puertas y muebles (Gillett y Ferriss, 2005).

Su madera es dura, pesada, resistente a deterioro y aromática, se usa en construcción, para manufacturar guitarras y marimbas y combustible; la resina es empleada en perfumería y como incienso. En medicina tradicional, se usa como expectorante, para curar afecciones respiratorias y sedante en casos de inflamación de la vejiga causada por bacterias (cistitis). Además los frutos secos son usados para tratar costras (Singleton y Sainsbury, 2006; Vivero *et al.*, 2006; Mathias *et al.*, 2000).

También se han probado extractos de tallo de *M. balsamum* para el tratamiento de hemorroides (Matlawska, 2002) y extractos de la corteza seca de como larvicidas en contra del mosquito portador del dengue *Aedes aegypti* (Simas *et al.* 2004).

De acuerdo con Vanaclocha y Cañigüeral (2003) la oleorresina conocida como Bálsamo de Tolú obtenida de troncos chamuscados y dañados de *M. balsamum* (usada como expectorante, antitusivo y antiséptico en forma de jarabe) se compone de ácido benzoico y benzoatos, ácido cinámico libre (entre 10 y 20 %) y cinamatos. Robles *et al.* (2000) mencionan que en El Salvador para el año 1998, el látex obtenido a partir de *M. balsamum* representó un volumen de 27291 kg·año⁻¹, y en Nicaragua *M. balsamum* es considerado como entre las ocho especies más importantes de plantas medicinales siendo su volumen de producción anual de 16000 kg·año⁻¹.

4.3. Conservación de *M. balsamum* y potencial de investigación biotecnológica

La creciente demanda de productos forestales, promueve el desarrollo de tecnologías que asistan a los programas tradicionales de cultivo de árboles,

con la finalidad de producir árboles fenotípicamente superiores y genéticamente mejorados (Yildirim *et al.*, 2006).

Vera (2003) estimó que en México existían más de 1000 árboles de *M. balsamum* en reservas o áreas naturales, más de 1000 en bosque ordenado, y más de quinientos en campos de aldeas y granjas.

El mismo autor destacó que en México, *M. balsamum* es una especie con un claro valor potencial o futuro en productos no maderables como goma, resina, aceite, taninos, medicinas, tintes y otros. Señaló también que dentro de las reservas ecológicas existen talas ilegales de esta especie, la que se encuentra clasificada dentro del grupo de especies sobre las cuales podrían ejecutarse regulaciones en su aprovechamiento y que contarían con una alta probabilidad de degradación o pérdida genética. Finalmente, determinó que *M. balsamum* se encuentra dentro de la lista de especies prioritarias en relación con:

- < Exploración taxonómica.
- < Recolección de material reproductivo para ensayo y evaluación.
- < Ensayo y evaluación (ensayos de campo a nivel de procedencia o progenie o a nivel clonal).
- < Uso de germoplasma procedente de selección y mejora genética.
- < Investigación sobre fenología, sistemas de mejora genética, floración, fructificación.

Y dentro de la lista de especies que deben estudiarse con urgencia inmediata en relación a:

- < Conservación y ordenación genética *in situ*.
- < Conservación *ex situ*.
- < Recolección de semillas o germoplasma para plantación.
- < Investigación sobre silvicultura y ordenación.

4.3.1. Cultivo *in vitro* de *M. balsamum*

La micropropagación es una de las más innovadoras técnicas para propagar asexualmente y de forma efectiva, plantas medicinales, aromáticas y para la explotación comercial de valiosos derivados farmacéuticos de plantas, puede producir grandes volúmenes de material vegetal élite a través de todo el año, sin los problemas derivados de las estaciones (Faisal *et al.*, 2005).

Maruyama *et al.* (1989), utilizaron como material de origen segmentos nodales de plántulas de *M. balsamum* de entre cinco a seis meses de edad y reportaron elongación de yemas en medio de plantas leñosas (del inglés Woody Plant Medium WPM) suplementado con $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de benciladenina (BA conocida también como bencilamino purina BAP). Además obtuvieron callos sobre la superficie de los cotiledones de semillas de *M. balsamum* en medio de plantas leñosas suplementado con $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido naftalénacético (NAA) y $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En ambos casos, el procedimiento de desinfestación incluyó la inmersión del material vegetal en etanol al 70 % durante 1 min, luego inmersión en una solución al 0.1 % de HgCl_2 y finalmente enjuague con agua destilada y esterilizada durante tres ocasiones.

En cambio, al reemplazar la solución al 0.1 % de HgCl_2 por una solución al 5 % de H_2O_2 durante 15 minutos y siguiendo el mismo procedimiento anterior para desinfectar semillas, se produjo la contaminación de las mismas. No especificaron si el tipo de contaminación fue bacteriana o fúngica.

Hasta la presente fecha, este es el único documento sobre el cultivo *in vitro* a partir de material vegetal de *M. balsamum*.

4.3.2. Enzimas

Son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas necesarias para la vida, la acción catalítica es usualmente muy específica y puede afectarse por la presencia de otras sustancias como inhibidores y coenzimas. Las coenzimas

son compuestos orgánicos que transforman la enzima a una forma catalíticamente activa.

Las enzimas se clasifican de acuerdo con el tipo de reacción catalítica, así se agrupan las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, ligasas y liasas, estas últimas catalizan la adición de grupos químicos a dobles enlaces (Missen *et al.* 1999).

De acuerdo con Whitford (2005) y Gilbert (2000), la velocidad (v), razón o actividad, de la reacción enzimática es proporcional a la remoción de sustrato (S) o alternatively a la razón de formación del producto (P) sobre la variación del tiempo.

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

4.3.3. L-Fenilalanina amonio liasa

La enzima L-Fenilalanina amonio liasa EC 4.3.1.5 (del inglés L-Phenylalanine Ammonia-Lyase PAL), es el vínculo entre el metabolismo primario y el secundario. PAL es una enzima ubíquita y constitutiva en todas las etapas de desarrollo de las plantas y ausente en animales, es una enzima clave en la respuesta al estrés, su biosíntesis se estimula por el ataque de patógenos, heridas en los tejidos (acumulada en la vecindad de tejido afectado), promotores de crecimiento, luz, bajas temperaturas, bajos niveles de nitrógeno, fosfato o hierro, aplicación herbicidas y fungicidas (Figura 1). (Vidhyasekaran, 2008; Ritter y Schultz, 2004; Sánchez *et al.*, 2000).

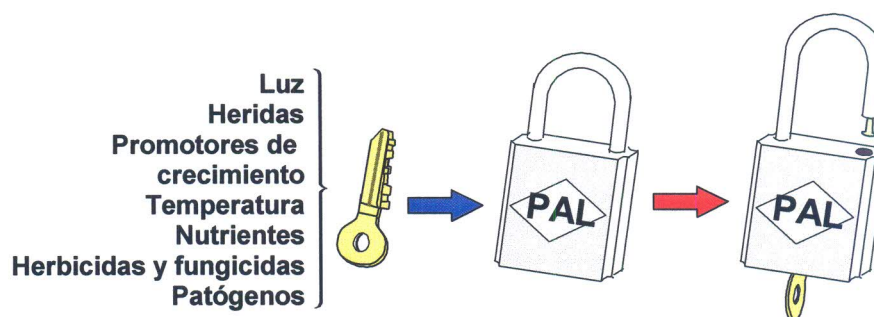


Figura 1. Factores que inducen la respuesta de PAL.

De acuerdo con Ritter y Schultz (2004), la enzima PAL cataliza la eliminación no oxidativa de amonio a partir de la L-fenilalanina para generar transcinamato (Figura 2), éste a su vez es el precursor de numerosos compuestos fenilpropánicos (Figura 3) que cumplen variadas funciones esenciales como mecanismos de soporte (ligninas), protectores contra factores estresantes bióticos y abióticos (antipatógenos, fitoalexinas, antioxidantes, y compuestos absorbentes de radiación UV) así como pigmentos (antocianinas), en señalización (formación de flavonoides que intervienen como factores de nodulación).

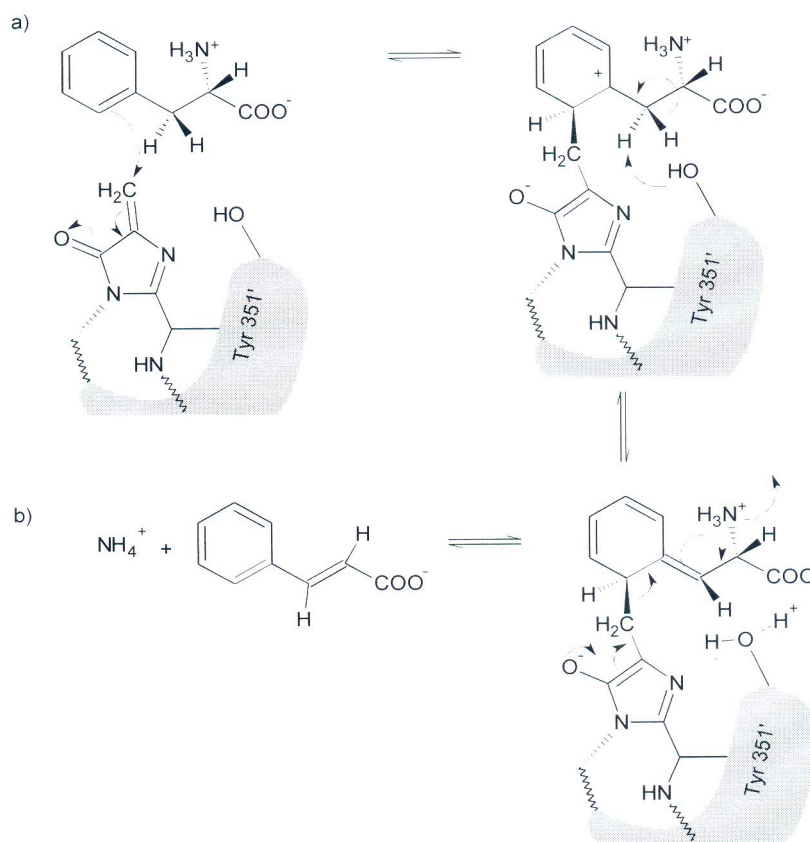
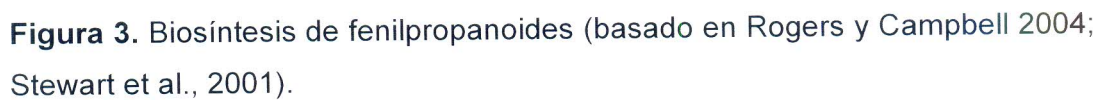


Figura 2. Mecanismo de eliminación de amonio a partir de L-fenilalanina. **a)** L-fenilalanina se une al centro activo de PAL. **b)** Eliminación de amonio y producción de transcinamato (basado en Ritter y Schultz, 2004).

Flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas.



La enzima es un tetrámero y contiene dos sitios activos por molécula (Vidhyasekaran, 2008). PAL es una proteína predominantemente α -helicoidal con el 52 % de residuos distribuidos en 23 α -hélices y apenas 5 % de residuos en ocho cadenas β (Ritter y Schultz, 2004).

La homología de PAL en plantas es de alrededor del 60 %. Muchas plantas contienen múltiples isoenzimas, *Arabidopsis thaliana* también posee las cuatro isoenzimas PAL1 a PAL4 (Ritter y Schultz, 2004).

El número de genes *pal* por genoma de planta haploide es variado, desde 1 a 5 hasta 40 a 50 en papa, en promedio se encuentran entre 3 y 4 de estos genes (Logemann, 1995).

PAL ha sido localizada mediante inmunofluorescencia e inmuno etiquetado mediante oro dentro de las regiones densas tubulares del retículo endoplásmico (Schöpker *et al.*, 1995).

En estudios de la actividad de PAL, Ritter y Schulz (2004) usaron L-fenilalanina como sustrato y midieron espectrofotométricamente la actividad de PAL, determinando el cambio en la concentración de transcinamato formado, teniendo el coeficiente de absortividad molar del transcinamato a 290 nm un valor de $\epsilon_{290} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

En plantas de perejil (*Petroselinum crispum*), Logemann *et al.* (1995) determinaron que la acumulación transitoria de PAL se originó por luz blanca que contenía luz UV, elicitores fungales y heridas. Además identificaron 4 genes de la familia de PAL, *pal1* y *pal2* son miembros cercanamente relacionados, sus promotores proximales a la caja TATA y regiones codificantes son prácticamente idénticas, y dos miembros adicionales *pal3* y *pal4* (Figura 4). De estos genes, *pal 1* hasta 3 están regulados de forma similar en hojas, raíces y cultivos de células, en cambio *pal4* exhibió expresión diferencial en respuesta a heridas en raíces, no así en hojas, además de no responder a estímulos luminosos.

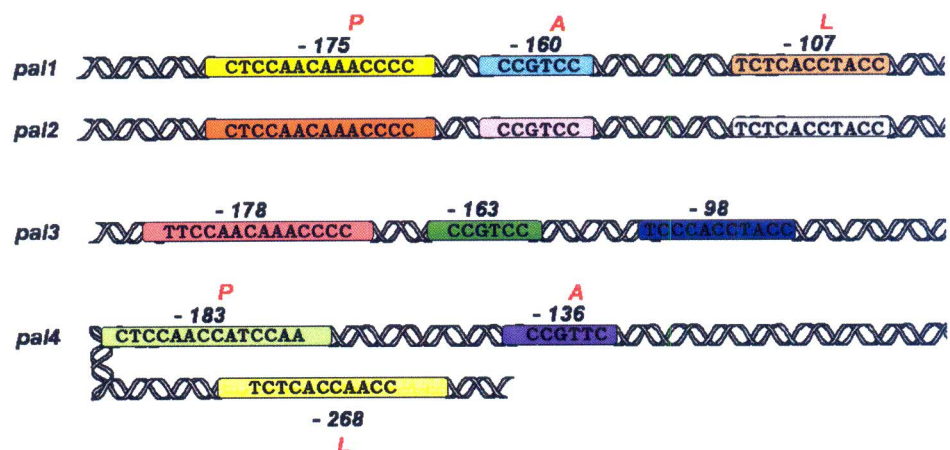


Figura 4. Promotores de genes *pal* en perejil (Basado en Logemann et al. 1995).

También mencionan que presumiblemente esta diferencia se debe a la distribución de los elementos *cis* conocidos como P, A y L.

4.4. Cultivo *in vitro* de leguminosas arbóreas leñosas y leguminosas

En un monitoreo extenso de taxa de plantas leñosas que incluyeron 126 especies entre 67 géneros, 33 familias, 16 órdenes y seis subclases se encontró que las especies del orden Fabales (incluyendo las leguminosas, exhibieron una respuesta positiva al cultivo *in vitro* con citocininas (Mudge y Brennan, 1999).

Husain *et al.* (2007) reportaron brotación múltiple a partir de segmentos cotiledonares en plántulas de 18 días de edad en la especie *Pterocarpus marsupium* Roxb. en medio Murashige y Skoog MS (1962) suplementado con tidiazurón (TDZ) a concentraciones de entre 0.022 hasta 2.2 mg·L⁻¹ (0.1 - 10.0 µM respectivamente), obteniendo la mayor frecuencia de regeneración y máximo número promedio de brotes a las seis semanas de cultivo a una

concentración de TDZ de $0.088 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0.4 \text{ }\mu\text{M}$). La elongación de brotes fue mayor en un medio suplementado con $1.125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($5.0 \text{ }\mu\text{M}$) de BA.

Finalmente, el mejor tratamiento para enraizamiento fue obtenido mediante medio Murashige y Skoog MS al 50 % suplementado con ácido indolbutírico (AIB) a una concentración de $0.0406 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0.2 \text{ }\mu\text{M}$) y $3.96 \text{ }\mu\text{M}$ de piroglucinol luego de cuatro semanas de siembra.

