



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y RESPUESTAS
in vitro DE *Ibervillea sonora* S. WATS (GREENE)
(*Cucurbitaceae*).**

PRESENTA

NORBERTO LÓPEZ MÁRQUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
AGRÍCOLA**

Director de Tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2017

La presente tesis titulada: **Caracterización molecular y respuestas *in vitro* de *Ibervillea sonora* S. Wats (Greene) (Cucurbitaceae)** fue realizada por el C. Norberto López Márquez bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

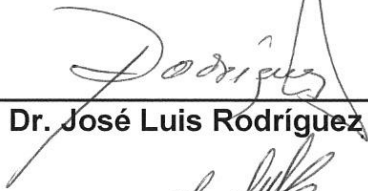
CONSEJO PARTICULAR

Director:



Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

Asesor:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

Asesor:



M. en C. María de Lourdes Martínez Cárdenas

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS USADAS	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiii
1 INTRODUCCION GENERAL	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Clasificación taxonómica.	3
2.2 Características botánicas.	3
2.3 Distribución.	4
2.4 <i>I. sonorae</i> en la Medicina Tradicional Mexicana.	4
2.5 Caracterización molecular.	5
2.5.1 Variabilidad genética.	5
2.5.2 Marcadores moleculares.	5
2.5.3 Extracción de ADN.	5
2.5.4 Técnica de la PCR.	7
2.5.5 Marcadores ISSR.	10
2.6 Germinación de semillas.	11
2.6.1 Ensayo con tetrazolio.	11
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales.	12
2.7.1 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).	13
2.7.2 Respuestas morfogénicas.	13
2.7.3 Oxidación y necrosamiento.	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
HIPOTESIS	15
LITERATURA CITADA	15
3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CUATRO POBLACIONES DE <i>Ibervillea sonorae</i> DEL ESTADO DE SONORA.	19
3.1 RESUMEN	19

3.2	ABSTRACT	20
3.3	INTRODUCCIÓN	21
3.4	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.4.1	Material vegetal.....	22
3.4.2	Extracción y purificación de ADN genómico.	22
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.6	CONCLUSIONES	29
3.7	AGRADECIMIENTOS.....	29
3.8	LITERATURA CITADA.....	30
4	RESPUESTAS <i>in vitro</i> DE <i>Ibervillea sonora</i>	31
4.1	RESUMEN	31
4.2	ABSTRACT	32
4.3	INTRODUCCIÓN	33
4.4	MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.4.1	Colecta de material vegetal.	34
4.4.2	Pruebas de germinación de semillas.....	34
4.4.3	Procesos de desinfestación de explantes.....	36
4.4.4	Evaluación de la germinación de semillas <i>in vitro</i>	39
4.4.5	Evaluación de respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> de nudos axilares.....	40
4.4.6	Evaluación de la formación de callo a partir de mesófilo de hoja. 41	
4.4.7	Evaluación de respuestas morfogénicas en embriones cigóticos. 41	
4.4.8	Evaluación de la diferenciación de callos en brotes y raíces.....	43
4.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.5.1	Pruebas de germinación de semillas.....	44
4.5.2	Protocolos de desinfestación de explantes.	47
4.5.3	Evaluación de respuestas morfogénicas.	51
4.6	CONCLUSIONES	59
4.7	AGRADECIMIENTOS.....	59
4.8	LITERATURA CITADA.....	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes para realizar la mezcla de reacción.....	7
Cuadro 2. Programa del termociclador.....	7
Cuadro 3. Localidades de colecta de los materiales vegetales para el estudio de variabilidad genética.....	22
Cuadro 4. Iniciadores ISSRs utilizados, secuencia (5' - 3'), temperatura de alineamiento y número de bandas amplificadas en cuatro poblaciones de <i>Ibervillea sonora</i> e.....	24
Cuadro 5. Análisis de varianza molecular de cuatro poblaciones de <i>Ibervillea sonora</i> e del estado de Sonora, de acuerdo a sus perfiles moleculares ISSR.....	27
Cuadro 6. Número de bandas totales, polimórficas, proporción de loci polimórficos, contenido de información polimórfica, error estándar, porcentaje de amplificación y probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar obtenidos con trece iniciadores ISSRs en cuatro poblaciones de <i>Ibervillea sonora</i> e.....	28
Cuadro 7. Localización y condiciones climáticas de tres sitios de colecta de <i>Ibervillea sonora</i> e en el estado de Sonora.....	34
Cuadro 8. Tratamientos de desinfestación de semillas de <i>I. sonora</i> e para establecimiento <i>in vitro</i>	36
Cuadro 9. Tratamientos de desinfestación en minutos de nudos axilares de <i>I. sonora</i> e para establecimiento <i>in vitro</i>	37
Cuadro 10. Tratamientos de desinfestación en minutos de fragmentos de mesófilo de hojas de <i>I. sonora</i> e para establecimiento <i>in vitro</i>	38
Cuadro 11. Tratamientos de desinfestación en minutos de embriones cigóticos de <i>I. sonora</i> e para establecimiento <i>in vitro</i>	39
Cuadro 12. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para la germinación de semillas <i>in vitro</i> de <i>Ibervillea sonora</i> e.....	39
Cuadro 13. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para inducir organogénesis a partir de nudos axilares de <i>Ibervillea sonora</i> e.....	41
Cuadro 14. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para inducir organogénesis a partir de embriones cigóticos de <i>Ibervillea sonora</i> e.....	42

Cuadro 15. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para inducir organogénesis a partir de callos en <i>Ibervillea sonora</i>	43
Cuadro 16. Porcentaje de viabilidad de semillas de <i>I. sonora</i> por tinción con tetrazolio.....	44
Cuadro 17. Porcentaje de germinación de semillas de <i>I. sonora</i> en cámaras germinadoras.	45
Cuadro 18. Porcentaje de germinación de semillas de <i>I. sonora</i> en condiciones de invernadero.	46
Cuadro 19. Porcentaje de asepsia en nudos axilares de <i>I. sonora</i>	47
Cuadro 20. Porcentaje de asepsia en fragmentos de mesófilo de hoja de <i>I. sonora</i>	48
Cuadro 21. Porcentaje de asepsia en semillas de <i>I. sonora</i>	49
Cuadro 22. Porcentaje de asepsia en embriones cigóticos de <i>I. sonora</i>	50
Cuadro 23. Formación de brotes y callos a partir de nudos axilares de <i>I. sonora</i> bajo condiciones de luz.	51
Cuadro 24. Porcentaje de formación de brotes a partir de nudos axilares de <i>I. sonora</i> bajo condiciones de luz y oscuridad.....	52
Cuadro 25. Porcentaje de formación de callo a partir de fragmentos nodulares axilares de <i>I. sonora</i> bajo condiciones de luz y oscuridad.....	54
Cuadro 26. Características de los callos obtenidos a partir de segmentos nodulares axilares de <i>I. sonora</i>	55
Cuadro 27. Porcentaje de formación de callo a partir de segmentos de mesófilo de hoja de <i>I. sonora</i> bajo condiciones de luz y oscuridad.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>I. sonoreae</i>	4
Figura 2. Termociclador Eppendorf usado para la amplificación de fragmentos de ADN.....	8
Figura 3. Cámara de electroforesis con gel de agarosa después de la electroforesis.	10
Figura 4. Mecanismo de amplificación con ISSR	11
Figura 5. Semilla germinada de <i>I. sonoreae</i>	11
Figura 6. Esquema de tinción de semillas con tetrazolio.....	12
Figura 7. Dendograma de cuatro poblaciones de <i>Ibervillea sonoreae</i> procedentes del estado de Sonora, construido con la distancia genética de Dice ($\sqrt{1-S}$) y el método de varianza mínima de Ward.....	25
Figura 8. Ejemplo de los patrones de bandeo obtenidos con el iniciador LOL2 en dos poblaciones de <i>Ibervillea sonoreae</i> del estado de Sonora	29
Figura 9. Tinción de semillas de <i>I. sonoreae</i> con sales de tetrazolio	44
Figura 10. Desarrollo de plántulas de <i>I. sonoreae</i>	47
Figura 11. Brote y callos obtenidos a partir de nudos axilares de <i>I. sonoreae</i> bajo condiciones de luz	52
Figura 12. Brotes formados de segmentos nodulares axilares de <i>I. sonoreae</i> con los tratamientos T8 bajo luz y oscuridad y T9 bajo luz y oscuridad	53
Figura 13. Callos formados de segmentos nodulares axilares de <i>I. sonoreae</i> con los tratamientos T8 bajo luz y oscuridad y T9 bajo luz y oscuridad	54
Figura 14. Diferentes estados del desarrollo de callos obtenidos de mesófilo de hoja de <i>I. sonoreae</i>	57
Figura 15. Respuesta morfogénica de un callo obtenido de un explante nodular de <i>I. sonoreae</i>	59