Agrawal y Sardar (2007) obtuvieron un mayor número promedio de embriones somáticos por callos de segmentos cotiledonares, a partir de semillas de *Cassia angustifolia* en dos medios diferentes, el primero MS suplementado con $0.563 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2.5 \text{ }\mu\text{M}$) de BA y $2.21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($10.0 \text{ }\mu\text{M}$) de 2,4-D y el segundo MS suplementado con $0.538 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2.5 \text{ }\mu\text{M}$) de cinetina (Kin) y $2.21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($10.0 \text{ }\mu\text{M}$) de 2,4-D.

4.5 Fotomorfogénesis

Es una propiedad esencial encontrada en prácticamente todas las etapas de la ontogenia de plantas superiores, muchas características morfo y fisiológicas usualmente constitutivas en una planta verde normal, son de hecho adaptaciones epigenéticas de la luz ambiental (Vince-Prue, 1994).

De acuerdo con el mismo autor, en plantas superiores para que la fotomorfogénesis y respuestas fotoperiódicas ocurran, la luz debe ser absorbida, esto ocurre principalmente por dos pigmentos fotoreceptores, el fotoreceptor de absorción azul/UV-A a veces llamado criptocromo y el fitocromo. El primero (probablemente una flavoproteína) absorbe luz solamente en el azul ($400\text{-}500 \text{ nm}$) y cerca del ultravioleta (UV-A $320\text{-}400 \text{ nm}$). El segundo absorbe principalmente en el rojo ($600\text{-}700 \text{ nm}$) y rojo lejano ($700\text{-}760 \text{ nm}$).

El nivel de irradiación es un factor ecológico importante de las plantas fotoautotrópicas, solamente la radiación fotosintéticamente activa (del inglés Photosynthetically Active Radiation PAR) comprendida entre 400 a 700 nm es la que interviene directamente en la fotosíntesis (Lambers *et al.*, 1998).

Debido a las características del fitocromo, para la fotomorfogénesis la calidad espectral de la radiación es el factor importante antes que la cantidad absoluta de radiaciones, esta calidad se expresa como la razón entre la radiación roja y roja lejana (Lambers *et al.* 1998; Vince-Prue, 1994).

$$R:RL = \frac{\text{Índice de afluencia de fotones en banda de } 10 \text{ } \eta m \text{ centrados en } 660 \text{ } \eta m}{\text{Índice de afluencia de fotones en banda de } 10 \text{ } \eta m \text{ centrados en } 730 \text{ } \eta m}$$

Por ejemplo, en la especie *Chenopodium album* expuesta a luz blanca uniforme, Smith (2000) reportó elongación incrementada de tallo a índices bajos de R:RL y encontró además un efecto cuantitativamente similar entre otras especies estudiadas.

Existen más de un tipo de proteína fitocromo y con diferentes características, particularmente con respecto a su estabilidad dentro de la planta, se ha sugerido que estos tipos de fitocromos tienen diferentes funciones biológicas pero esencialmente tiene la misma propiedad fotoquímica (Figura 5) la reversibilidad del pigmento a sus dos estados rojo (estado inactivo Pr) y rojo lejano (estado activo Prl) con cortos periodos de exposición en cada caso (Vince-Prue, 1994).

Los espectros de absorción del Pr y Prl muestran solapamiento considerable, a lo largo del espectro de luz visible, debido a esto los fitocromos están presentes en una mezcla en equilibrio de las dos formas bajo casi todas las condiciones de irradiación (Whitelam *et al.*, 1998).

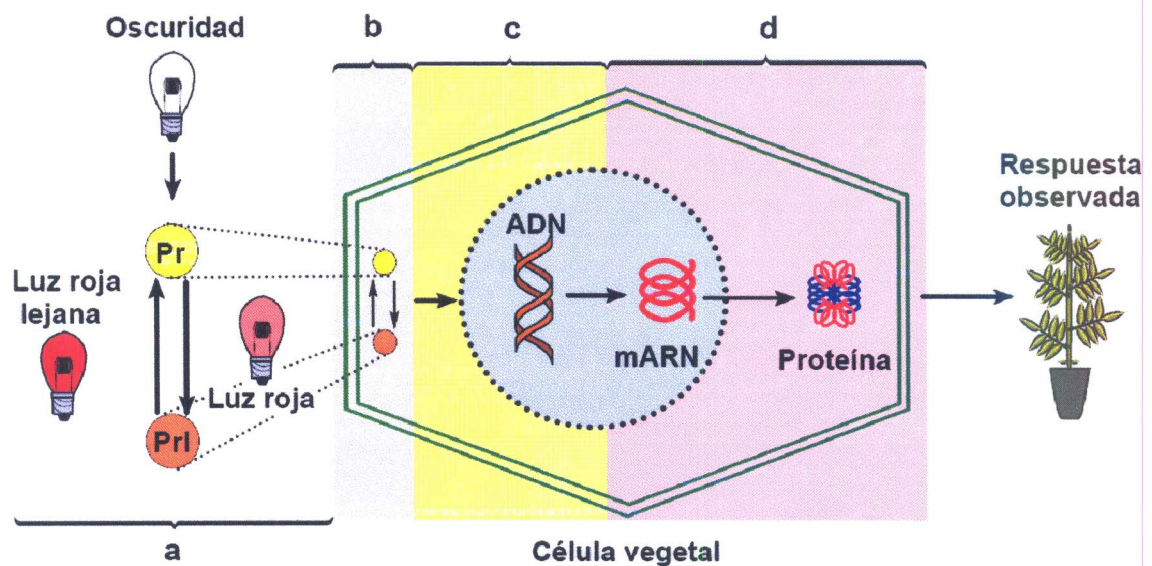


Figura 5. Representación esquemática de la fotomorfogénesis **a)** Estados activo e inactivo del fitocromo. **b)** Recepción, Pr sufre isomerización en una mezcla de Pr y PrI. **c)** La formación de Pr inicia la transducción, la señal luminosa es transferida a los genes de la planta dentro del núcleo celular. **d)** Genes inducidos inician transcripción y traducción hasta la formación de proteínas que regulan los ciclos de crecimiento de la planta (Basado en Jacobi *et al.*, 2005; Vince-Prue, 1994).

4.6 Cultivo de tejidos vegetales

4.6.1. Tipos de células vegetales

Trigiano y Gray (2005), mencionan que las células de plantas pueden ser de cuatro tipos, meristemáticas, parenquimáticas, colenquimáticas y esclerenquimáticas.

4.6.1.1 Meristemáticas

De acuerdo con Sussex y Kerk (2002), el meristemo es un sitio de división celular continua, característico de la mayoría de plantas multicelulares y se localiza en zonas específicas de las mismas. Los meristemos apicales del brote (shoot apical meristem SAM) y de raíz (root apical meristem RAM) se

encuentran en la punta de cada eje del brote o de la raíz respectivamente en plantas vasculares, un meristemo apical está también en la punta de cada brote axilar y en cada raíz lateral.

Las zonas meristemáticas donde se forman, especializan y diferencian las células, se encuentran separadas de las zonas funcionales compuestas por células maduras donde ocurren los procesos metabólicos, es así como las plantas crecen y mantienen constantemente su actividad metabólica total de forma balanceada (Fletcher, 2002; Sussex y Kerk, 2002).

Taiz y Zeiger (2002) denominan a los meristemos apicales de raíz y de brotes (formados durante la embriogénesis) como meristemos primarios. Después de la germinación la actividad de estos meristemos produce los tejidos y órganos que forman el cuerpo primario de la planta. Los meristemos secundarios post embriogénicos y presentes en la mayoría de plantas, incluyen los meristemos axilares, de inflorescencia, florales, intercalares y laterales. Los meristemos axilares se forman dentro de las axilas de hojas y se derivan del meristemo apical del brote, el crecimiento y desarrollo de estos producen ramas a partir del eje principal de la planta.

De acuerdo con Fletcher (2002), la formación del tallo ocurre dentro de las capas más profundas del meristemo, adicionando anchura al brote, los órganos en cambio se generan los flancos del meristemo, mientras que la reserva de células madre se mantienen en el ápice.

4.6.1.2. Parenquimáticas

Son células aproximadamente isodiamétricas (ancho y largo de igual longitud), de forma elongada o globular, que pueden encontrarse a lo largo del cuerpo de la planta, en tejidos primarios y secundarios, tienen núcleos y protoplastos funcionales (citoplasma). Estas células se consideran como relativamente indiferenciadas en comparación con las esclerenquimáticas y capaces de reanudar actividad meristemática mediante diferenciación. Este tipo

de células y tejidos se involucran con el desarrollo adventicio de raíces y brotes, cicatrización de heridas y otras actividades (Trigiano y Gray, 2005).

4.6.1.3. Colenquimáticas

Son más elongadas que las parenquimáticas, se especializan en formar el soporte mecánico de la planta, tienen paredes primarias suaves, flexibles, desigualmente delgadas, compuestas mayormente de celulosa con algo de pectina pero nunca lignina.

Son similares a las parenquimáticas en que tienen núcleo y protoplasma y son capaces de dediferenciación y actividad meristemática. Se encuentran generalmente en tallos jóvenes y pecíolos de hojas, funcionan como tejido de soporte flexible.

4.6.1.4. Esclerenquimáticas

Son células delgadas, largas o isodiamétricas hasta elongadas (esclereidas). Intervienen en soporte mecánico y conducción de agua, están dentro de los cuatro órganos mayores de las plantas. Tipos de células específicas incluyen fibras, elementos vasculares, traqueidas y esclereidas tomando varias formas, incluyendo astroesclereidas (de forma de estrellas), en forma de piedras y así por el estilo. Son altamente diferenciadas e incapaces de dediferenciarse y reanudar la actividad meristemática (Trigiano y Gray, 2005).

4.6.2. Producción *in vitro* de brotes

De acuerdo con Seedhabadee *et al.* (2002) complejos estímulos inducen una serie de eventos a nivel molecular apenas conocidos, que dictaminan el desarrollo de células en cultivo. El resultado de dichos eventos conduce a la producción de brotes *in vitro* a partir de cuatro rutas posibles:

- a) Elongación de meristemos dormantes.
- b) Formación adventicia de brotes.
- c) Organogénesis.
- d) Embriogénesis somática.

La ruta de formación adventicia involucra el desarrollo *de novo* de un brote o de brotes a partir de puntos diferentes a la axila de hojas o ápices.

4.6.3. Medios de cultivo

El medio más usado en cultivo de tejidos es el de Murashige y Skoog MS (1962), cerca del 70 % de procedimientos como la inducción de embriogénesis somática involucran el uso del medio MS. Ha probado ser satisfactorio para el cultivo de tejidos de muchas especies. Factores abióticos e interacciones pueden determinar la disponibilidad cuali y cuantitativa de los componentes del medio; además, las plantas no tienen acceso a todo el volumen del medio (Debergh *et al.*, 1994).

4.6.4. Reguladores de crecimiento y hormonas

Las hormonas son sustancias encontradas de forma natural dentro de los tejidos (endógenas) que tienen una función de regulación del crecimiento y desarrollo, los reguladores de crecimiento de plantas (del inglés Plant Growth Regulators PGRs) son de origen sintético con actividades fisiológicamente similares a las hormonas y se añaden a los medios de cultivo (exógenos). Estos dos tipos de sustancias son activas a muy bajas concentraciones (George, 2008).

Beyl (2005) menciona que a concentraciones de entre 0.001 a 10 μM , los reguladores de crecimiento de plantas demuestran su efecto.

4.6.4.1. Auxinas

De acuerdo con Mehdi (2002), las plantas y cultivos poseen ácido indol acético de forma natural, se ha aislado también de bacterias, hongos y plasmolisados de levadura, su función aun no es clara en estos últimos.

El mismo autor menciona que hay muchos compuestos sintéticos puros que imitan la acción fisiológica similar al del IAA; sin embargo, la tendencia en años recientes es el de usar hormonas naturales de plantas para regular el crecimiento de cultivos y aumentar la producción. Esto debido a que actúan en bajas concentraciones y son totalmente degradados, por tanto no son amenazas ambientales o ecológicas.

Las auxinas son químicamente diversas pero pueden ser clasificadas en cinco categorías mayores:

- a) Ácidos indol acéticos.
- b) Ácidos naftalénicos como el ácido naftalenacético (ANA).
- c) Ácidos clorofenoxi como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético o 2,4-D (Figura 6) conocido por ser un poderoso defoliante y herbicida cuando se usan en altas concentraciones.
- d) Derivados del ácido benzoico.
- e) Derivados del ácido picolínico.

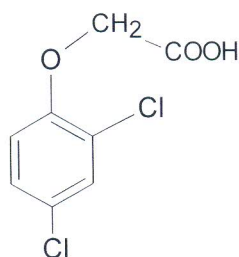


Figura 6. Estructura química del Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Taiz y Zeiger, 2002).

Las auxinas son abundantes en regiones meristemáticas, hojas jóvenes, órganos florales, frutos en desarrollo y semillas, la concentración de AIA es alta en órganos jóvenes de crecimiento rápido (Mehdi, 2002; George, 2008).

George (2008) menciona que la concentración de las auxinas decrece con la edad y es afectada además por factores externos como la longitud de onda de la luz, su intensidad y el fotoperiodo. Por ejemplo, en plantas de *Chenopodium rubrum*, el contenido endógeno de AIA fluctúa bajo un régimen de fotoperiodo y cuando las plantas son mantenidas en oscuridad constante (Figura 7).

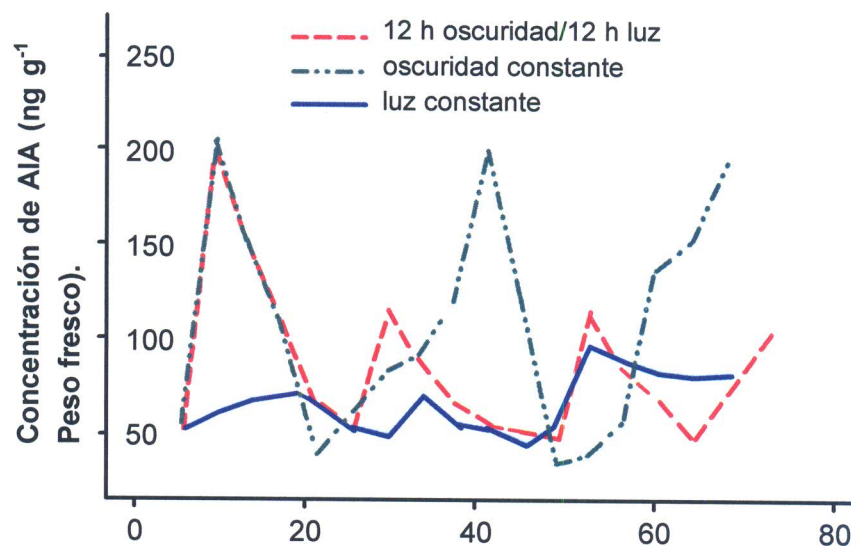


Figura 7. Concentración de AIA libre en *Chenopodium rubrum* bajo diferentes regímenes de fotoperiodo, basado en George (2008).

La respuesta de la auxina se relaciona con la concentración, la cuál es de forma normal, extremadamente baja. En plantas, el IAA libre está en el orden de 10^{-8} g/kg de peso fresco (Mehdi, 2002).

4.6.4.2. Citocininas

De acuerdo con Carra *et al.* (2006) se descubrieron como hormonas de plantas al promover la división celular y diferenciación en cultivos de tejidos de

tabaco, desde entonces han mostrado regular una variedad de actividades biológicas en todas las plantas y cultivos de tejidos, promueven el crecimiento de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y suprimen la senescencia de las hojas en todas las plantas, también median algunos procesos regulados por la luz como la de etiolación y diferenciación de cloroplastos, se ha demostrado que inducen la muerte celular programada en animales y plantas.

Iriondo *et al.* (1995) obtuvieron brotación múltiple a partir de segmentos nodales de árboles maduros de *Elaeagnus angustifolia* L. cultivados en medio MS y suplementados con $0.88 \mu\text{M}$ ($0.198 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de BA.