ABREVIATURAS USADAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMOVA	análisis de varianza molecular
ANA	ácido α -naftalenacético
ARN	ácido ribonucleico
BA	bencilaminoadenina
BAP	6-bencilaminopurina
CTAB	bromuro de cetil-trimetil amonio
DM II	diabetes mellitus tipo II
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GA3	ácido giberélico
IBA	ácido indol butírico
ISSR	regiones entre secuencias simples repetidas
K	kinetina
MS	Murashige-Skoog
NaOCl	hipoclorito de sodio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDICMA	probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar
PIC	índice de contenido polimórfico
PVP	polivinilpilorridona
TDZ	tidiazuron
UV	ultravioleta
Z	zeatina

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque aún sigue su promesa en mi vida.

A mi padre Norberto López Olmedo, a mi madre Concepción Márquez Rivera y a mi hermana Juana Beatriz López Márquez por su apoyo incondicional en la búsqueda y realización de todos mis sueños y metas.

A mi compañero, mi apoyo incondicional durante estos dos años de estudio, Alfredo T. Rodríguez Ávila.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (CVU 736228).

Al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por darme la oportunidad de ser parte de su posgrado.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por aceptar ser parte de este proyecto y por su guía y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su apoyo desde el primer momento que llegué a la UACH y sus consejos en la parte *in vitro*.

A la M. en C. María de Lourdes Martínez Cárdenas por mostrarme el cultivo *in vitro*, por su apoyo en la búsqueda y su participación de este proyecto.

Al Dr. Alberto Búrquez Montijo y a la Dra. Enriquena Bustamante Ortega por su apoyo en la búsqueda de poblaciones y ejemplares de *I. sonoreae*.

A José Tajia Moroyoqui y familia por su hospitalidad y mostrarme la belleza natural del desierto sonorense.

Al QFB. Ricardo Gaspar Hernández y a la M. en C. María Elisa Alvarado Cano por su apoyo en la extracción de ADN y pruebas moleculares.

A la Ing. Ag. Par. Linda Arely Terrazas Morales y a L. A. P. Gisela García de la Rosa por su apoyo en las actividades en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma Metropolitana, por mi formación como biólogo.

A mis amigos, colegas y maestros que con sus palabras de entusiasmo me impulsaron a culminar una etapa más en mi vida académica.

A los maestros del posgrado, por compartir sus conocimientos y experiencia de su vida profesional y académica.

Gracias a todos.

DATOS BIOGRÁFICOS

Norberto López Márquez, nació en la Ciudad de Tehuacán en el estado de Puebla, México, el 21 de julio de 1990. Con CURP LOMN900721HPLPRR08 y cartilla militar no. 0134025. Es biólogo egresado de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, con cedula profesional número 8870663. Los estudios de bachillerato los realizó en Colegio de Bachilleres Plantel 20 “Del Valle”, en la Ciudad de México. Realizó una estancia de verano por parte del programa de la Fundación Educación Superior - Empresa titulado “Veranos por la innovación de la empresa 2014” en la empresa ANANTA S.A. de C.V. y ha trabajado como profesor en la organización “IDEA te orienta” impartiendo la asignatura de Biología a alumnos de nivel secundaria.

RESUMEN GENERAL

Ibervillea sonora o wereke es una especie enredadera, dioica y endémica de los estados de Baja California Sur, Sinaloa y Sonora que pertenece a la familia *cucurbitacea*. Se ha determinado que su raíz tiene efectos hipoglucémicos por lo que se ha colectado extensamente, provocando la reducción de las poblaciones naturales. Para explorar su variabilidad genética en el presente estudio se evaluaron molecularmente cuatro poblaciones de *I. sonora* usando 13 iniciadores ISSR que generaron 772 bandas polimórficas (100 %). El iniciador UBC816 amplificó el mayor número de bandas (115) mientras que el ISSR10 y LOL2 mostraron los mayores índices de contenido polimórfico, 23 y 22 %, respectivamente. La variabilidad molecular fue mayor dentro (83 %) que entre poblaciones (17 %). Los porcentajes de germinación de las semillas de esta especie fueron bajos en condiciones de invernadero (1.9 %) y germinadora (1.2 %) y nulos *in vitro*, a pesar de que pruebas de tetrazolio mostraron una tinción del 58.3 %. En la parte de cultivo *in vitro* se logró el establecimiento *in vitro* de semillas (90 %), mesófilo de hojas (100 %), embriones cigóticos (100 %) y nudos axilares (100 %). Se indujo la formación de callo a partir de mesófilo de hoja en medio MS (1962) al 100 % suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.5 mg L⁻¹ de K en condiciones de oscuridad (72.7 %). La formación de callos (100 %) y brotes (25 %) a partir de nudos axilares se logró con medio MS (1962) al 100 % suplementado con 1 mg L⁻¹ de ANA y 0.2 mg L⁻¹ de K (T8). La comparación entre tratamientos permitió demostrar que estos reguladores son importantes para lograr la formación de brotes y callos, respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan nueva información sobre *I. sonora* de utilidad para su manejo y conservación.

Palabras clave: *I. sonora*, caracterización molecular, respuestas morfogénicas, conservación.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Norberto López Márquez
Director de tesis: Margarita Gisela Peña Ortega

GENERAL ABSTRACT

Ibervillea sonora or 'wereke' is a dioecious creeper species endemic to the Mexican states of Baja California Sur, Sinaloa, and Sonora that belongs to the *Cucurbitacea* family. It has been determined that its root has hypoglycemic effects; therefore, it has been extensively collected causing a drastic reduction in natural populations. In order to explore its genetic variability, four natural populations of *I. sonora* were molecularly analyzed using 13 ISSR primers. A total of 772 polymorphic bands were obtained. UBC816 primer amplified the highest number of bands (115) while ISSR10 and LOL2 had high polymorphic content index values (23 and 22 %, respectively). Molecular variability within populations (83 %) was higher than between populations (17 %). Seed germination in this species was very low under all conditions: greenhouse (1.9 %), seed germination chambers (1.2 %) and *in vitro* (0 %), even though tetrazolium tests showed 58.3 % seed staining. *In vitro* establishment of seeds (90 %), leaf mesophyll (100 %), zygotic embryos (100 %), and axillar knots (100 %) was achieved. Callus formation (72.7 %) was induced from leaf mesophyll in 100 % MS (1962) medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ of 2,4-D plus 1.5 mg L⁻¹ of K, under dark conditions, while callus (100 %) and knot (25 %) formation from axillar knots was obtained using MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ of ANA plus 0.2 mg L⁻¹ of K. Treatment comparisons demonstrated that these regulators are important to achieve the formation of shoots (59.3 %) and calluses (70 %), respectively. The obtained results provide new information that could be useful for *I. sonora* management and conservation.

Keywords: *I. sonora*, molecular characterization, morphogenic responses, conservation.

Thesis of Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Norberto López Márquez
Advisor: Margarita Gisela Peña Ortega

1 INTRODUCCION GENERAL

Ibervillea sonora, conocida comúnmente como wereke, es una planta *Cucurbitacea* dioica, enredadera y endémica que se distribuye al noroeste de la República Mexicana y al sur de Estados Unidos (Vega *et al.*, 2000; Lira, 2001; Piña, 2005; Hernández *et al.*, 2009; Banderas-Dorantes *et al.*, 2012). La población mexicana usa esta especie para tratar la *diabetes mellitus* tipo II (DM II), considerada como una de las principales enfermedades y causas de muerte (SSA, 2010), buscando un remedio natural y de bajo costo (Muñetón, 2009) pues los sistemas de salud públicos son deficientes. Se ha demostrado experimentalmente su efecto hipoglucémico contra este padecimiento, así como daño hepato-tóxico (Hernández-Galicia *et al.*, 2007; Hernández, 2011; Banderas-Dorantes *et al.*, 2012; Estrada-Zúñiga *et al.*, 2012; Morales y Siles, 2013; Mejía *et al.*, 2014), por lo que las poblaciones naturales han disminuido drásticamente debido a la extracción indiscriminada de ejemplares (Hernández *et al.*, 2009).

La caracterización molecular puede desempeñar un papel fundamental en la estimación de la variabilidad genética en poblaciones de *Ibervillea sonora*, sin embargo, no existen suficientes estudios de este tipo (Piñero, 2008), los cuales serían primordiales para establecer bases para su conservación, así como para su investigación, manejo y protección, evitando así la extinción de la especie (FAO, SF; Piñero, 2008).

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales representa una herramienta biotecnológica que permite estudiar respuestas morfogénicas en especies vegetales medicinales afectadas por el saqueo indiscriminado como primer paso para lograr su regeneración, bajo condiciones controladas y de asepsia, a partir de explantes de hojas, nudos y embriones que pueden conservarse para su estudio en bancos de germoplasma para evitar su extinción. Si bien existen trabajos previos sobre respuestas morfogénicas de *Ibervillea sonora* como el realizado por Hernández y colaboradores (2009) quienes lograron inducir la formación de brotes

a partir de segmentos nodales en medio MS al 100 % (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con ANA y BAP en combinación con K, no obstante, no lograron obtener individuos completos debido a problemas de oxidación de los brotes.

Por lo anteriormente mencionado uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar las respuestas morfogénicas de *I. sonorae* usando la técnica del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, determinando la concentración y combinación de auxinas y citocininas que permitan la formación de brotes y raíces, a partir de nudos axilares y callos, el segundo objetivo fue conocer la variabilidad genética de las poblaciones naturales del Estado de Sonora realizando una caracterización molecular a través de marcadores moleculares ISSR's definiendo los iniciadores que permitan obtener las mejores huellas genómicas.

En el primer capítulo se menciona la clasificación, características y distribución del wereke, así como su uso en la medicina tradicional mexicana para pacientes diabéticos y sus efectos tóxicos, seguido por las bases experimentales sobre la caracterización molecular y el cultivo *in vitro*. Se incluye información sobre pruebas germinación y viabilidad (tetrazolio) de semillas.

En el segundo capítulo se describen los avances y resultados obtenidos en la caracterización molecular, así como la distribución de la variabilidad genética. En el tercer capítulo se actualiza el conocimiento sobre los protocolos para obtención de brotes y callos a partir de mesófilo de hojas y nudos axilares, los métodos de establecimiento de semillas, embriones, mesófilo de hojas y nudos axilares, así como los tratamientos de reguladores de crecimiento vegetal analizando las respuestas morfogénicas mediante la aplicación de análisis estadísticos.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Clasificación taxonómica

Dominio: *Eucaria*

Reino: *Plantae*

División: *Traqueofita*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Cucurbitales*

Familia: *Cucurbitaceae*

Género: *Ibervillea*

Especie: *Ibervillea sonora* S. Wats. (Greene)

2.2 Características botánicas

Ibervillea sonora Greene (*Cucurbitaceae*) también llamada wareque, waregui, wareke, guaregui, wereke o güereque, es una planta enredadera y dioica. Presenta una raíz tuberosa en forma de jícama, botella o caparazón de tortuga; de tallos delgados con entrenudos cortos y zarcillos; las hojas están profundamente disectadas en tres lóbulos primarios; flores con corola campanulada amarilla, amarillo-verdosa o blanquecina; el fruto es una baya, va de ovoide a elipsoide, indehiscente, de color verde y frecuentemente con manchas más claras o blancas cuando no es maduro, anaranjado o rojo al madurar con semillas negras a pardas oscuras ovadas, de 0.4 a 0.6 centímetros de ancho y de 0.4 a 1 centímetros de largo (Figura 1) (Lira, 2001; Hernández *et al.*, 2009; Banderas-Dorantes *et al.*, 2012).



Figura 1. *I. sonora*. A) Planta completa. B) semillas. C) hoja trilobulada y fruto inmaduro.

2.3 Distribución

Se distribuye en México (Sonora, Sinaloa, Baja California Sur) y Estados Unidos (Texas, Nuevo México y Arizona) de manera dispersa en zonas áridas. Con suelos arcillosos-arenosos, formando comunidades vegetales con *Bursera hindsiana*, *Solanum hinsianum*, *Aeschynomene nivea*, *Jatropha cinerea* y *Stenocereus thurberi* (Vega *et al.*, 2000; Lira, 2001; Piña, 2005; Banderas-Dorantes *et al.*, 2012). Las precipitaciones en estas localidades oscilan entre los 50 y 150 milímetros (CONAGUA, 2016), indispensables para que esta especie pueda reverdecer, florecer y fructificar (Hernández *et al.*, 2009).