La actividad de citocinina es una propiedad de dos clases de compuestos, los que se encuentran de forma natural derivados de adenina N6-sustituídos y los derivados sintéticos de fenilurea (Figura 8). La difenil urea DPU (Diphenylurea) fue la primera fenilurea identificada con actividad de citocinina y este descubrimiento fue seguido por la síntesis de análogos como el N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ilurea o tidiazurón TDZ (thidiazuron), con actividad de citocinina incluso mayor que aquellas derivadas de tipo adenina (Carra *et al.*, 2006).

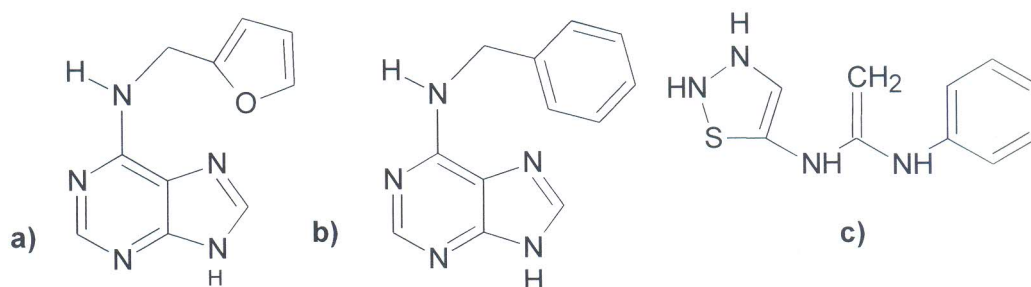


Figura 8. Estructuras químicas de tres citocininas. **a)** Cinetina KIN. **b)** Benciladenina BA. **c)** Tidiazurón TDZ. (Basado en Taiz y Zeiger, 2002)

Muchas especies de plantas leñosas, en particular árboles leguminosos se conocen por su naturaleza recalcitrante de regeneración (Husain *et al.*,

2007), el TDZ ha sido usado para facilitar el cultivo de brotes de especies leñosas recalcitrantes (Kane, 2005).

De forma general Banerjee *et al.* (2004) mencionan que las especies de plantas que exhiben morfogénesis con la sola presencia del TDZ ha aumentado con el paso de los años facilitando el mejoramiento en la tecnología del cultivo de tejidos.

4.6.4.3. Combinaciones de auxinas y citocininas

De acuerdo con Kane (2005) las citocininas endógenas se sintetizan en las puntas de la raíz y las auxinas en los primordios de hojas, por tanto los explantes pequeños (especialmente los domos de meristemas apicales) exhiben gran dependencia de citocininas y auxinas exógenas para tener una máxima sobrevivencia y desarrollo de los brotes. En cambio explantes de brotes más grandes por lo general no necesitan de una auxina para el establecimiento del cultivo.

La respuesta de explantes en medios de cultivo es a veces similar, por ejemplo razones altas de concentración de auxina sobre concentración de citocinina inducen formación de raíces en brotes e iniciación de callos en monocotiledóneas (Gaba, 2005; Taiz y Zeiger, 2002).

George (2008) menciona que concentraciones de 0.5 μM de citocinina o menos, se consideran como bajas (tomando como ejemplo al TDZ esta concentración equivaldría a 0.11 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y a partir de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se consideran como concentraciones altas.

La respuesta morfogénica en función de la combinación de auxinas y citocininas de forma general es la siguiente (Figura 9):

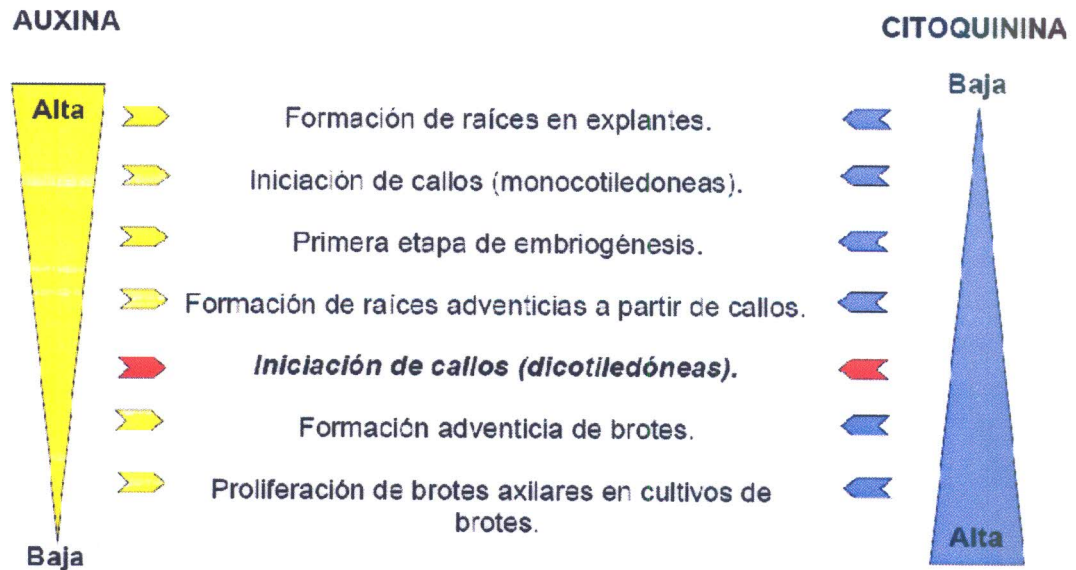


Figura 9. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas y su efecto en crecimiento y morfogénesis (Basado en George *et al.*, 2008).

4.6.4.4. Giberelinas

Las giberelinas son menos usadas en cultivo de tejidos, el ácido giberélico es sensible al calor, luego del autoclaveado el 90 % de su actividad biológica se pierde, típicamente se filtra y se adiciona al medio autoclaveado luego de que éste se ha enfriado.

Ayuda a estimular la elongación de internodos y ha probado ser necesario para el crecimiento de meristemos para algunas especies (Beyl, 2005).

De acuerdo con Gaba (2005), la giberelinas tienen cerca de 100 diferentes variantes, el ácido giberélico es la giberelina más usada de todas. Controlan la longitud del tallo, floración y fructificación.

El ácido giberélico ha sido generalmente usado para estimular la elongación o la conversión de yemas en brotes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sitio de colecta

Las semillas utilizadas en los ensayos de germinación se colectaron en noviembre del año 2006 en el Municipio de San Andrés Tuxtla, Edo. de Veracruz, en el fraccionamiento del Salto de Eyipantla ubicado a 18°22'55" latitud Norte y 95°12'17" longitud Oeste y 163 msnm (Figura 10).

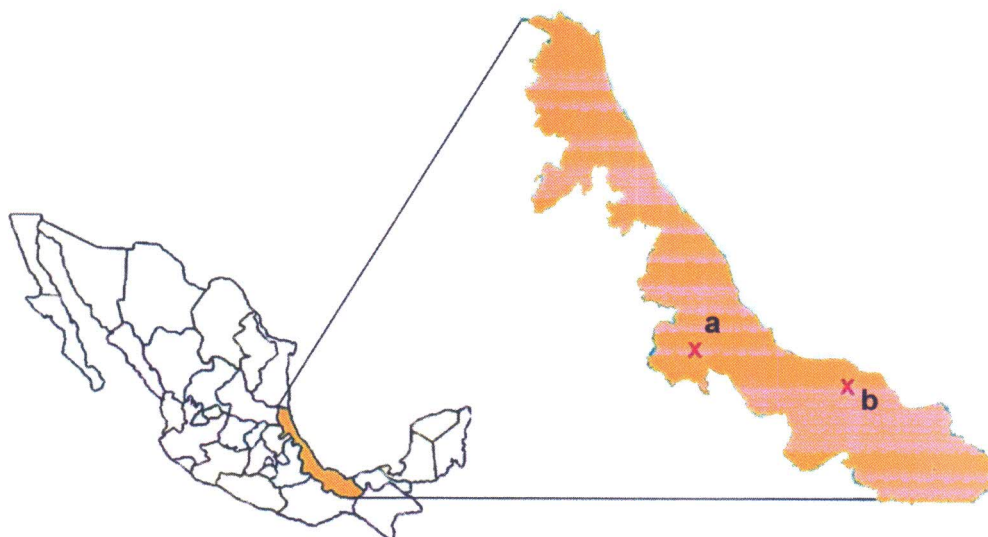


Figura 10. Sitios de colecta en el Edo. de Veracruz. **a)** El Palmar, Municipio de San Gabriel de Tezonapa. **b)** Salto Eyipantla, San Andrés Tuxtla.

El material vegetal usado en los ensayos con peciolos, raquis y foliolos a partir de árboles adultos fue colectado en el Municipio de San Gabriel de Tezonapa Edo. de Veracruz, en el Campo Experimental El Palmar.

Los demás ensayos se realizaron mediante explantes obtenidos de plantas de *M. balsamum*, material vegetal correspondiente a la investigación "Germinación y desarrollo de *Myroxylon balsamum* (L) Harms y su asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico" de ocho meses de edad, dispuestas en un invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo.

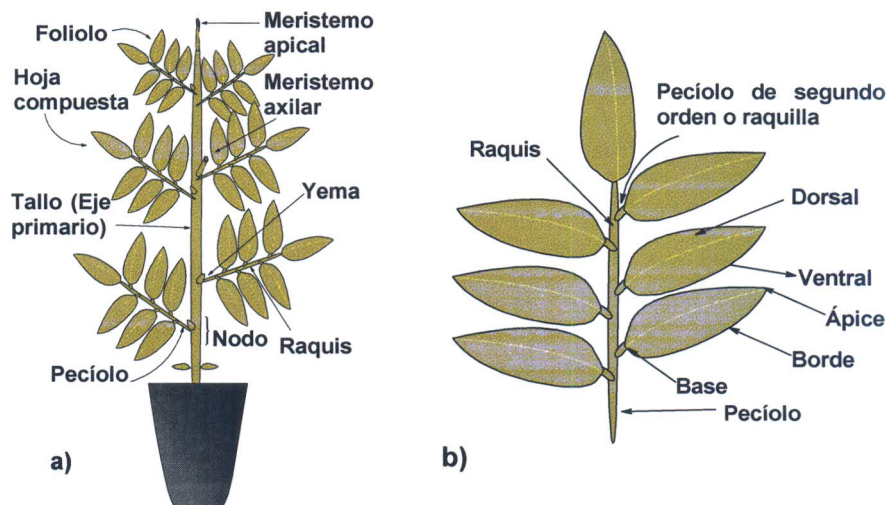


Figura 11. Ilustración de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. **a)** Planta completa. **b)** Hoja compuesta.

5.2. Medios y condiciones de cultivo.

Se utilizó el medio Murashige y Skoog MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100 %, suplementado con $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de mioinositol, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de hidrocloreuro de tiamina, además de sacarosa al 3 % (p/v). Este medio se identificó en el presente estudio como medio basal MSB.

Se midió y ajustó el pH a 5.70 ± 0.1 mediante un potenciómetro (Orion Research, Orion Research Incorporated, USA) previo el aforo al volumen requerido y la adición de agar al 0.7 % (p/v). El medio MSB sin reguladores, se usó como control en cada ensayo. Los reguladores, dependiendo del tipo de ensayo se adicionaron previo al ajuste del pH, el carbón activado, a menos que se especifique, se adicionó después del agar. Ninguno de los ensayos tuvo menos de cinco repeticiones por tratamiento.

Los medios de cultivo una vez distribuidos en tubos de ensayo, se esterilizaron en autoclave a 121°C y $1.1 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ durante 20 minutos.

El lavado del material vegetativo fue con agua, jabón y Tween 80. Posteriormente, dentro de la cámara de siembra, se pasó el material a inmersión en alcohol etílico al 70 % durante tres minutos, seguido de inmersión

en solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 20 % durante diez minutos. Finalmente enjuague con una solución de antioxidantes esterilizada (ácido cítrico $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y ácido ascórbico $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante tres ocasiones.

Los ensayos se mantuvieron en un cuarto de incubación con un régimen de fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de sombra a una temperatura máxima promedio de 25°C y mínima promedio de 18°C . Los ensayos se realizaron en oscuridad, y en intensidades de luz de 10 y $49 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, medida mediante un fotómetro portátil (BioScientific LTD. USA).

Los ensayos a oscuridad se conservaron dentro de una incubadora (Lab Line® Imperial II Incubator, LabLine Instruments INC., USA) a 25°C .

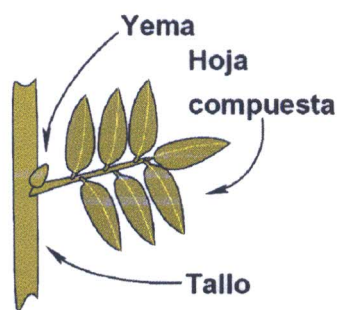
5.3. Respuestas *in vitro* de *M. balsamum*.

5.3.1. Segmentos nodales en Tidiazurón (TDZ) y Benciladenina (BA)

Los factores en estudio fueron la concentración de TDZ, BA e intensidad luminosa. Se realizaron ensayos con TDZ, TDZ y BA a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y en oscuridad. El medio MSB se suplementó con TDZ a diferentes concentraciones (0.088, 0.132, 0.22 y $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y al suplementarse con BA se añadió $1.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para todos los tratamientos donde se utilizaron segmentos nodales de *M. balsamum* se escogieron aquellos que poseían yemas axilares. Los segmentos se separaron del tallo mediante un bisturí, el tamaño del explante fue en cada caso, de 0.5 cm de longitud (Figura 12) y se sembraron verticalmente. Las variables en estudio fueron longitudes de yemas y diámetros de callo, las longitudes y diámetros se midieron mediante una regla común con una apreciación de $\pm 0.1 \text{ cm}$.

Al doceavo día, con la finalidad de recuperar el tejido vegetal necrosado en los explantes de los tratamientos con TDZ y BA a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (i1c1 a i1c5, se pasaron a un medio fresco MSB suplementado con BA ($1.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).



a) **b)**
Figura 12. Explantes de *M. balsamum* a) Yema. b) Segmento nodal y yema axilar vista al estereomicroscopio.

5.3.1.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en diferentes concentraciones de TDZ y dos niveles de intensidad de luz

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con factoriales 5 x 2 (cinco niveles de TDZ y dos niveles de intensidad de luz). Se utilizaron seis repeticiones para cada combinación de los niveles de los factores, un explante por unidad experimental, con un total de 60 explantes por ensayo. Los factores concentraciones de TDZ (adicionado al medio MSB), fueron los siguientes:

c1= TDZ ($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c2= TDZ ($0.088 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c3= TDZ ($0.132 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c4= TDZ ($0.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c5= TDZ ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Los factores de intensidad de luz fueron los siguientes:

i1= $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

i2= oscuridad.

5.3.1.1.1. Modelo estadístico

De acuerdo con Montgomery y Runger (2004), el análisis de varianza correspondiente, se representa por el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad \left\{ \begin{array}{l} i=1,2,\dots, a \\ j=1,2,\dots, a \\ k=1,2,\dots, a \\ l=1,2,\dots, a \end{array} \right.$$

En el cual se definió como la media global a μ , τ_i es el efecto del i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ, β_j es el efecto del bloque j-ésimo, γ_k es el efecto del k-ésimo nivel del factor intensidad de luz, $(\tau\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ y del bloque j-ésimo, $(\tau\gamma)_{ik}$ es el efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ y el k-ésimo nivel del factor intensidad de luz, $(\beta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre el bloque j-ésimo y el k-ésimo nivel del factor intensidad de luz, $(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ, el j-ésimo bloque y k-ésimo nivel del factor intensidad de luz. Y ε_{ijkl} es el error aleatorio con media igual a cero y varianza σ^2 .

Se definió a la Hipótesis nula como $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$

Y la Hipótesis alterna, $H_1: \tau_i \neq 0$ para al menos una i.

$$\alpha = 0.05$$

El criterio de rechazo de H_0 fue:

$$\text{si } f_0 > f_{\alpha, a-1, (a-1)(b-1)(c-1)}.$$

5.3.1.1.2. Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó mediante SAS® 8.00 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) Las diferencias entre tratamientos y niveles del factor concentración de TDZ e intensidad de luz se determinaron mediante la prueba de Tukey con una significancia de $\alpha = 0.05$.