2.4 *I. sonora* en la Medicina Tradicional Mexicana

La raíz de *I. sonora* o wereke se usa ampliamente para el control de la *diabetes mellitus* II por su efecto hipoglucemiante, actúa directamente en las células β pancreáticas como modulador de la secreción de insulina debido a su efecto sobre los canales de K-ATP. Se vende entera o en fragmentos, pastillas, concentrados y polvo. Se cuenta con estudios sobre los componentes fitoquímicos contenidos en la raíz como agliconas, cucurbitanos y ácidos grasos, los posibles efectos hipoglucémicos y tóxicos en su consumo (Hernández-Galicia *et al.*, 2007;

Hernández, 2011; Banderas-Dorantes *et al.*, 2012; Estrada-Zúñiga *et al.*, 2012; Morales y Siles, 2013; Mejía *et al.*, 2014).

2.5 Caracterización molecular

La caracterización molecular es una herramienta biotecnológica que desempeña un papel fundamental en la estimación de la variabilidad genética presente en poblaciones naturales permitiendo establecer prioridades de conservación y aprovechamiento de las especies y recursos vegetales (FAO, SF; Piñero, 2008).

2.5.1 Variabilidad genética

La variabilidad genética es la base de la biodiversidad, definiéndose como las variaciones genéticas heredables que ocurren entre los seres vivos. Esta variabilidad se reduce cuando la población disminuye substancialmente y aumenta la reproducción entre organismos emparentados (Piñero, 2008).

2.5.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares permiten conocer la diversidad y variabilidad genética entre y dentro de poblaciones o especies. Se basan en el análisis químico de diferencias en moléculas como ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico) y proteínas (González y Aguirre, 2007; Rocha *et al.*, 2014), algunos de ellos están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.5.3 Extracción de ADN

Los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos puros para después realizar análisis específicos como la PCR, entre otros. La calidad y pureza de los ácidos nucleicos son los elementos importantes en este análisis, por lo que es preciso aplicar un método de extracción adecuado. La base es provocar la lisis celular que inactiva las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos celulares.

2.5.3.1 Método CTAB de extracción y purificación de ADN

El método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) fue elaborado por Murray y Thompson en 1980 (Murray y Thompson, 1980). Es adecuado para extraer y purificar ADN de vegetales debido a que elimina los polisacáridos y los compuestos poli-fenólicos que alterarían la pureza y calidad del ADN inhibiendo numerosas reacciones enzimáticas.

Las células vegetales se lisan con el detergente iónico CTAB, que forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino. De ese modo los polisacáridos, compuestos fenólicos y los demás contaminantes permanecen en el sobrenadante y pueden eliminarse por lavados. El complejo de ADN se solubiliza aumentando la concentración salina y se precipita con isopropanol.

La muestra se tritura con nitrógeno líquido en un matraz estéril hasta homogenizarse y se trata con el tampón de extracción que contiene EDTA, Tris-HCl, NaCl, 2-mercaptoetanol y CTAB. Con una concentración salina el detergente forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos. El EDTA es un componente quelante, que se une al magnesio, entre otros metales. Al unir el magnesio al EDTA, la actividad de la desoxirribonucleasa presente disminuye. El Tris-HCl confiere a la solución la capacidad de amortiguar el pH, pues un cambio superior o inferior en él podría dañar el ADN. Una vez que se han roto las membranas de la célula y de los orgánulos, mitocondrias y los cloroplastos, se purifica el ADN (Falcon y Valera, 2007).

Se separan los complejos formados por ácidos nucleicos, polisacáridos, compuestos fenólicos, proteínas y los demás lisados celulares disueltos en la solución los cuales se eliminan extrayendo la solución acuosa con cloroformo: alcohol isoamílico, el cual desnatura las proteínas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica. Una vez purificados los complejos de ácidos nucleicos se procede a la precipitación, en la cual se separan del detergente, mediante una solución de precipitación de acetato de potasio (3 M). El posterior tratamiento con

etanol al 70 % permite una mayor purificación y elución de los ácidos nucleicos de la sal residual (Falcon y Valera, 2007).

2.5.4 Técnica de la PCR

La técnica de la PCR consiste en sintetizar de manera exponencial un fragmento de ADN utilizando la polimerasa Taq, obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*. Se simula el proceso natural de replicación del ADN (Espinosa, 2014), agregando los ingredientes del Cuadro 1.

Cuadro 1. Componentes para realizar la mezcla de reacción.

Reactivos	Inicial	Final	1 reacción (1x, 25 μ L)
Agua	-	-	5.2 μ L
dNTP's	500 μ M c/u	200 μ M	100.0
Amortiguador	10x	1x	25.0
MgCl ₂	50 mM	3.0 Mm	15.0
Iniciador	10 ng/ μ L	30 ng	30.0
ADN Taq pol	5 U• μ L ⁻¹	1.5 U/reacción	3.0
ADN	10 ng• μ L ⁻¹	25 ng	-

Se coloca cada uno de los componentes en la concentración adecuada en microtubos para realizar la amplificación en el termociclador (Figura 2), el cual se programa como lo indica en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Programa del termociclador.

Etapas	T °C	Tiempo	Ciclos
Pre-desnaturalización	93	1 minuto	1
Desnaturalización	93	20 segundos	40
Alineamiento	*	1 minuto	
Extensión	72	20 segundos	
Extensión final	72	6 minutos	1
Enfriamiento	10	∞	-



Figura 2. Termociclador Eppendorf usado para la amplificación de fragmentos de ADN.

Desnaturalización

El termociclador calienta las muestras a 93 °C durante 1 minuto lo que ocasiona que las cadenas dobles del ADN se abran o se desnaturalicen rompiendo los puentes de hidrogeno que se forman entre las bases nitrogenadas de cada nucleótido, quedando como cadenas sencillas (Espinosa, 2014).

Alineamiento

Después se ajusta la temperatura en el termociclador según la secuencia del iniciador, para lograr la formación de puentes de hidrogeno entre los iniciadores y el ADN por lo que en aquellas uniones más estables (complementarias) la polimerasa se unirá comenzando a copiar la cadena en sentido 5' a 3' (Espinosa, 2014).

Extensión

La enzima Taq polimerasa alcanza su máxima actividad a 72 °C, sintetizando los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos ya alineados (Espinosa, 2014).

En el primer ciclo, a esta temperatura se sintetizan, los primeros fragmentos a partir del ADN, los cuales serán un poco más grandes ya que la taq copiará hasta donde

le sea posible. Se obtienen en cantidades tan pequeñas que no son detectables por lo que el ciclo se repite varias veces, donde los oligonucleótidos además de unirse al ADN, también se unen a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo, por lo que se sintetizan dos fragmentos copiados directamente del ADN y dos fragmentos del tamaño que hay entre los dos oligonucleótidos que se han usado. De esta forma con cada ciclo aumenta el número de fragmentos en forma exponencial. Se programan dos pasos más, uno al principio llamado pre-desnaturalización a 93 °C por 1 minuto para iniciar con la desnaturalización y un último paso de extensión final a 72°C para permitir que la taq termine de sintetizar todos los fragmentos que quedaron incompletos (Espinosa, 2014).

Electroforesis

Esta técnica permite separar los diversos fragmentos obtenidos en la PCR en geles de agarosa o de acrilamida de acuerdo al tamaño de cada uno. Ambos forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, donde los fragmentos de ADN son arrastrados por una corriente eléctrica hacia el polo positivo, ya que la carga del ADN es negativa debido a la presencia de grupos fosfatos. Los fragmentos se separan por tamaño siendo los más pequeños los que avanzan más rápidamente mientras que los grandes son retenidos en los hoyos; de esta manera los fragmentos de tamaños similares migran a ritmos similares. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán todos formando una banda en el gel (Espinosa, 2014).