5.3.1.2. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en TDZ y BA y dos niveles de intensidad de luz

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con factoriales 5×2 (cinco niveles de TDZ y dos niveles de intensidad de luz). Se utilizó seis repeticiones para cada combinación de los niveles de los factores, un explante por unidad experimental, con un total de 60 explantes por ensayo.

Los factores concentraciones de TDZ y BA (adicionado al medio MSB), fueron los siguientes:

c1= TDZ ($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + BA ($1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c2= TDZ ($0.088 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + BA ($1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c3= TDZ ($0.132 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + BA ($1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c4= TDZ ($0.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + BA ($1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

c5= TDZ ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + BA ($1.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Los factores de intensidad de luz fueron las siguientes:

i1= $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

i2= oscuridad.

5.3.1.2.1. Modelo estadístico

De acuerdo con Montgomery y Runger (2004), el análisis de varianza correspondiente, se representa por el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad \left\{ \begin{array}{l} i=1,2,\dots, a \\ j=1,2,\dots, a \\ k=1,2,\dots, a \\ l=1,2,\dots, a \end{array} \right.$$

En el cual se definió como la media global a μ , τ_i es el efecto del i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ + BA, β_j es el efecto del bloque j-ésimo, γ_k es el efecto del k-ésimo nivel del factor intensidad de luz, $(\tau\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ + BA y del bloque j-ésimo, $(\tau\gamma)_{ik}$ es el efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ + BA y el k-ésimo nivel del factor intensidad de luz, $(\beta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre el bloque j-ésimo y el k-ésimo nivel del factor intensidad de luz, $(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel del factor concentración de TDZ + BA, el j-ésimo bloque y k-ésimo nivel del factor intensidad de luz. Y ε_{ijkl} es el error aleatorio con media igual a cero y varianza σ^2 .

Se definió a la Hipótesis nula como $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$

Y la Hipótesis alterna, $H_1: \tau_i \neq 0$ para al menos una i.

$\alpha = 0.05$

El criterio de rechazo de H_0 fue:

si $f_0 > f_{\alpha, a-1, (a-1)(b-1)(c-1)}$.

5.3.1.2.2. Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó mediante SAS[®] 8.00 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) Las diferencias entre tratamientos y niveles del factor concentración de TDZ + BA se determinaron mediante la prueba de Tukey con una significancia de $\alpha = 0.05$.

5.3.2. Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D

El factor en estudio fue la composición de la solución. Los segmentos nodales se sembraron en medio MSB con carbón activado (0.1 %) y sin carbón activado (0.0 %), suplementado además con BA (1 y 3 mg·L⁻¹), KIN (0.5, 1 y 3 mg·L⁻¹) y 2,4-D (0.2, 0.3 y 0.5 mg·L⁻¹).

Las variables en estudio fueron longitud de yemas y diámetro de callos. Se midió el diámetro del callo en centímetros mediante una regla común con una apreciación de ± 0.1 cm, a los nueve días de siembra, de ser el caso, para los callos no isodiamétricos se obtuvo el diámetro promedio.

5.3.2.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D y carbón activado

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), se utilizaron seis repeticiones para cada combinación de los niveles del factor, un explante por unidad experimental, con un total de 18 explantes por ensayo.

Los niveles del factor composición de la solución de promotores adicionado al medio MSB, fueron los siguientes:

C1= BA (1 mg·L⁻¹) + KIN (0.5 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.2 mg·L⁻¹) y 0.1 % carbón activado

C2= BA (3 mg·L⁻¹) + KIN (1 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.3 mg·L⁻¹) y 0.1 % carbón activado

C3= BA (3 mg·L⁻¹) + KIN (3 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.5 mg·L⁻¹) y 0.1 % carbón activado

5.3.2.1.1. Modelo estadístico

Se definió como la media global μ , τ_i es el efecto del tratamiento i -ésimo de la composición, β_j es el efecto del bloque j -ésimo y ε_{ij} es el error aleatorio con media igual a cero y varianza σ^2 .

De acuerdo con Montgomery y Runger (2004) el análisis de varianza correspondiente, se representa por el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, a \end{cases}$$

Se definió a la Hipótesis nula como $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$

Y la Hipótesis alterna, $H_1: \tau_i \neq 0$ para al menos una i .

$\alpha = 0.05$

El criterio de rechazo de H_0 fue si $f_0 > f_{\alpha, a-1, (a-1)(b-1)}$.

5.3.2.1.2. Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó mediante SAS[®] 8.00 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) Las diferencias entre niveles del factor composición se determinaron mediante la prueba de Tukey con una significancia de $\alpha = 0.05$.

5.3.2.2. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D sin carbón activado

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), se utilizó ocho repeticiones para cada combinación de los niveles del factor, un explante por unidad experimental, con un total de 24 explantes por ensayo.

Los niveles del factor composición de la solución de promotores adicionado al medio MSB, fueron los siguientes:

C1= BA (1 mg·L⁻¹) + KIN (0.5 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.2 mg·L⁻¹) y 0.0 % carbón activado

C2= BA (3 mg·L⁻¹) + KIN (1 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.3 mg·L⁻¹) y 0.0 % carbón activado

C3= BA (3 mg·L⁻¹) + KIN (3 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.5 mg·L⁻¹) y 0.0 % carbón activado

5.3.2.2.1. Modelo estadístico

Se definió como la media global μ , τ_i es el efecto del tratamiento i-ésimo de la composición, β_j es el efecto del bloque j-ésimo y ε_{ij} es el error aleatorio con media igual a cero y varianza σ^2 .

De acuerdo con Montgomery y Runger (2004) el análisis de varianza correspondiente, se representa por el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, a \end{cases}$$

Se definió a la Hipótesis nula como $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$

Y la Hipótesis alterna, $H_1: \tau_1 \neq 0$ para al menos una i .

$\alpha = 0.05$

El criterio de rechazo de H_0 fue si $f_0 > f_{\alpha, a-1, (a-1)(b-1)}$

5.3.2.2.2. Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó mediante SAS[®] 8.00 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) Las diferencias entre niveles del factor composición se determinaron mediante la prueba de Tukey con una significancia de $\alpha = 0.05$.

5.3.3. Peciolas, raquis y folíolos en 2,4-D y ANA

Los explantes obtenidos de árboles maduros se trataron mediante tres procedimientos diferentes, en el primero se desinfectaron los explantes de la forma usual descrita anteriormente. En el segundo luego del lavado, se dejó en inmersión en alcohol etílico al 70 % para luego pasar a solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 20 % durante 15 minutos, seguido de enjuague con agua esterilizada e inmersión mediante agitación durante 24 h en solución de Agrimicin[®] al 2 % para finalizar enjuagando con agua oxigenada comercial y sembrar los explantes. El tercer procedimiento involucró la inmersión de los

tejidos en solución 0.1 % de cloruro mercuríco durante 10 minutos posterior a la inmersión en alcohol etílico a 70 % durante tres minutos.

En los tres casos, se sembraron solamente raquis con porción de raquilla que se colocaron en medio MSB suplementado con TDZ a diferentes concentraciones (0.088, 0.132, 0.22 y 2.2 mg·L⁻¹) en condiciones normales de luz.

Los explantes obtenidos de vivero se desinfectaron de la forma usual, y en un primer ensayo se sembraron en medio MSB suplementado con TDZ (0.088, 0.132, 0.22 y 2.2 mg·L⁻¹) y BA a una concentración de 1.1 mg·L⁻¹, para este ensayo se utilizó raquis con porción de raquilla.

En ensayos subsecuentes y mediante el mismo procedimiento de desinfección, se sembraron los explantes en medios basales MBS con 0.1 % de carbón activado suplementados con 2,4-D (1.0, 3.0 y 10.0 mg·L⁻¹) y ANA (0.3, 1.0 y 3 mg·L⁻¹), en este caso se utilizó peciolo, raquis con raquilla y folíolos con nervadura y sin nervadura.

El procedimiento para cortar los explantes (Figura 13) de forma general fue el siguiente:

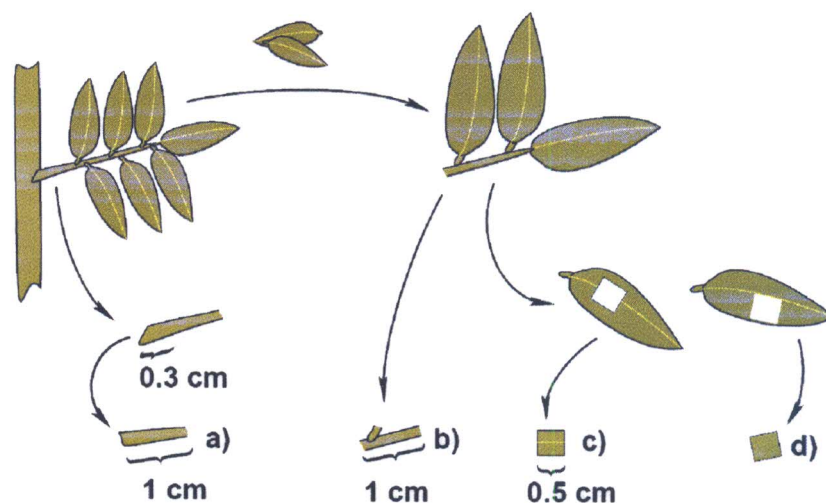


Figura 13. Diagrama de corte de explantes de *M. balsamum* a) Peciolo. b) Raquis con porción de raquilla. c) Foliolo con nervadura. d) Foliolo sin nervadura.

a) Se cortaron peciolo de 1 cm de longitud, medidos aproximadamente a 0.3 cm del punto de unión con el tallo.

b) Los raquis también de 1 cm de longitud, se cortaron además con una porción de raquilla, sin foliolo.

Finalmente los foliolos, se cortaron en cuadros pequeños de aproximadamente 0.5 cm de lado c) con nervadura y d) sin nervadura.

En todos los ensayos, se sembraron horizontalmente los explantes sobre la superficie del medio, los foliolos se sembraron sobre la parte ventral.

5.3.4. Semillas en AG₃, 2,4-D y BA

En todos los ensayos se utilizaron frutos inmaduros (Figura 14) y luego se desprendió la mayor cantidad posible de la testa del fruto, posteriormente se lavaron los frutos vigorosamente con abundante agua y jabón.

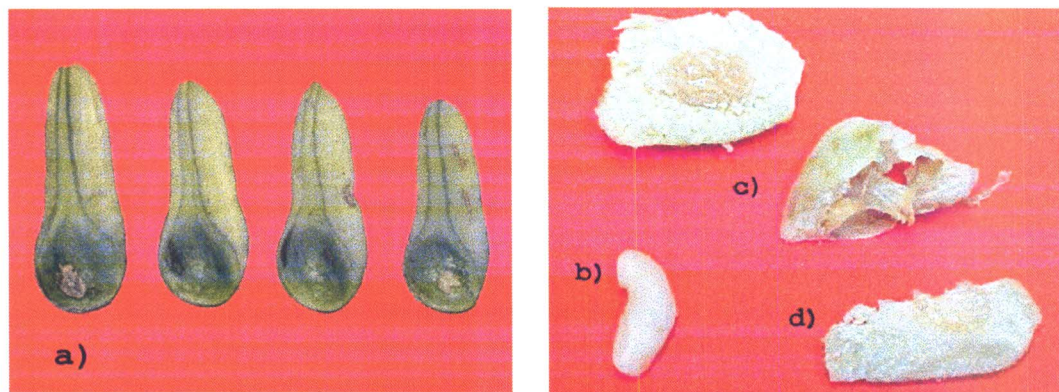


Figura 14. Fruto de *M. balsamum* a) Fruto inmaduro (Fotografía por Sophia Loayza). b) Semilla de *M. balsamum*. c) Testa. d) Cubierta seminal.

Se efectuaron tres ensayos diferentes (Figura 15) descritos a continuación:

1) Posterior al lavado se sumergieron los frutos en C_2H_5OH al 70 % durante tres minutos, luego en H_2O_2 al 40 % durante 10 minutos. Se efectuó un corte a lo ancho de la semilla en la mitad. Se sembraron por separado en medio MSB con carbón activado (0.1 %) ambos medios suplementados con BA (0.1 y $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

2) Luego del lavado los frutos se sumergieron en C_2H_5OH al 70 % durante tres minutos luego en Cloralex (20 %) durante 10 minutos. Se efectuó un corte a lo ancho de la semilla separando un tercio de los cotiledones y las dos terceras partes restantes con la plúmula y la radícula, se sembraron por separado los cotiledones y el resto de la semilla en un medio MSB sin carbón activado, suplementado con BA ($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 2,4-D ($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

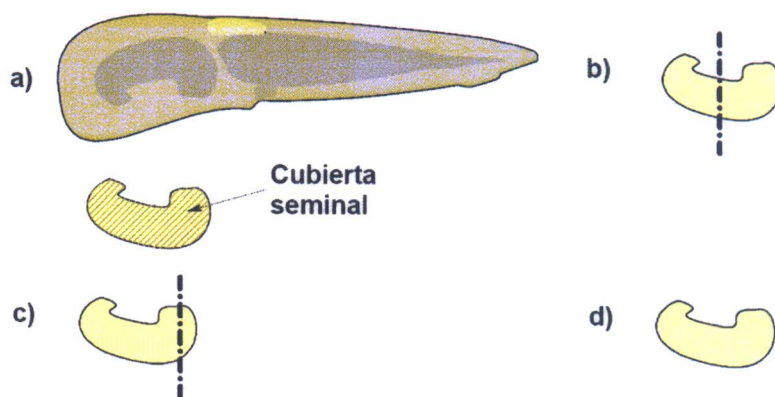


Figura 15. Semillas en AG_3 , 2,4-D y BA. **a)** Ilustración del fruto y semilla de *M. balsamum*. **b)** Corte de la semilla, ensayo 1. **c)** Corte de la semilla, ensayo 2. **d)** Ensayo 3, sin corte.

3) Los frutos se desinfectaron luego del lavado con detergente, mediante inmersión en alcohol etílico al 70 % durante tres minutos, seguido de inmersión en solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex) al 20 % durante 10 minutos, posteriormente inmersión en agua oxigenada comercial sin diluir durante 24 horas en agitación mecánica a 100 rpm (Lab Line® Orbit shaker

N° 3590, Lab-Line Instruments, Inc. USA). Previo a la siembra, se enjuagaron los frutos mediante solución antioxidante y se sembraron las semillas enteras de forma horizontal sobre la superficie del medio. Se utilizó el medio MSB suplementado con BA (0.1, 0.3 y 1 mg·L⁻¹) y AG₃ (0.1, 1 y 3 mg·L⁻¹).

Todos los ensayos de semillas se efectuaron a una intensidad de luz de 10 μmol·m⁻²·s⁻¹.

5.3.5. Ensayo enzimático

El factor en estudio fue la intensidad de luz, la variable en estudio fue la actividad de PAL. Se utilizaron segmentos nodales de plantas de *M. balsamum*, los segmentos se cortaron y se sembraron en medio basal MS al 100 % suplementado con 5 mg·L⁻¹ de KIN, 1 mg·L⁻¹ de BA y 0.2 mg·L⁻¹ de 2,4-D. Los tubos de ensayo conteniendo los segmentos se colocaron bajo tres niveles de luz; oscuridad, 10 y 49 μmol·m⁻²·s⁻¹ (cinco repeticiones por tubo) y se retiraron a los 16 días momento en el cual se efectuó el ensayo enzimático.

Los segmentos nodales se pesaron y se colocaron dentro de viales, a partir de una adaptación del procedimiento descrito por Gurr *et al.* (1992) se adicionó en cada vial una cantidad de solución 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) que contenía 14 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma® M3148, USA) y polivinilpirrolidona (PVP K-30, Matherson Coleman & Bell Manufacturing Chemists, USA, peso molecular promedio 40000 g·mol⁻¹) al 5 % (p/v). La proporción utilizada fue de 1:5 partes.

Posteriormente se molieron dentro de los viales los segmentos nodales mediante una aguja de disección, luego se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos en una centrífuga (Centrifuge S424, Eppendorf, Alemania).

Del sobrenadante se tomó 0.1 mL de cada vial y se incubó a 40°C en un termoblock (Standard heathblock, VWR Scientific Products, USA), con 0.9 mL de solución acuosa 12.1 mM de L-fenilalanina (7256, Merck, Alemania al 99 %), paralelamente se incubaron 0.1 mL de sobrenadante junto con 0.9 mL de

solución acuosa 12.1 mM de D-fenilalanina (P1751, Sigma-Aldrich™ Inc., USA al 98 %) como control.

Se calculó la actividad (v) de PAL en $\mu\text{kats}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco de explante, monitoreando el cambio en la concentración de transcinamato por unidad de tiempo. Se realizaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro ultravioleta (JenWay 6305, Reino Unido) a 290 nm mediante una celda de cuarzo de un centímetro de longitud, en intervalos de 30 minutos para los niveles de oscuridad, 10 y 49 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ considerando la absortividad molar del transcinamato a 290 nm como $\epsilon_{290} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$v = \frac{\Delta \left[\frac{\text{Trans cinamato}}{\text{peso de explante}} \right]}{\Delta t} = \frac{\Delta[\text{Absorbancia}]}{\epsilon_{290} \cdot \Delta t \cdot (\text{peso de explante})}$$

5.3.5.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental, actividad de PAL en tres niveles de intensidad de luz

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con cinco repeticiones para cada combinación de los niveles de intensidad de luz, un vial por unidad experimental, con un total de 25 viales por ensayo.

Los niveles del factor intensidad de luz fueron los siguientes:

i1= oscuridad (lecturas cada 30 minutos)

i2 = 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (lecturas cada 30 minutos)

i3 = 49 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (lecturas cada 30 minutos)

5.3.5.1.1. Modelo estadístico

De acuerdo con Montgomery y Runger (2004), el análisis de varianza correspondiente, se representa por el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, a \end{cases}$$

En el cual se definió como la media global a μ , τ_i es el efecto del i-ésimo nivel del tratamiento, y ε_{ik} es el error aleatorio con media igual a cero y varianza σ^2 .

Se definió a la Hipótesis nula como $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$

Y la Hipótesis alterna, $H_1: \tau_i \neq 0$ para al menos una i .

$\alpha = 0.05$

El criterio de rechazo de H_0 fue:

si $f_0 > f_{\alpha, a-1, (a-1)(b-1)}$

5.3.5.1.2. Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó mediante SAS[®] 8.00 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) Las diferencias entre niveles del factor intensidad de luz se determinaron mediante la prueba de Tukey con una significancia de $\alpha = 0.05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Segmentos nodales en Tidiazurón (TDZ) y Benciladenina (BA)

6.1.1. Segmentos nodales en diferentes concentraciones de TDZ y dos niveles de intensidad de luz

En diámetro promedio de callos, se encontraron diferencias significativas para los factores intensidad de luz, y concentración de TDZ; mientras que para longitud de yemas, se encontró diferencias significativas en el factor intensidad de luz (Cuadro 1). No se obtuvo brotación múltiple. Los explantes al final del ensayo, presentaron necrosamiento.

Cuadro 1. Resumen del análisis de varianza de diámetro de callos y longitud de yema, con diferentes concentraciones de TDZ y dos niveles de intensidad

Fuente de variación	GL	Diámetro de callo		Longitud de yema	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F
Intensidad de luz (i)	1	1.14816	<0.0001*	0.09600	0.03570*
Concentración (c)	4	0.03691	0.0256*	0.01358	0.61470
Bloque	5	0.02656	0.0685	0.03026	0.21390
i x c	4	0.02941	0.0588	0.01391	0.60360
Error	36				
Total corregido	59				
C.V.		60.71		163.85	

* Significante con $\alpha = 0.05$

El tratamiento que presentó mayor diámetro de callo fue i1c1 ($0.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ y $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y los que presentaron diámetros menores fueron con el tratamiento i2c2 ($0.088 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ y oscuridad) (Figura 16).

Con la concentración de $0.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de TDZ (c1), se obtuvo el mayor diámetro promedio de callos (0.2 cm) y a la concentración de $0.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (c4), el

menor diámetro (0.1 cm). La no adición de TDZ al medio de cultivo influyó en el diámetro del callo. Los mayores diámetros de callos se obtuvieron con la intensidad de luz de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (0.3 cm), mientras que con una intensidad de luz menor a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se obtuvieron los menores diámetros de callo (0.04 cm).

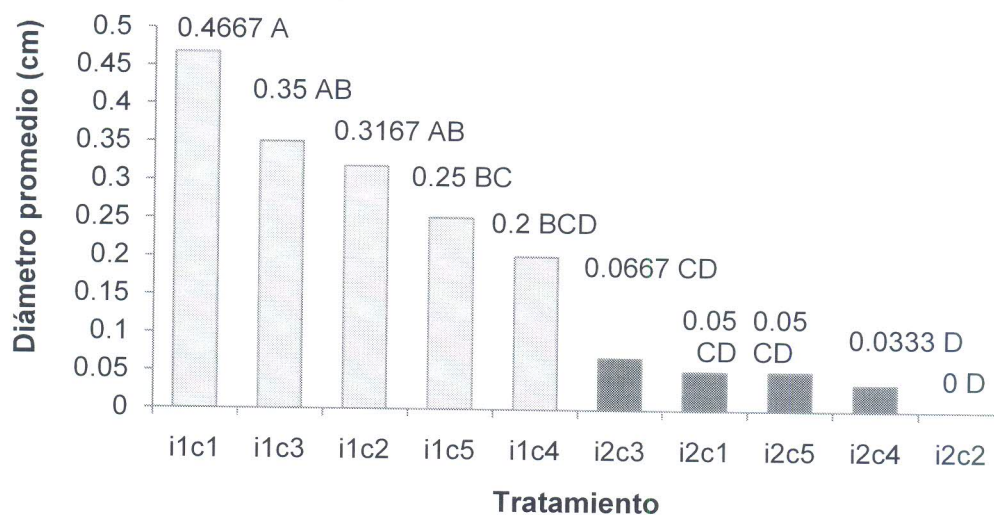


Figura 16. Diámetro promedio de callos para segmentos nodales de *M. balsamum*. Con Intensidad de luz $i1=10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $i2=$ oscuridad y concentraciones de TDZ en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$: $c1=0.00$, $c2=0.088$, $c3=0.132$, $c4=0.25$, $c5=2.5$. Barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

De acuerdo con la Figura 17, a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ conforme la concentración de TDZ aumenta el, diámetro promedio de los callos disminuye; en cambio para los callos a oscuridad, el diámetro promedio se mantiene casi constante con el aumento de la concentración de TDZ.

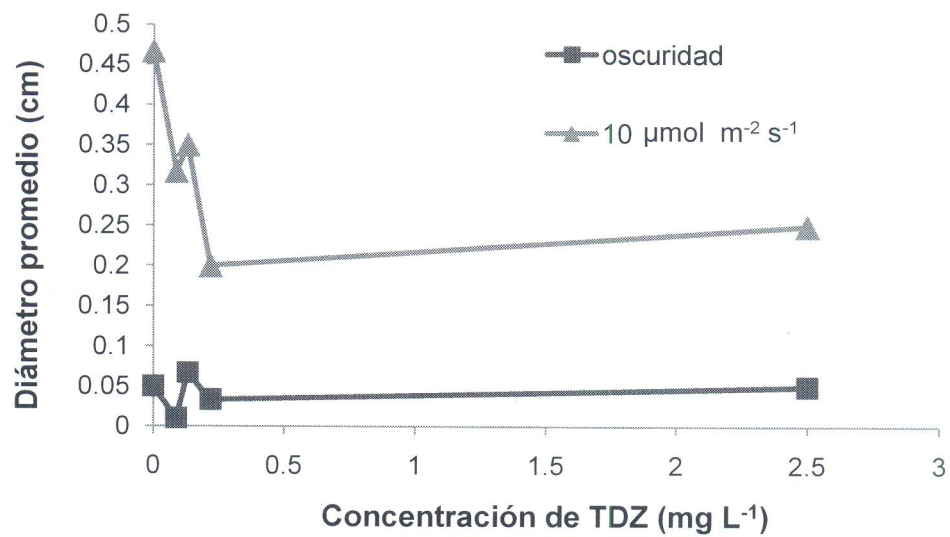


Figura 17. Diámetro promedio de callos en segmentos nodales de *M. balsamum* a diferentes concentraciones de TDZ y con dos niveles de intensidad de luz.

Para la variable longitud de yema, se encontró que en oscuridad el promedio de longitud fue mayor que en la intensidad de luz de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 18).

Las repuestas morfológicas (variables diámetro de callo y longitud de yema), se caracterizaron por estar influenciadas por las intensidades de luz empleadas. En cada nivel de intensidad de luz, la razón R:RL (rojo: rojo lejano) probablemente fue diferente.

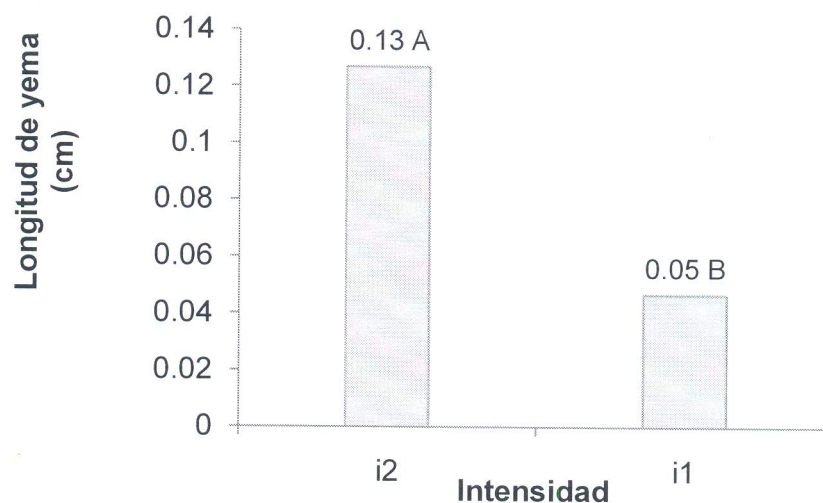


Figura 18. Longitud de yema con dos niveles de intensidad de luz i1= 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, i2= oscuridad. Barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

La luz natural tiene una razón R:RL aproximadamente constante (1.25 luz del día, 1.15 luz bajo dosel) las lámparas tubulares fluorescentes comunes en la mayoría de laboratorios, varían su razón R:RL entre 3.6 a 22.7 (Smith 2000; Vince-Prue, 1994), por tanto los segmentos nodales de *M. balsamum* pudieron estar expuestos a intensidades de luz con valores de R:RL al menos tres veces superiores a los encontrados en su entorno natural.

Lambers *et al.* (1998) mencionan que la luz roja inhibe el crecimiento de tallo, por ejemplo en plántulas de la leguminosa *Pisum sativum* la luz roja redujo la razón de elongación de tallos en casi tres veces en comparación con plántulas cultivadas en oscuridad.

En el medio de cultivo del presente ensayo, no se adicionó ninguna auxina. De forma general se necesita al menos una auxina para la inducción de callos a partir de explantes (George, 2008) por tanto es probable que el AIA endógeno en segmentos nodales de *M. balsamum* haya inducido la formación de callos en el medio c1 sin promotores de crecimiento (a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

En cambio, la combinación de una auxina con una citocinina induce la formación de callo en dicotiledoneas a concentraciones similares de estas dos clases de promotores y debido a que los niveles endógenos de auxina fluctúan en un régimen con fotoperiodo y en oscuridad (George, 2008) probablemente en los explantes se presentó este efecto de variación de concentración de AIA endógeno, y al haber estado en combinación con el TDZ exógeno se podría explicar las diferencias en el diámetro de callo en explantes de *M. balsamum*. Al respecto George (2008) menciona que es factible que variaciones en niveles endógenos de sustancias de crecimiento sean frecuentemente responsables del éxito o no del cultivo de tejidos.

Del material vegetal necrosado correspondiente al nivel de intensidad de luz de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (30 tubos) subcultivado en medio MSB y BA $1.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respondieron apenas cuatro tubos (un tubo de los tratamientos dos y cuatro y dos tubos del tratamiento cinco, se observó elongación de yemas posterior al momento de la nueva siembra).

Transcurridas cuatro semanas en medio con BA las yemas se pasaron a un medio de enraizamiento MSB al 50 %, suplementado con $0.0406 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB (Figura 19), ninguna de las yemas desarrolló raíces ni sobrevivieron en el medio.

La ausencia de brotación múltiple en *M. balsamum*, difiere del esperado para el TDZ como promotor de crecimiento. A partir de segmentos de tallo en lenteja (*Lens culinaris* Medik.), Khawar *et al.* (2004) obtuvieron en medios MSB suplementados con TDZ, porcentajes de 43.3 % (a $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ) y 50 % (a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ) de explantes que produjeron brotes.



Figura 19. Producción directa de múltiples brotes adventicios a partir de segmento nodal de *M. balsamum* con yema axilar. Medio MS 50 % AIB 0.0406 mg·L⁻¹

6.1.2. Segmentos nodales en TDZ y BA y dos niveles de intensidad de luz

Para diámetro de callo y longitud de yema, existieron diferencias significativas en el factor intensidad de luz (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resumen del análisis de varianza de diámetro de callos y longitud de yema, con diferentes concentraciones de TDZ con BA y dos niveles de intensidad

Fuente de variación	GL	Diámetro de callo		Longitud de yema	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F
Intensidad de luz (i)	1	0.40016	0.0062*	1.12066	<0.0001*
Concentración (c)	4	0.08016	0.1722	0.07558	0.1773
Bloque	5	0.05176	0.3798	0.03746	0.5370
i x c	4	0.07100	0.2221	0.06608	0.2335
Error	36				
Total corregido	59				
C.V.		109.6094		120.2722	

* Significante con $\alpha = 0.05$

Los mayores diámetros promedio se obtuvieron con el tratamiento i1c3 (0.132 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA y 10 μmol·m⁻²s⁻¹) y el menor con i2c1 (0.0 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA y oscuridad) (Figura 20).

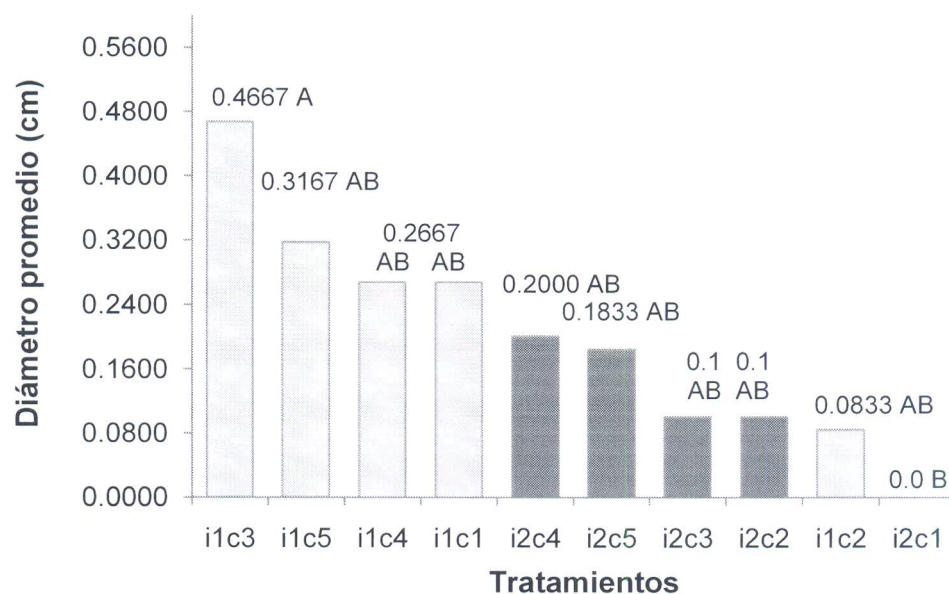


Figura 20. Diámetro promedio de callos en segmentos nodales de *M. balsamum* a diferentes concentraciones de TDZ + BA y con dos niveles de intensidad de luz (i1= 10 μmol·m⁻²s⁻¹, i2= oscuridad) a los 37 días. Barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

La longitud mayor de la yema axilar se obtuvo para el tratamiento i2c5 (2.5 mg·L⁻¹ TDZ + 1.1 mg·L⁻¹ BA y oscuridad y el menor para i1c2 que no tuvo respuesta alguna (Figura 21 y 22). En medio sin TDZ, la BA no dio respuesta en yemas.