Esta técnica de separación requiere una cámara de electroforesis (Figura 3), una fuente de poder, un transiluminador de luz UV y equipo de fotografía (una cámara polaroid, un filtro para luz UV y un cono adaptado a la cámara) para guardar la imagen del gel (Espinosa, 2014).

El amortiguador de corrida debe tener el pH requerido y los iones necesarios para que la corriente fluya y el ADN pueda migrar. La concentración del gel de agarosa depende del tamaño esperado de los fragmentos a separar, con lo que se obtendrán bandas con buena resolución (Espinosa, 2014).



Figura 3. Cámara de electroforesis con gel de agarosa después de la electroforesis.

2.5.5 Marcadores ISSR

Las Regiones Intermedias entre Secuencias Simples Repetidas o por sus siglas en inglés Inter Simple Sequence Repeat, son marcadores moleculares que permite observar la variación entre regiones microsatélite las cuales son secuencias simples repetidas que se encuentran dispersas en todo el genoma. Dichas regiones presentan una alta tasa de mutación por inserciones y deleciones que ocurren durante la replicación del ADN (Rocha *et al.*, 2014; Vázquez y Morales, 2014). Los iniciadores de ISSR son una secuencia repetida de un di - o trinucleótido complementario al microsatélite, de 6 a 25 pb. Por lo que dos secuencias repetidas cercanas y en orientación invertida, cada una con su iniciador, se encuentran y son amplificadas por la Taq-polimerasa (Figura 4) (Hernández, 2013; Rocha *et al.*, 2014; Vázquez y Morales, 2014). Los ISSR generan una gran cantidad de bandas polimórficas las cuales son determinadas como dominantes, es decir, no permite diferenciar entre los genotipos homocigoto dominante (AA) o heterocigoto (Aa); por lo que cada banda representa un locus con dos alelos y el alelo dominante está en equilibrio Castle-Hardy-Weinberg con el alelo recesivo (Hernández, 2013). Se genera una “huella genética” de cada uno de los individuos estudiados. Este método permite obtener polimorfismo entre individuos de diferentes poblaciones (González y Aguirre, 2007; Hernández, 2013; Rocha *et al.*, 2014).

oxidación, por lo que liberan electrones capaces de reducir ciertas sustancias químicas (Rodríguez-Quilón *et al.*, 2008).

Las soluciones de estas sales (cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) son incoloras, pero cuando se reducen se transforman en trifenilformazán, una sustancia estable, no difusible y de un color rojo intenso. Al colocar una semilla viable en contacto con una solución de tetrazolio, los electrones liberados por los tejidos del embrión, reducirán a las sales de tetrazolio adquiriendo un color rojo intenso. A veces, los embriones se colorean parcialmente, lo que indica la existencia de áreas de tejidos muertos, debido al deterioro de la semilla. Para que la semilla se considere viable tanto el embrión como los cotiledones deberán teñirse de color rojo (Figura 6).

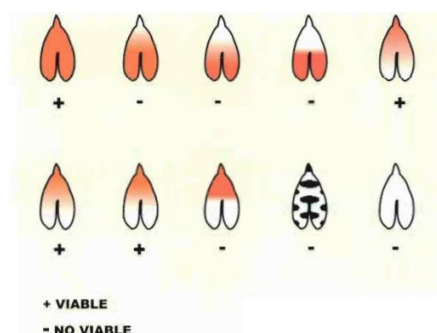


Figura 6. Esquema de tinción de semillas con tetrazolio. Tomado de Pérez y Pita (S. F.)

2.7 Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* es una herramienta biotecnológica que consiste en cultivar de forma aséptica tejidos, órganos y células vegetales en medios nutritivos adecuados (con minerales, vitaminas, aminoácidos y azúcares), adicionados en algunos casos con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) bajo condiciones ambientales controladas (Smith, 2012). El medio de cultivo nutritivo más usado es el propuesto por Murashige y Skoog (MS) (1962). Las aplicaciones de esta técnica abarcan desde la micropropagación a pequeña y gran escala (bio-reactores), producción de metabolitos secundarios (bio-reactores), producción de plantas transgénicas, germinación de semillas, rescate de embriones, producción de semillas somáticas,

así como la obtención de individuos haploides derivados de micrósporas y granos de polen (androgénesis) (Smith, 2012).

Para lograr el establecimiento de los explantes *in vitro* es necesario tener un protocolo de desinfestación, el cual incluye el lavado de los explantes con agua destilada, el empleo de etanol al 70 %, hipoclorito de sodio (NaClO) al 20 % y jabón líquido comercial. Posteriormente, los explantes se enjuagan con agua destilada esterilizada (Echenique *et al.*, 2004; Garcidueñas, 2013).

2.7.1 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

Los RCV son sustancias orgánicas efectivas, naturales o sintéticas, que producen un efecto fisiológico específico en las plantas. Entre ellas se encuentran las auxinas, citocininas y giberelinas. Las primeras tienen la capacidad de regular el crecimiento, la división y diferenciación celular. Las más utilizadas *in vitro* son ANA (ácido α -naftalenacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e IBA (ácido indol butírico). Las segundas son esenciales para accionar procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas. *In vitro* se emplean Z (zeatina), K (kinetina), BAP (bencilaminopurina o bencilaminoadenina) y TDZ (tidiazuron). Las terceras están involucradas en el proceso de germinación de semillas y elongación de tallos, siendo GA3 (ácido giberélico) el más usado (Jordán y Casaretto, 2006; Lluna, 2006; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Smith, 2012; Taiz y Zeiger, 2016).

2.7.2 Respuestas morfogénicas

Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel importante sobre las respuestas morfogénicas de los explantes por lo que se deben optimizar para cada especie (Echenique *et al.*, 2004; Smith, 2012; Garcidueñas, 2013).

La forma más usual para obtener respuestas morfogénicas es exponer los explantes, en medios de cultivo, a diversos tipos y concentraciones de RCV. Para lograr la formación de brotes será necesaria una mayor concentración de citocininas que auxinas, mientras que para formar raíces se emplea una relación contraria o

sólo auxinas. La formación de callo se induce con una concentración igual de auxinas y citocininas. Se usan las giberelinas para alargar tallos y combinadas con citocininas para germinar semillas (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Smith, 2012; Taiz y Zeiger, 2016).

2.7.3 Oxidación y necrosamiento

La presencia de compuestos fenólicos oxidados se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explante o durante la transformación. Estos compuestos pueden inhibir el crecimiento e incluso matar al explante (necrosamiento). Para minimizar su daño se emplean agentes adsorbentes de fenoles en el medio de cultivo tales como polivinilpirrolidona (PVP) y nitrato de plata (AgNO_3) o antioxidantes como ácido cítrico, ácido ascórbico y L-cisteína; la modificación del potencial redox con agentes reductores, la inactivación de las fenoloxidasas con agentes quelantes o la reducción de su actividad o afinidad por el sustrato utilizando un pH bajo, o bien cultivando en condiciones de oscuridad (Echenique *et al.*, 2004).

OBJETIVO GENERAL

Conocer la variabilidad genética de poblaciones naturales de *Ibervillea sonora* del estado de Sonora, México y evaluar sus respuestas morfogénicas *in vitro* para contribuir al estudio y preservación de este recurso vegetal endémico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar la caracterización molecular de las poblaciones de colecta mediante marcadores tipo ISSR que permita determinar la distribución de la variabilidad genética, así como identificar los iniciadores más útiles en la discriminación de individuos de esta especie.

Definir las combinaciones y concentraciones de citocininas y auxinas que permitan la formación de raíces y brotes a partir de nudos axilares y callos.

HIPÓTESIS

Debido a la disminución de las poblaciones naturales de *Ibervillea sonora* en el estado de Sonora, se espera que el análisis molecular refleje poca variación genética entre y dentro de poblaciones.

La formación de brotes a partir de nudos axilares de *Ibervillea sonora* requerirá mayores concentraciones de citocininas que de auxinas, mientras que la formación de raíces demandará invertir esta relación.

LITERATURA CITADA

Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2da Edición Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. 656 p.

Banderas-Dorantes, T. R.; Román-Ramos, R.; Zamilpa, A.; García-Macedo, R.; Díaz, M.; Campos M., G.; Tortoriello, J.; Alarcón-Aguilar, F. J. 2012. Influence of two hypoglycemic *Cucurbitaceae* (*Cucurbita ficifolia* Bouché and *Ibervillea sonora* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas Vol. 11: 510 – 519.

Comisión Nacional del Agua. CONAGUA. 2016. Bases de datos climáticos del noroeste de México: <http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/dcbc.php#>

Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp. 353 – 362.

Escalante F., E. A. 2005. Producción de plantines de melón (*Cucumis melo* L.), cv. 'Honey green', con diferentes temperaturas del agua de riego en invernadero. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú. pp. 18 – 19

Espinosa A., L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. 2014. In Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos. Cornejo R., A., A. Serrato D., B. Rendón A. y M. G. Rocha M. (comps). Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, Distrito Federal. pp. 517– 539.

Estrada-Zúñiga, M.E.; Arano-Varela, H.; Buendía-González, L.; Orozco-Villafuerte, J. 2012. Ácidos grasos, contenido de fenoles y actividad antioxidante en cultivos de callos de *Ibervillea sonora*. Revista Mexicana de Ingeniería Química 11: 89-96.

Falcon I, L., Valera, A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. *In* Ecología Molecular. Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X. (comps). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México. pp. 499-515.

FAO. SF. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. In Estado de la cuestión en la gestión de los recursos zoo genético. 393 – 416 pp. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s17.pdf>

Garcidueñas P., J. A. 2013. Caracterización morfológica y molecular de piña *Ananas comosus* (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. 38 p.

González G., A.; Aguirre D., X. 2007. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) *In* Ecología molecular. Eguiarte, L. E.; Souza, V.; Aguirre D., X. (comps.) Instituto Nacional de Ecología. México, Distrito Federal. pp. 567 – 571.

Hernández D., A. F. 2011. Producción de extractos de *Ibervillea sonora* y su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria en Biotecnología. México, Distrito Federal. 68 p.

Hernández E., E.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Martínez-Cárdenas, M. de L. 2009. Avances en la propagación *in vitro* de *Ibervillea sonora* Greene para su conservación. Anuario de Investigación en Etnomedicina, Medicinas Complementarias y Utilización de Plantas Medicinales. Universidad Metropolitana-Iztapalapa, México. pp. 53-60.

Hernández-Galicia, E.; Calzada, F.; Román-Ramos, R.; Alarcón-Aguilar, F. J. 2007. Monoglycerides, and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: isolation and hypoglycemic activity. *Planta Medica*. 73: 236 - 240.

Jordán, M.; Casaretto, J. 2006. Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, Chile. 511 pp. Disponible en: <http://www.biouls.cl/librofv/web/index03.php>

Lira S., R. 2001. *Cucurbitaceae*. *In*: Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. De Rzedowski, J.; Calderón de R. G. (eds.). Instituto de Ecología A.C. México, Distrito Federal. Fascículo 92. pp. 62–63.

Lluna D., R. 2006. Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Revista Horticultura* 196: 22-26.

Mejía A., L. E.; Valencia T., G.; Gómez y G., Y. M.; Cabrera L., A. I.; Ramírez S., M. G. 2014. *Ibervillea sonora*: caracterización de sus metabolitos secundarios con potencial actividad farmacológica. *In* Memorias del XIX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VIII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XII

Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, 9-11 de abril, Mazatlán, Sinaloa. pp. 8.

Morales D., M.; Siles, S. 2013. Identificación de los principales componentes de la raíz de wereque, extraíbles en medio acuoso, por GC-MS. *Avances en Ciencias e Ingeniería* 4: 15 – 21.

Muñetón P., P. 2009. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria* 10: 2-9.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.

Piña P., F. 2005. Descripción, distribución y propagación de cuatro plantas medicinales de Baja California Sur. Folleto Técnico 9. Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Centro de Investigación Regional del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México. 30 p.

Piñero, D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, *In* Capital Natural de México, Volumen I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Uso y Manejo de la Biodiversidad. México, Distrito Federal. pp. 437 - 491. Disponible en: [http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/15_Ladiversidad gen.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/15_Ladiversidad%20gen.pdf)

Pérez G., F.; Pita V., J. M. S.F. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Hojas Divulgadoras 2112 HD. pp. 4 – 6. <http://www.coiaclc.es/wp-content/uploads/2016/05/Viabilidad.pdf>

Rocha M., M. G.; González G., A.; Aguirre D., X. 2014. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas (ISSRs). *In* Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos. Cornejo R., A., A. Serrato D., B. Rendón A. y M. G. Rocha M. (comps). Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México Distrito Federal. pp. 101 – 127.

Rodríguez-Quilón, I., Adam, G., Durán, J.M. 2008. Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura* 8:836-842.

Sánchez-Hernández, M. A.; Sánchez-Hernández, C.; Villanueva-Verduzco, C.; Gil-Vázquez, I.; Jiménez-Rojas, M.C.; Sánchez-Cabrera, I. 2009. Multiplicación *in vitro* vía organogénesis en calabaza. *Revista Agronomía Mesoamericana* 20(1): 11-22.

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la *diabetes mellitus*.

Disponible en:http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010.

Smith, R. H. 2012. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Third Edition. Academic Press Elsevier. United States of America. pp: 63 -76.

Vázquez L., Y. A.; Morales G., A. E. 2014 Microsatélites. *In* Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos. De Cornejo R., A.; Serrato D., A.; Rendón A., B.; Rocha M., M. G. (comp.) Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, Distrito Federal. pp. 75 – 100.

Vega A., R.; Aguilar H., H.; Gutiérrez G., J. A.; Hernández V., J. A. 2000. Endemismo regional presente en la flora del municipio de Culiacán, Sinaloa, México. *Acta Botánica Mexicana* 53: 1 – 15.