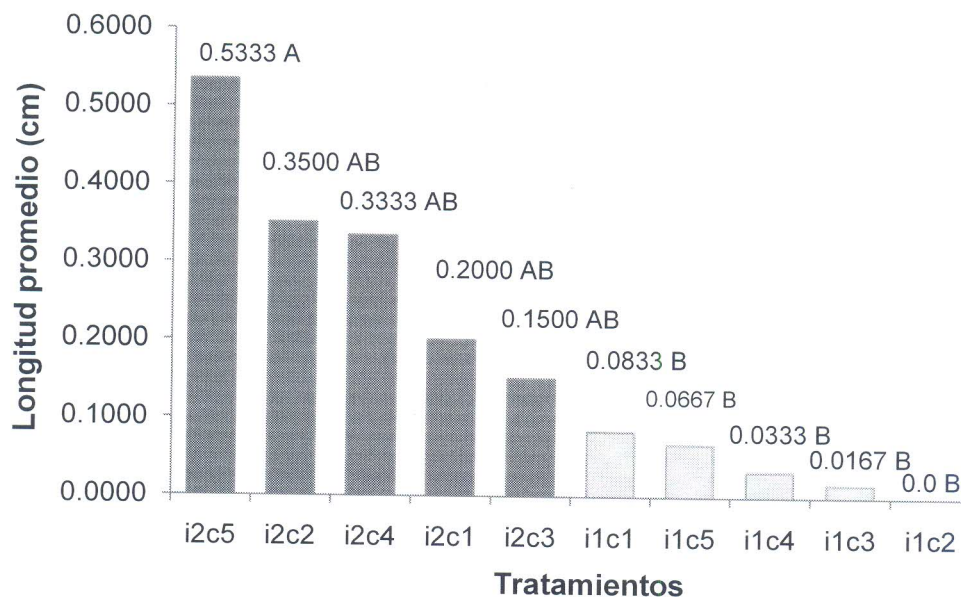


Figura 21. Longitud de yemas axilares para segmentos nodales de *M. balsamum* ($i1 = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $i2 = \text{oscuridad}$) y concentraciones de TDZ y BA. Barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

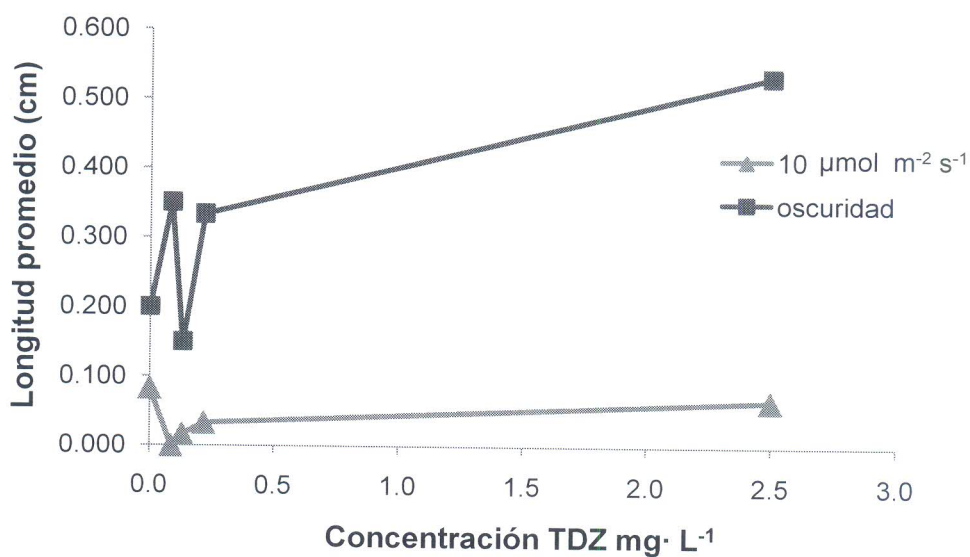


Figura 22. Longitud promedio de yemas en segmentos nodales de *M. balsamum* en BA a diferentes concentraciones de TDZ y en dos intensidades de luz de luz.

La respuesta de los explantes de *M. balsamum* fue diferente al comportamiento esperado para una mezcla de citocininas a estas concentraciones, pues de forma general bajas razones de auxina respecto a la citocinina inducen formación adventicia de brotes (Gaba, 2005; Taiz y Zeiger, 2002).

Con la intensidad de luz de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ hubo efecto para obtener los mayores diámetros y longitud de yema (Figura 23).

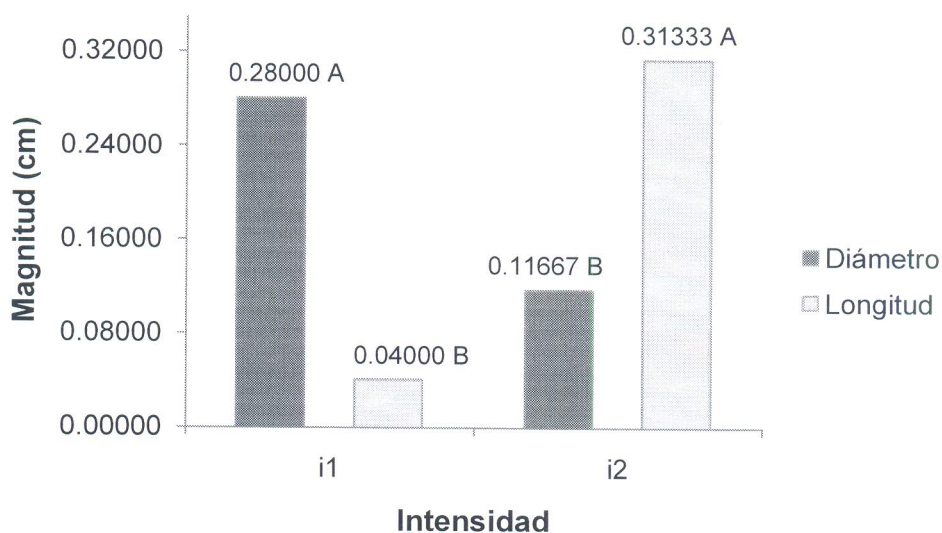


Figura 23. Diámetro promedio de callos y longitud de yemas en medio con TDZ y BA. (Intensidad de luz, i1= $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, i2= oscuridad). Barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

Lambers *et al.*, (1998) mencionan que en la leguminosa *Vigna sinensis* la respuesta a R:RL observada en la elongación de tallo se debe enteramente a la elongación celular antes que a la división celular (el efecto del fitocromo fue similar al de las giberelinas). Es probable por tanto que la longitud de la yema en los explantes de *M. balsamum* se debiera a la respuesta de los mismos a la radiación R:RL. López-Juez y Devlin (2008) mencionan que las plantas son capaces de monitorear la razón R:RL de la luz incidente y pueden interpretar la

reducción de esta razón como evidencia de una planta vecina creciendo cerca, una razón baja R:RL dispara una respuesta pronunciada de elongación (así como también reducción en la ramificación y área foliar).

Ninguno de los explantes presentó proliferación de brotes como se esperaba, al respecto George (2008) menciona que la acción de las citocininas es dependiente de la radiación como la luz roja lejana (por ejemplo la proliferación de brotes mediante BA es promovida por una respuesta a fitocromo de baja energía).

6.2. Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D

6.2.1. Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D y carbón activado

No se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos para el ensayo de formación de callos con carbón activado (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen del análisis de varianza de diámetro de callos, con diferentes concentraciones de BA, KIN y 2,4-D.

Fuente de variación	GL	Diámetro de callo	
		CM	Pr>F
Tratamientos	7	0.022936	0.6438
Bloque	5	0.025888	0.5519
Error	10		
Total corregido	17		
C.V.		186.0907	

* Significante con $\alpha = 0.05$

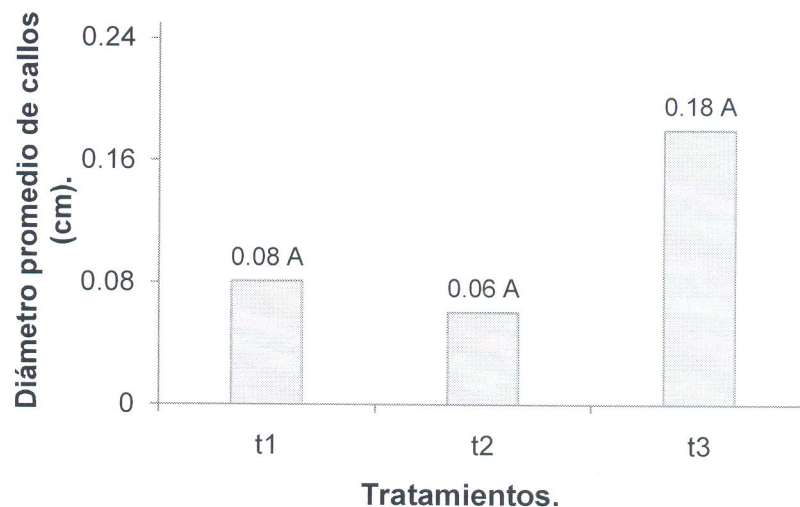


Figura 24. Diámetro promedio de callos, Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D y carbón activado.

6.2.2 Segmentos nodales en BA, KIN y 2,4-D sin carbón activado

Se obtuvieron diferencias significativas en el diámetro promedio de callos para los tratamientos aplicados (Cuadro 4). El mayor diámetro promedio de callos se obtuvo con el tratamiento t1 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KIN y $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D) mientras que el menor diámetro promedio se obtuvo con el tratamiento t3 ($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KIN y $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D) entre t1 y t2 no se encontraron diferencias significativas (Figura 25).

Cuadro 4. Resumen del análisis de varianza de diámetro de callos y longitud de yema, con diferentes concentraciones de TDZ y dos niveles de intensidad de luz.

Fuente de variación	GL	Diámetro de callo		Longitud de yema	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F
Tratamientos	9	0.1790	0.0281*	0.0030	0.0207*
Bloque	7	0.0855	0.2494	0.0008	0.4706
Error	14				
Total corregido	23				
C.V.		55.09312		143.4274	

* Significante con $\alpha = 0.05$

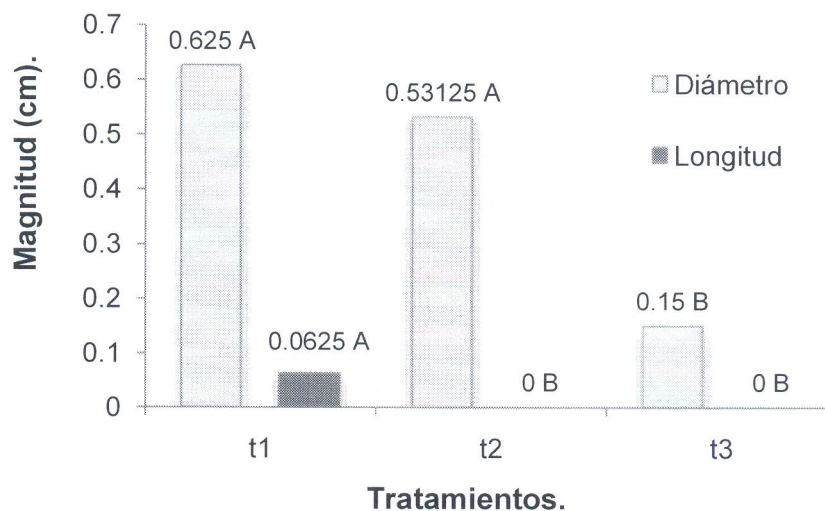


Figura 25. Diámetro promedio de callos y longitud promedio de yemas en segmentos nodales de *M. balsamum* con tres composiciones de medios de cultivo. Barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

La formación de callos se indujo mediante la presencia de dos citocininas (BA y KIN) y la de una auxina (2,4-D), químicamente la BA y KIN tienen estructuras similares, por tanto es probable que la respuesta del tejido vegetal no haya diferido mucho ante la presencia de la una o de la otra. Comparativamente entre t1, t2 y t3 el contenido de citocinina total es de 1.5, 4 y 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente, mientras que el contenido de 2,4-D no varió sustancialmente (0.2, 0.3 y 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), se observó que conforme la concentración de citocininas y 2,4-D aumenta, decrece el diámetro promedio de los callos (Figura 26), este comportamiento varía del común en composiciones con auxinas y citocininas por ejemplo razones intermedias o concentraciones altas de ambos promotores inducen formación adventicia de raíces a partir de callos e iniciación de callos en dicotiledóneas (Gaba, 2005; Taiz y Zeiger, 2002).

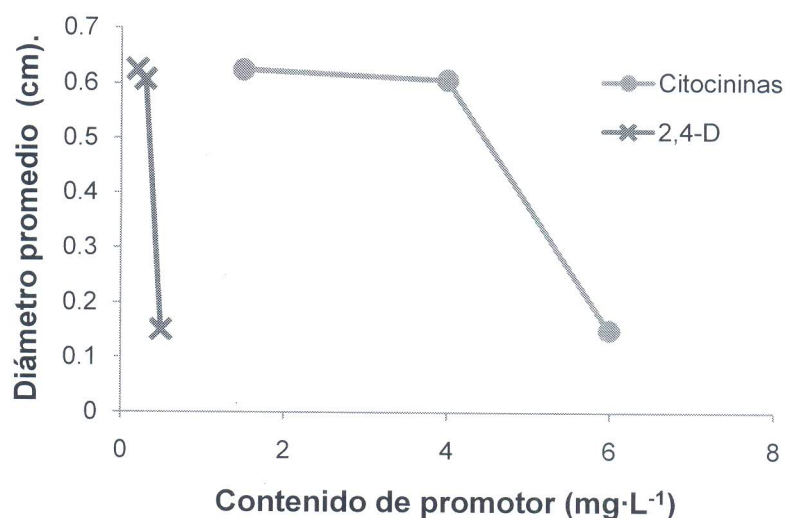


Figura 26. Variación del diámetro promedio de callos en relación con el contenido total de citocininas y 2,4-D.

6.3. Peciolo, raquis y folíolos en 2,4-D y ANA

El material vegetal obtenido en El Palmar, presentó contaminación que no pudo ser eliminada en los primeros dos ensayos. El hongo contaminante formó una densa cubierta de color blanco similar al algodón. La inmersión en solución de HgCl_2 al 0.1 % durante 10 minutos en el tercer ensayo, eliminó la contaminación pero necrosó el tejido que inhibió la respuesta en todas las unidades experimentales (Cuadro 5).

Juncker y Favre (1994) mencionan que la propagación *in vitro* de árboles forestales y otras plantas leñosas se ve limitada por bacterias u hongos latentes internos que dificultan la descontaminación inicial de los explantes y que incluso en tejidos aparentemente sanos pueden aparecer signos de contaminación en las etapas de la clonación.

Cuadro 5. Respuesta en raquis y raquilla a partir de explantes de *M. balsamum* obtenido en el Palmar.

TDZ (mg·L ⁻¹)	Ensayo [†]	Resultado
0, 0.088, 0.132 0.22, 2.2	1	Contaminación al 100 %, todas las unidades experimentales.
0, 0.088, 0.132 0.22, 2.22.2	2	Contaminación al 100 %, todas las unidades experimentales.
0, 0.088, 0.132 0.22, 2.2	3	Sin respuesta en ninguna de las unidades experimentales.

[†]Desinfestación:

1= Lavado, C₂H₅OH (70 %) 3 min, Cloralex (20 %) 10 min.

2= Lavado, C₂H₅OH (70 %) 3 min, Cloralex (20 %) 15 min. Enjuague H₂O estéril (tres veces). Inmersión en sol. Agrimicin (2 %) 24 h en agitación. Enjuague H₂O₂ (tres veces).

3= Lavado con detergente, posterior inmersión en C₂H₅OH al 70 % (3 min). Inmersión en solución de HgCl₂ al 0.1 % (10 min).

En los ensayos mediante material proveniente de vivero, la contaminación fue mínima, la respuesta de los explantes fue muy escasa y no representó diferencia significativa (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Respuesta en raquis con porción de raquilla a partir de explantes de *M. balsamum* proveniente de vivero.

Promotor (mg·L ⁻¹)		Resultado.
TDZ	BA	
0, 0.088, 0.132, 0.22, 2.5	1.1	Sin respuesta, ninguna de las unidades experimentales.

Cuadro 7. Respuesta en raquis, foliolos y peciolo a partir de explantes de *M. balsamum* proveniente de vivero.

Promotor (mg·L ⁻¹)		Explante [†]	Resultado.
2,4-D	ANA		
1.0, 3.0 10.0	0.3	1, 2, 3	Sin respuesta, en ninguna de las unidades experimentales.
1.0, 3.0 10.0	1.0	1, 2, 3	Sin respuesta, en ninguna de las unidades experimentales.
1.0, 3.0 10.0	3.0	1, 2, 3, 4	Sin respuesta, en ninguna de las unidades experimentales.
1.0	0.3	4	Sin respuesta
3.0	0.3	4	< 2 % Callo, tejido necrosado
10.0	0.3	4	< 2 % Callo, tejido necrosado
1.0	1.0	4	< 2 % Callo, tejido necrosado
3.0	1.0	4	6 % Callo, tejido necrosado
10.0	1.0	4	< 2 % Callo, tejido necrosado

[†]Explante: 1= Raquis con porción de raquilla. 2= Foliolo con nervadura. 3= Foliolo sin nervadura. 4= Pecíolo.

Debido a las características de los explantes, provenientes de hojas compuestas muy probablemente no existió suficiente tejido parenquimático menos aún meristemático, que pudiera inducir respuesta, al respecto Veit y Foster (2002) mencionan que para explicar la iniciación de primordios de los foliolos en hojas compuestas, se piensa que los primordios se originan vía “fraccionamiento meristemal” mediante el cual regiones meristemáticas marginales de los primordios de hojas jóvenes se vuelven discontinuos conduciendo a regiones alternadas de tejido meristemático y no meristemático a

lo largo de la raquilla de la hoja, lo cuál puede conducir o sitios de iniciación para el desarrollo del foliolo. Señalan además que las hojas compuestas por lo general poseen yemas axilares solamente en los ejes primarios.

6.4. Semillas en AG₃ y BA

No hubo respuesta inicial en ninguna de las unidades experimentales en los ensayos con BA en carbón activado con el procedimiento de desinfestación que incluía el lavado, enjuague en C₂H₅OH (70 %) 3 min, H₂O₂ (40 %) 10 min. Probablemente al momento del corte (Figura 27) se afectó la estructura del embrión lo que impidió su desarrollo.

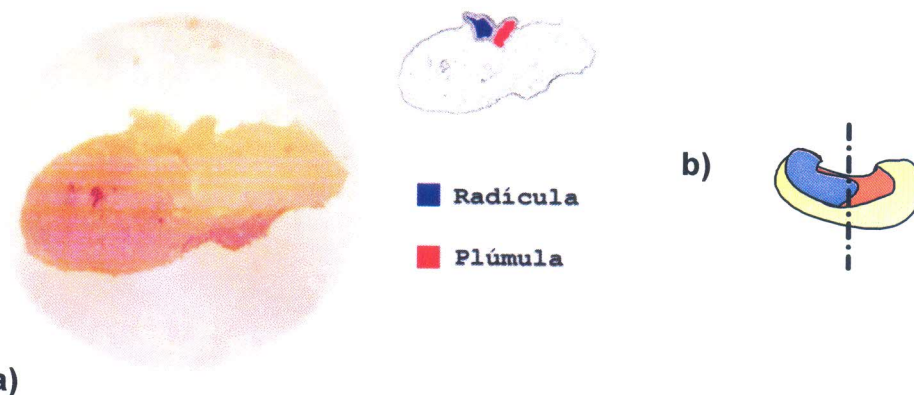


Figura 27. Embrión de *M. balsamum*. **a)** Radícula y plúmula vista al estereomicroscopio. **b)** Diagrama del corte de la semilla, ensayo 1.

Posteriormente todas las unidades experimentales se contaminaron y no hubo respuesta (Cuadro 8).

Para el ensayo que incluyó el lavado, inmersión en C₂H₅OH (70 %) 3 min y Cloralex (20 %) 10 min, la contaminación también fue del 100 % (Cuadro 9).

Cuadro 8. Respuesta de semillas *M. balsamum* a la germinación mediante BA y CA. Ensayo 1.

BA (mg·L ⁻¹)	CA (%)	Semilla [†]	Resultado
0.0, 0.1, 0.1	0.1	EEMS	Contaminación del 100 % en todas las unidades experimentales
0.0, 0.1, 0.1	0.1	ECMS	Contaminación del 100 % en todas las unidades experimentales

[†]Corte de semilla EEMS= Extremo del embrión, mitad de semilla ECMS= Extremo del cotiledón, mitad de semilla.

Cuadro 9. Respuesta de semillas *M. balsamum* a la germinación mediante BA y CA. Ensayo 2.

BA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	Semilla [†]	Resultado
0.0	0.0	EDS	Contaminación del 100 % en todas las unidades experimentales
0.5	0.0	EDS	
0.0	2.0	EDS	
0.5	2.0	EDS	
0.0	0.0	CUS	Contaminación del 100 % en todas las unidades experimentales
0.5	0.0	CUS	
0.0	2.0	CUS	
0.5	2.0	CUS	

[†]Corte de semilla EDS= Embrión, dos tercios de semilla CUS= Cotiledón, un tercio de semilla.

En cambio para los medios de cultivo MSB suplementado con BA (0.1, 0.3 y 1.0 mg·L⁻¹) y AG₃ (0.0, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹) no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las combinaciones posibles, la germinación fue escasa (Cuadro 10). Al efectuar una prueba con tetrazolium, se verificó que la viabilidad de la semilla era del 50 % por tanto es probable que la inmersión de las semillas en peróxido de hidrógeno haya afectado el tejido embrional. Con el paso del tiempo hasta el final del ensayo (día 40 desde el momento de la siembra) la contaminación en las unidades experimentales aumentó. Las pocas semillas que germinaron no presentaron contaminación.

Cuadro 10. Respuesta de semillas *M. balsamum* a la germinación mediante BA y AG₃. Ensayo 3.

BA (mg·L ⁻¹)	AG ₃	Germinación (%)	Sin respuesta (%)	Contaminación (%)
0.0	0.0	10	10	80
0.1	1.0	0	40	60
0.3	1.0	10	40	50
1.0	1.0	10	20	70
0.1	3.0	10	30	60
0.3	3.0	10	30	60
1.0	3.0	30	20	50

La mayoría de fuentes de contaminación incluyen microorganismos epifíticos (que sobreviven los procedimientos de desinfestación superficial) y endofíticos protegidos de las técnicas normales de desinfestación superficial). Los epifíticos son hongos que habitan sobre la superficie del tejido y los

endofíticos los que viven dentro de los tejidos de la planta (Gunson y Spencer-Phillips, 1994).

Casi todas las especies de hongos y levaduras son contaminantes severos *in vitro* debido a que crecen muy bien en el medio de cultivo y matan los explantes produciendo metabolitos tóxicos e incrementando la competencia por nutrientes (Leifert y Waites, 1994). Las semillas ortodoxas (y recalcitrantes) sirven como soporte para hongos. De forma general, la mayoría de semillas contienen esporas de varios tipos de hongos en la superficie o dentro de los tejidos y pueden contabilizarse hasta 150000 esporas por semilla de árbol. En especies tropicales como *Albizia*, *Entandrophragma*, *Gmelina*, *Cedrela*, *Maclura*, *Triplochiton*, *Leucaena*, *Terminalia* y *Khaya* los hongos pueden impactar de forma seria en la germinación (Smith *et al.* 2003; Old y Yuan, 2003).

Los procedimientos de desinfestación en los dos primeros ensayos, no controlaron la presencia de hongos, en el tercer ensayo la contaminación se redujo pero no pudo ser eliminada.

6.6. Ensayo enzimático

6.6.1 Actividad de PAL en tres niveles de intensidad de luz

Se encontraron diferencias significativas en el factor intensidad de luz (Figura 28), se obtuvo la mayor actividad promedio ($-75.648 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$) en el tratamiento en t1 (oscuridad) y la menor actividad promedio ($-12.487 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$) en el tratamiento t2 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

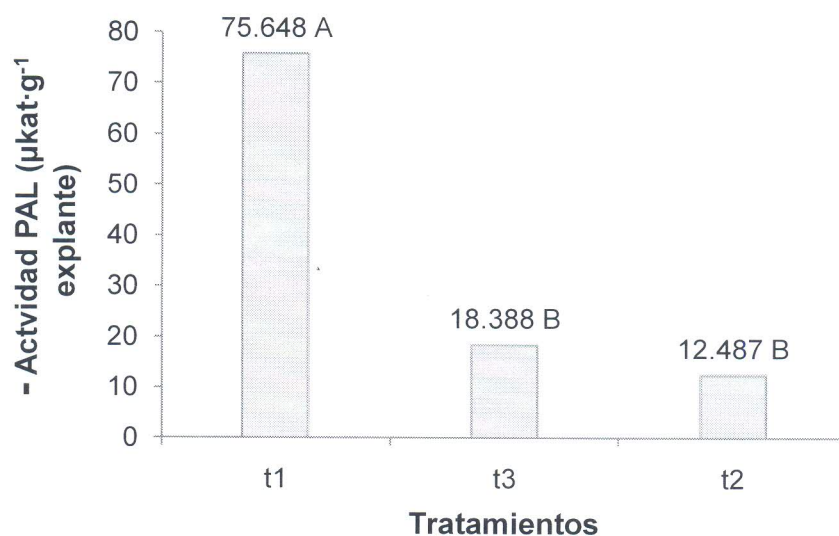


Figura 28. Actividad de PAL en función de los niveles de tiempo. Barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

Cuadro 11. Resumen del análisis de tratamiento, para la actividad de PAL en tres niveles de intensidad de luz.

Fuente de variación	GL	CM	P>F
Tratamientos	2	18256.92838	<.0001*
Error	42		
Total corregido	44		
C.V.		-34.86458	

* Significante con $\alpha = 0.05$

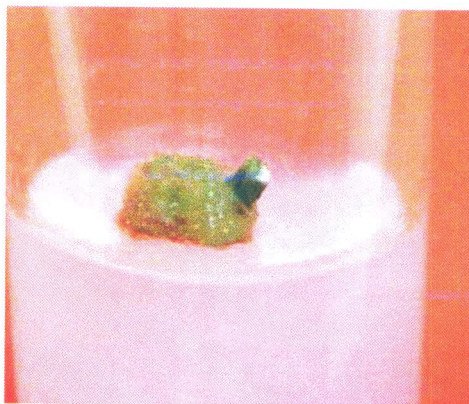


Figura 29. Explantes para ensayo enzimático. **a)** Callo en segmento nodal con $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KIN y $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D a intensidad de luz de $49 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

De la Figura 30 se determina que las actividades promedio de PAL en función del tiempo y considerando los niveles de intensidad de luz, se ajustan a líneas rectas de pendientes negativas, lo que indica que al momento del ensayo la actividad de PAL decreció, probablemente porque los explantes se retiraron de la fuente luminosa a la que estaban expuestos. De acuerdo con Drauz y Waldman (2002), PAL usa ácido trans cinámico y p-coumarico como sustratos para la formación de L-Fenilalanina y L-tirosina respectivamente, por tanto la reacción reversible si es factible, lo que explicaría el hecho de que la actividad decrezca al cesar el estímulo.

La mayor pendiente se registró para el nivel de oscuridad (-0.12) y la menor para el nivel de $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (-0.020) lo que indica PAL presentó mayor actividad en explantes cultivados en oscuridad que los cultivados bajo luz, estos resultados difieren de los esperados, Sreelakshmi y Sharma (2008) reportaron estimulación de la actividad y del nivel (cantidad) de PAL debida a la exposición por luz en plántulas de jitomate.

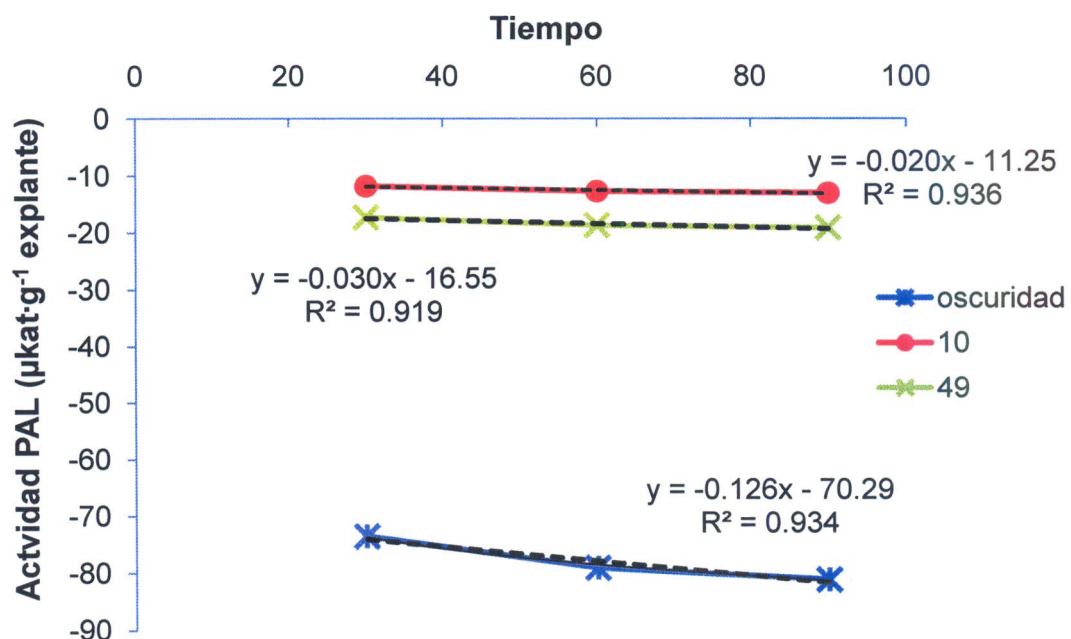


Figura 30. Actividad promedio de PAL en función del tiempo por nivel de intensidad de luz (Ajustes lineales realizados mediante Excel 2007).

La Figura 31 describe que las lecturas de absorbancia (por tanto la concentración de transcinamato) fueron mayores en oscuridad y menores para las intensidades luminosas de 10 y 49 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, probablemente debido a respuesta diferencial al estímulo luminoso. Al respecto Sreelakshmi y Sharma (2008) mencionan que debido a que PAL se codifica por una pequeña familia de multi genes, la respuesta individual de cada gen puede producir respuesta diferencial a la fotoinducción, esto coincide con lo señalado por Sing *et al.* (1999) quienes obtuvieron respuestas diferenciales en la actividad de PAL debida a la fotoinducción en plántulas de maíz (*Zea mays* L.).