3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CUATRO POBLACIONES DE *Ibervillea sonorae* DEL ESTADO DE SONORA

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FOUR POPULATIONS OF *Ibervillea sonorae* FROM SONORA STATE

3.1 RESUMEN

Ibervillea sonorae o wereke es una *cucurbitaceae* endémica de los estados de Sonora, Sinaloa y Baja California Sur usada extensamente con fines medicinales por la población mexicana contra la *diabetes mellitus tipo II* (DMII), aun cuando se ha demostrado también su efecto toxico, disminuyendo así el número de individuos y por tanto la variabilidad genética debido al saqueo indiscriminado de ejemplares. Por lo que este estudio tuvo como objetivo evaluar la variabilidad presente en poblaciones naturales en el estado de Sonora para contribuir a los programas de conservación y manejo de esta especie. Los 13 iniciadores ISSR seleccionados generaron 772 bandas polimorficas (100 %). UBC816 amplificó el mayor número de bandas (115) y MESL3 el menor (21). Los iniciadores que presentaron los mayores valores de contenido de información polimórfica (PIC) fueron ISSR10 (23 %) y LOL2 (22 %). La variabilidad molecular fue mayor dentro de las poblaciones (83 %), que entre poblaciones (17 %). Los 68 individuos estudiados de *Ibervillea sonorae* se agruparon en el dendograma de acuerdo a su origen de colecta.

Palabras clave: *Ibervillea sonorae*, ISSR, variabilidad genética.

3.2 ABSTRACT

Ibervillea sonora or wereke is a cucurbitaceae endemic to the Mexican states of Sonora, Sinaloa and Baja California Sur, that has been extensively used for medicinal purposes by Mexican population to control *diabetes mellitus* type II (DMII); although its hepatotoxic effect has been demonstrated, thus decreasing the number of specimens and, consequently, reducing population genetic variability. So, this study aimed to evaluate remained genetic variability in four natural populations collected at Sonora state, to contribute to conservation and management programs for this species. 13 ISSR selected primers generated 772 polymorphic bands (100 %). UBC816 amplified the largest number of bands (115), and MESL3 the lowest (21). Whereas the ISSR primers that presented the highest values of polymorphic information content (PIC) were ISSR10 (23 %) and LOL2 (22 %). Molecular variability was higher within populations (83 %) than among populations (17 %). The 68 studied individuals of *Ibervillea sonora* were grouped in the dendrogram according to their geographical sites of collection.

Keywords: *Ibervillea sonora*, ISSR, genetic variability.

3.3 INTRODUCCIÓN

La caracterización molecular es una herramienta biotecnológica que permite, al generar huellas genómicas, conocer la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones, para establecer programas de conservación y manejo. Se puede realizar a través de la amplificación de fragmentos de ADN (ácido desoxirribonucleico) por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando iniciadores ISSR (regiones entre secuencias simples repetidas), los cuales son altamente polimórficos y repetibles. Los ISSR en *Cucurbitaceas* han permitido cuantificar la variabilidad y diversidad dentro y entre especies (Montes y Eguiarte, 2002; Djé *et al.*, 2006; Dalamu *et al.*, 2012; De Payel *et al.*, 2015; Esmailnia *et al.*, 2015). Cuando las poblaciones naturales disminuyen hay pérdida de variabilidad genética debido a que se eliminan genotipos diferentes y hay reproducción entre organismos emparentados (Djé *et al.*, 2006).

Ibervillea sonorae es una planta enredadera dioica *cucurbitacea* endémica de los estados de Sonora, Sinaloa y Baja California Sur en México, así como el sur de Estados Unidos. Tiene una gran raíz tuberosa la cual es usada para controlar la *DMII*, una de las principales causas de muerte y enfermedades crónicas entre la población mexicana, por lo que un gran número de enfermos que buscan remedios naturales y de bajo costo para tratarla la utilizan, ocasionando que las poblaciones naturales disminuyan drásticamente por el saqueo indiscriminado de ejemplares (Hernández *et. al*, 2009). El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización molecular de cuatro poblaciones de *I. sonorae* del estado de Sonora para evaluar la variabilidad genética existente, fundamentando las bases para su estudio y conservación.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes de 68 plantas, pertenecientes a cuatro localidades en el estado de Sonora (Cuadro 3), las cuales se guardaron en refrigeración a 5°C hasta su uso.

Cuadro 3. Localidades de colecta de los materiales vegetales para el estudio de variabilidad genética.

No.	Localidad	Coordenadas Geográficas	Altitud (msnm)	Temperatura promedio anual (°C)	Precipitación (mm)
1	La Colorada	LN 28° 44' 50.6" LE 110° 25' 54.2"	405	17.54	345.7
2	Teachive	LN 26° 47' 38.5" LE 109° 14' 00.6"	98	20.93	370.4
3	Navojoa	LN 26° 36' 08.3" LE 109° 05' 24.7"	96	22.03	435.7
4	Masiaca	LN 26° 48' 07.3" LE 109° 14' 34.5"	66	20.15	486.4

En las tres primeras poblaciones se colectaron hojas de 8 individuos femeninos con fruto, mientras que de los 9 restantes se desconoce el sexo. En la localidad cuatro se muestrearon 6 individuos femeninos y de los 9 restante se desconoce su sexo.

3.4.2 Extracción y purificación de ADN genómico

La extracción del ADN se realizó por el método CTAB (Murray y Thompson, 1980) en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, localizada a 19° 28' 60.0" LN y 98° 52' 60.0' LE, con altitud de 2240 msnm, con temperatura media anual de 15.9 °C y una precipitación media anual de 686 mm. Para tal objetivo se pesaron 0.3 g de material vegetal utilizando como amortiguador de extracción: Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na₂ 50 mM, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 %, pH 8.0. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos, al sobrenadante se le adicionó isopropanol frío y se dejó precipitar el ADN por 60

minutos. Luego se agregó solución STE (Tris-HCl 50 mM, EDTA- Na_2 10 mM, NaCl 100mM, pH 8.0) y ARNasa-A (10 mg mL^{-1}) incubándose a 37 °C por una hora. Se utilizó acetato de sodio 3 M con isopropanol frío para precipitar el ADN, el cual se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El ADN se lavó con etanol 70 % (v/v) y se dejó secar; para almacenarlo se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, pH 8.0). El ADN así obtenido se mantuvo en refrigeración hasta su uso. La cantidad y pureza del ADN de cada muestra se midió con un espectrofotómetro Nanodrop Lite Thermo Scientific. Para determinar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en agarosa que se tiñó con bromuro de etidio, las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador DigiDoc-it Imaging System (UVP®). Las imágenes obtenidas se documentaron mediante una cámara Kodak ® EDAS290.

3.4.3 Obtención de patrones ISSR

Se probaron 48 iniciadores ISSR (Sigma®) y se seleccionaron los 13 que produjeron el mayor número de bandas nítidas y con polimorfismo (Cuadro 4). La amplificación de los segmentos de ADN se llevó a cabo mediante PCR en termocicladores Techne Modelo TC-412 y Eppendorf modelo 5331. La mezcla de reacción incluyó los reactivos siguientes: H_2O grado biología molecular, dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP a una concentración 500 μM), amortiguador de PCR 10X, MgCl_2 50 mM, iniciador 10 ng μL^{-1} , Taq ADN polimerasa 5 U μL^{-1} y el ADN genómico obtenido de las muestras homogeneizado a una concentración de 10 ng μL^{-1} . La mezcla fue sometida a un ciclo inicial de desnaturalización de 8 minutos a 93 °C; 40 ciclos de 1 minuto a 93 °C, 1 minuto a la temperatura de alineamiento recomendada para cada iniciador (Cuadro 4) y 1 minuto a 72 °C, concluyendo con un ciclo de extensión final de 6 minutos a 72 °C. La separación de los productos amplificados se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % con amortiguador TAE (40 mM Tris acetato, pH 7.6; 1 mM Na_2EDTA), el cual se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas en luz ultravioleta de un transiluminador DigiDoc-it Imaging System (UVP®). Las imágenes obtenidas se documentaron mediante una cámara Kodak ® EDAS290.