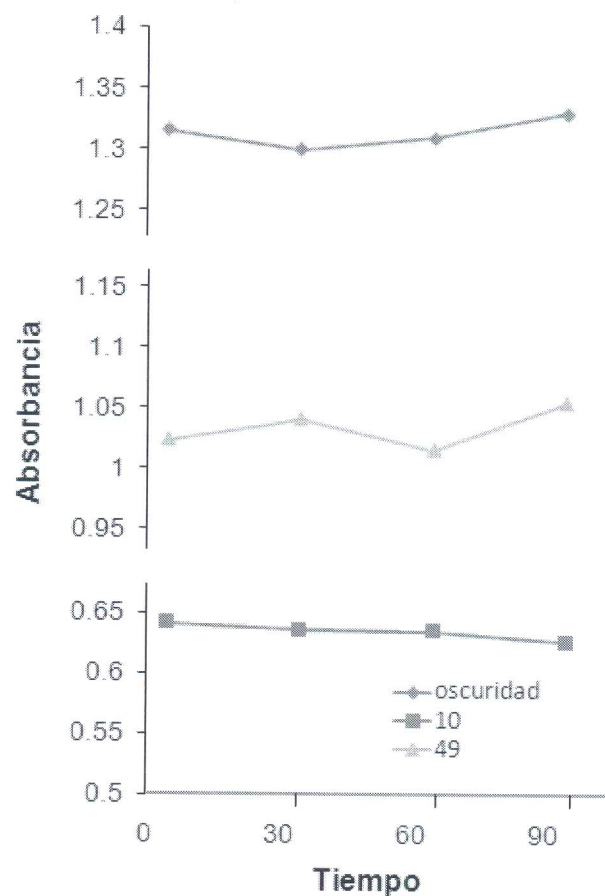


Figura 31. Dependencia de la absorbancia en función del tiempo a tres niveles de intensidad de luz.

Adicionalmente a la expresión diferencial, las diferentes isoenzimas de PAL son reguladas por separado en diferentes tipos de tejidos (Fedtke y Duke, 2005). En perejil (*Petroselinum crispum*), Logemann *et al.* (1995) reportaron que en comparación con los genes *pal1*, 2 y 3 no hubo respuesta del gen *pal4* a la luz en tejidos de hojas y en células cultivadas, además que posterior a heridas los mRNA de *pal4* se indujeron fuertemente en raíces pero no en hojas y finalmente que los mRNA de *pal4* exhibieron respuesta de corta duración a elicitores en cultivo de células.

VII. CONCLUSIONES

Las respuestas *in vitro* de segmentos nodales de *M. balsamum*, bajo el efecto de reguladores de crecimiento utilizados fue escasa, por lo que el protocolo de micropropagación, no fue establecido en forma completa.

Las repuestas morfogénicas de las variables diámetro de callo y longitud de yema, se caracterizaron por estar fuertemente influenciadas por el factor intensidad de luz.

Los explantes cultivados en luz, produjeron callos y escasa brotación y elongación. En cambio, mayor elongación de brotes con callos de menor diámetro se obtuvieron en explantes cultivados en ausencia de luz.

La intensidad de luz, también fue el factor que determinó la actividad enzimática en los explantes, contrariamente a lo esperado, la actividad de PAL fue mayor en explantes cultivados en oscuridad, que aquellos cultivados con luz.

La actividad de PAL decreció en todos los tratamientos en función del tiempo, la absorbancia fue mayor para explantes cultivados en oscuridad en relación con los otros dos niveles en estudio 10 y 49 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

VIII. LITERATURA CITADA

- Agrawal V., P. R. Sardar. 2007. *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogénesis using cotyledons of *Casia angustifolia* Vahl. Cell. Dev. Biol. Plant 43:585–592.
- Banerjee S., J. Tripathi, P. C. Verma, P. D. Dwivedi, S. P. Singh Khanuja, G. D. Bagchi. 2004. Thidiazuron-induced high-frequency shoot proliferation in *Cineraria maritima* Linn. Current Science. 87(9):1287-1290.
- Beyl C. A., 2005. Getting Started with Tissue Culture: Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment. *In: Plant Development and Biotechnology*. Trigiano R. N., Gray D. J. (eds). 2005. CRC Press. Second edition. USA. pp. 25, 27.
- Carra A., F. De Pasquale, A. Ricci and F. Carimi. 2006. Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in Citrus. Springer Science+Business Media B.V. Plant Cell Tiss Organ Cult. 87:41–48.
- Dhawan V., S. Saxena. 2004. Cloning Forestry Species. *In: Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Srivastava P.S., A. Narula, S. Srivastava (eds). 2004. Anamaya Publishers, New Delhi, India. pp. 185.
- Debergh P., J. De Riek and D. Matthys. 1994. Nutrient supply and growth of plants in culture. *In: Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. P. J. Lumsden, J.R. Nicholas and W. J. Davies (eds). 1994. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 58-68.
- Faisal M., I. Siddique, M. Anis. 2005 *In vitro* rapid regeneration of plantlets from nodal explants of *Mucuna pruriens* - a valuable medicinal plant. Annals of Applied Biology. pp. 1, 2.
- Fedtko C., S. Duke. 2005. Herbicides. *In: Plant Toxicology*. Hock B., E. F. Elstner. (eds.) 2005. Marcel Dekker. New York. U.S.A. Fourth Edition. p. 294.

- Ferjani A., S Yano, G. Horiguchi, H. Tsukaya. 2008. Control of Leaf Morphogenesis by Long- and Short-Distance Signaling: Differentiation of Leaves Into Sun or Shade Types and Compensated Cell Enlargement *In: Plant Growth Signaling*. Bögre L., G. Beemster. (eds.). 2008. Springer-Verlag. Germany. p. 48.
- Fletcher J. C. 2002. The vegetative meristem. *In: Meristematic Tissues in Plant Growth and Development*. M. T. McManus and E. Veit. (eds). 2002. Sheffield Academic Press. Wiltshire. p. 21.
- Gaba P. V. 2005. Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development. *In: Plant Development and Biotechnology*. Trigiano R. N., Gray D. J. (eds). 2005. CRC Press. Second edition. USA. pp. 87-98.
- George E. F., M. A. Hall, De Klerk C. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Volume 1. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 174, 177, 186, 214, 220, 403.
- Gilbert H. 2000. Basic concepts in biochemistry. McGraw-Hill Companies, Inc. USA. Second edition. pp. 98-101.
- Gillett H., S. Ferriss. 2005. Strategies for the sustainable use and management of timber tree species subject to international trade: Mesoamerica. UNEP World Conservation Monitoring Centre. Cambridge. pp. 9, 32.
- Gunson H.E., P.T. Spencer-Phillips. 1994. Latent bacterial infections: epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. *In: Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. P.J. Lumsden, J.R. Nicholas and W. J. Davies (eds). 1994. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 379. 380.
- Gurr S. J. M. J. McPherson, D. J. Bowles. 1992. Molecular Plant Pathology. A Practical Approach. Volume II. JRL Press. Oxford. USA. pp. 54-55.

- Husain M. K., M. Anis and A. Shahzad. 2007. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. *In vitro Cell.Dev.Biol. Plant* 43:59–64.
- Iriondo J. M., M. De la Iglesia, C. Pérez. 1995. Micropropagation of *Elaeagnus angustifolia* from mature trees. Heron Publishing. *Tree Physiology* 15: 691-693.
- Jacobi P. A., I. M. Odeh, S. C. Buddhu, G. C. Sundaramoorthi, D. Fry, W. Zheng, R. W. DeSimone, J. Guo, L. D. Coutts, S. I. Hauck, S. H. Leung, I. Ghosh, D. Pippin. 2005. Synthetic Studies in Phytochrome Chemistry. *Synlett*. 19: 2861–2885.
- Juncker B., J. M. Favre. 1994. Long-term effects of culture establishment from shoot-tip explants in micropropagating oak (*Quercus robur* L). Elsevier/INRA. *Ann SciFor*. 51:581-588.
- Kane M. E. 2005. Shoot Culture Procedures *In: Plant Development and Biotechnology*. Trigiano R, N., Gray D, J. (eds). 2005. CRC Press. USA. pp. 150, 151.
- Khawar K. M., C. Sancak, S. Uranbey, S. Özcan. 2004. Effect of Thidiazuron on Shoot Regeneration from Different Explants of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) via Organogenesis. *Turk J Bot*. 28:421-426.
- Knudsen, H. 2000. Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. 1° edición. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Roma, Italia. pp. 134, 141, 175, 221, 257, 294.
- Lambers H., F. S. Chapin III, T. L. Pons. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag. New York. USA. pp. 25- 29.

- Leifert C., W. Waites Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell cultura: hazard analysis and critical control points. 1994. *In: Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. P.J. Lumsden, J.R. Nicholas and W. J. Davies (eds). 1994. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 364.
- Logemann E., M. Parniske, K. Hahlbrock. 1995. Modes of expression and common structural features of the complete Phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. Plant Biology. USA*. 92:5905-5909.
- López-Juez E., P. F. Devlin. 2008. Light and the Control of Plant Growth. *In: Plant Growth Signaling*. Bögre L., G. Beemster. (eds.). 2008. Springer-Verlag. Germany. pp. 228.
- Marín W. A., E. M. Flores. 2003. *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. *In: Tropical tree seed manual*. Vozzo J. A. (ed.) 2003. United States Department of Agriculture Forest Service. pp. 582-584.
- Maruyama E., K. Ishii, A. Saito, K. Migita K. 1989. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Peru-Amazon forest. *Journal of Agricultural Science, Tokyo Nogyo Daigaku*, 33(4):252-261.
- Matlawska I. 2002. Herbal remedies in the treatment of bleeding haemorrhoids. *Postepy Fitoterapii Abstract*. 3(9):70-74.
- Mathias L., I. J. C. Vieira, R. Braz-Filhoa, E. Rodrigues Filho. 2000. A New Pentacyclic Triterpene Isolated from *Myroxylon balsamum* (syn. *Myroxylon peruiferum*). *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 11, No. 2, 195-198.
- Mehdi S. S. 2002. Plant Growth Hormones: Growth Promoters and Inhibitors. *In: Handbook of Plant and Crop Physiology*. Pessarakli M. (ed). 2002. Marcel Dekker Inc. New York, NY. Second Edition.

- Missen R. W., Mims C. A., Saville B. A. 1999. Introduction to chemical reaction engineering and kinetics. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA. pp. 261, 262.
- Montgomery D. C., G. C. Runger. 2004. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. Segunda edición. pp. 389-391, 596, 597, 641.
- Mudge K. W., E. B. Brennan. 1999. Clonal Propagation of Multipurpose and Fruit Trees Used in Agroforestry. Agroforestry. in: Sustainable Agricultural Systems. Louise E. Buck L. E., J. P. Lassoie, E. C. M. Fernandes (eds.) 1999. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA. pp. 264.
- Murashige T., F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Pennington T. D., J. Sarukhán. 2005. Árboles Tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. 3^o Edición. México. UNAM y Fondo De Cultura Económica pp. 262.
- Old K., Z.Q. Yuan. 2003. Pathology, Part II, Practice. *In: Tropical tree seed manual*. Vozzo J. A. (ed.) 2003. United States Department of Agriculture Forest Service pp. 184.
- Souza R. P., I. F. M. Válio. 2003. Leaf optical properties as affected by shade in saplings of six tropical tree species differing in successional status *Braz. J. Plant Physiol.*, 15(1):49-54.
- Ritter H., G. E. Schulz. 2004. Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by phenylalanine Ammonia-Lyase. *American Society of Plant Biologists. The Plant Cell*. 16:3426–3436.

- Rogers L. A., M. M. Campbell. 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytologist*. 164: 17–30.
- Robles G. R., K. O. Barbosa, R. V. Soto. 2000. Evaluación de los productos forestales no madereros en América. FAO. Roma. pp. 33,58.
- Sánchez E., J. M. Soto, P. C. García, L. R. López-Lefebvre, R. M. Rivero, J. M. Ruiz, L. Romero. 2000. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Aust. J. Plant Physiol*. 27: 973–978.
- Schöpker H., M. Kneisel, L. Beerhues, H. Robenek, R. Wiermann. 1995. Phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in glands of *Primula kewensis* (W. Wats): immunofluorescence and immunogold localization. *Planta. Springer*. 196:712-719.
- Seedhabadee G., K. L. Caswell, K. K. Kartha, and R. N. Chibbar. 2002. Shoot Regeneration and Proliferation. *In: Transgenic Plants and Crops*. Khachatourians G. G., A. McHughen, R. Scorza, W. Nip, Y. H. Hui (ed). 2002. Marcel Dekker Inc. New York, NY.
- Simas N, K., E. da Costa Lima, S. da Rocha Conceição, R. Machado Kuster, A. Martins de Oliveira Filho. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova*. 27(1): 46-49.
- Singleton P., D. Sainsbury. 2006. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Third Edition John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England. pp. 213, 581.
- Smith H. 2000. Plant architecture and light signals. *In: Leaf Development and Canopy growth*. Marshall B., J. A. Roberts (eds). 2000. Sheffield Academic Press. Great Britain. pp. 126-129, 131.

- Smith M.T., B. Wang, H. Msanga. Dormancy and Germination. *In: Tropical tree seed manual*. Vozzo J. A. (ed.) 2003. United States Department of Agriculture Forest Service pp.161.
- Sreelakshmi Y., R. Sharma. 2008. Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings. Elsevier Masson SAS. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 444-451.
- Stewart A. J., W. Chapman, G. I. Jenkins, I. Graham, T. Martin, A. Crozier. 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. Blackwell Science Ltd. *Plant, Cell and Environment*. 24: 1189–1197.
- Sussex I. M. and N. M. Kerk. 2002. The organization and function of plant meristems. *In: Meristematic Tissues in Plant Growth and Development*. McManus M. T. and E. Veit. (eds). 2002. Sheffield Academic Press. Wiltshire. p. 2.
- Taiz L. and E. Zeiger. 2002. *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc. Third edition. Sunderland USA. pp. 351, 427, 496, 505.
- Thomas D.T., 2007. Pretreatment in thidiazuron improves the in vitro shoot induction from leaves in *Curculigo orchoides* Gaertn., an endangered medicinal plant. *Acta Physiol Plant*. 29:455–461.
- Trigiano R, N., Gray D, J. 2005. A Brief Introduction to Plant Anatomy. *In: Plant Development and Biotechnology*. Trigiano R, N., Gray D, J. (eds). 2005. CRC Press. USA. pp. 74-85.
- Vanaclocha B. S., S. Cañigüeral. 2003. *Fitoterapia Vademécum de prescripción*. Editorial Elsevier-Masson. pp. 136,137.
- Veit B. and T. Foster. 2002. Axial patterning and meristematic growth in leaves. *In: Meristematic Tissues in Plant Growth and Development*. McManus M. T. and E. Veit. (eds). 2002. Sheffield Academic Press. Wiltshire. p. 233.

- Vera C., G. 2003. Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en el Sur y Sureste de México. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR/61S. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO, Roma. Anexos 2, 3, 4 y 5.
- Vidhyasekaran P. 2008. Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. CRC Press, Taylor & Francis Group. Second edition. Boca Raton, FL.USA. p. 439.
- Villacrés V, H. 1995. Bioactividad de plantas amazónicas. Ediciones Abya-Yala. 1º edición. Págs. 32, 71, 73-76.
- Vince-Prue D. 1994. Photomorphogenesis and plant development. *In*: Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. P. J. Lumsden, J.R. Nicholas and W. J. Davies (eds). 1994. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 19-30.
- Vivero J, L., M. Szejner, J. Gordon, G. Magin. 2006. The Red List of Trees of Guatemala. Fauna & Flora International, Cambridge, UK. pp. 35, 36, 38 y 42.
- Whitelam G. C., S. Patel, P. F. Devlin. 1998. Phytochromes and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. Phil.Trans. The Royal Society. London. 353:1445-1453.
- Whetten R. W., R. R. Sederoff. 1991. Phenylalanine Ammonia-Lyase from Loblolly Pine', Purification of the Enzyme and Isolation of Complementary DNA Clones. Plant Physiol. 98, 380-386.
- Whitford D. 2005. Proteins structure and function. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester. England.
- Yildirim T., Z. Kaya, K. Isik. 2006. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. Plant Cell Tiss Organ Cult. 87:67-76.