Cuadro 4. Iniciadores ISSRs utilizados, secuencia (5' - 3'), temperatura de alineamiento y número de bandas amplificadas en cuatro poblaciones de *Ibervillea sonora*.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Ta °C	BT	BP	% P
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	62	52	52	100
ISSR3	(GA) ₈ CTC	58	101	101	100
ISSR7	(AG) ₈ CTG	60	63	63	100
ISSR10	(GA) ₈ T	50	25	25	100
LOL2	(CT) ₈ G	52	49	49	100
LOL8	(CA) ₈ T	50	58	58	100
MESL3	(GA) ₈ CTG	58	21	21	100
PI01	(CT) ₈ AC	54	43	43	100
UBC815	(CTC) ₆	60	60	60	100
UBC816	(TG) ₇ G	56	115	115	100
UBC842	(CT) ₈ GC	56	51	51	100
UBC844	(GT) ₆ CC	60	69	69	100
UBC866	(CA) ₆ AGCT	60	65	65	100
			772	772	100

Ta: Temperatura de alineamiento, BT: Bandas totales, BP: Bandas polimórficas, % P: Porcentaje de polimorfismo.

3.4.4 Análisis estadístico

Se cuantificó el número de bandas producto de la amplificación asignándose el valor de 1 a la presencia y de 0 a la ausencia de cada banda, de esta manera se construyó una matriz básica de datos (MBD) para realizar los diferentes análisis. Para las similitudes genéticas se utilizó la distancia genética de Dice con la transformación $\sqrt{1-S}$, el análisis de agrupamiento se realizó con el método de varianza mínima de Ward; adicionalmente se calculó el AMOVA. Todos estos análisis fueron realizados usando el programa Infogen® (Universidad de Córdoba, Argentina).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Análisis de variabilidad genética

Para explorar la variabilidad genética presente en las poblaciones muestreadas de *Ibervillea sonora*, mediante la MBD obtenida a partir de los patrones de bandeo se calcularon las distancias genéticas de Dice ($\sqrt{1-S}$) entre pares de individuos y con

ellas se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el método de varianza mínima de Ward mediante el programa estadístico Infogen®.

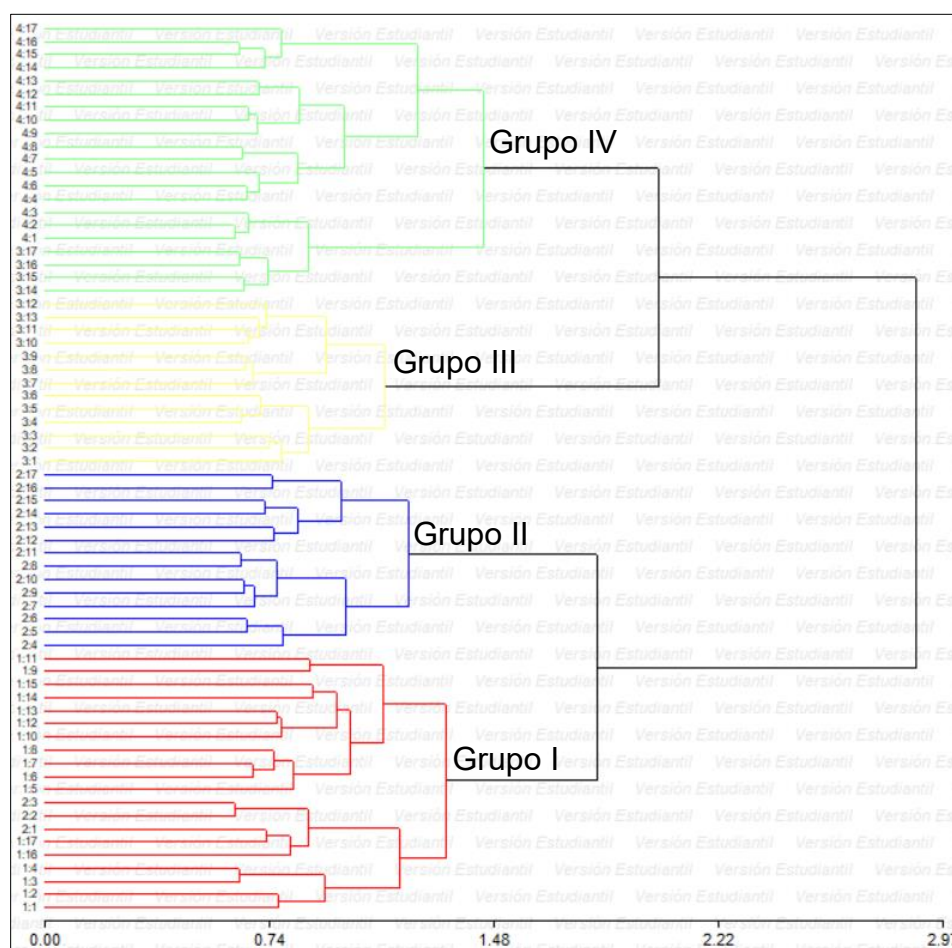


Figura 7. Dendrograma de cuatro poblaciones de *Ibervillea sonorae* procedentes del estado de Sonora, construido con la distancia genética de Dice ($\sqrt{1-S}$) y el método de varianza mínima de Ward.

La Figura 7 muestra que los marcadores tipo ISSR fueron eficaces para separar mayoritariamente a los individuos de *Ibervillea sonorae* muestreados de acuerdo a la población de origen, por lo que se formaron cuatro grupos. El grupo I está formado por 20 individuos, de los cuales 17 corresponden a la población “La Colorada” y 3 a “Teachive”.

El grupo II se integró por 14 individuos de la población “Teachive”. El tercer grupo está conformado por 13 individuos de la población “Navojoa”, mientras que el grupo IV estuvo formado por 21 individuos, 17 de los cuales pertenecientes a la población “Masiaca” y 4 a “Navojoa”. La menor distancia genética entre grupos fue de 1.92

entre los grupos I y II, mientras que las mayores distancias entre grupos (2.88) se presentaron entre el grupo I y los grupos III y IV.

Ibervillea sonora es una especie cuya reproducción y dispersión de semillas depende totalmente de diversos animales, por lo que la falta de concordancia de los individuos agrupados en los grupos I y IV respecto a su población de origen podrían deberse al intercambio de polen generado por aves, murciélagos, moscas, mariposas, abejas, escarabajos, polillas y avispas, así como a la dispersión de semillas por liebres, conejos, ratones, aves, anfibios y reptiles (Chambers, 2004). Montes y Eguiarte (2002) en su estudio enuncian que los polinizadores y dispersores de semillas juegan un papel importante en el flujo genético, así como la diferenciación entre poblaciones de subespecies de *Cucurbita argyrosperma* y *C. moschata*.

Las poblaciones más cercanas geográficamente fueron “Teachive” y “Masiaca” (grupos II y IV) a 1.2917 Km de distancia, sin embargo, el dendograma las muestra como las más distantes genéticamente. En este caso los asentamientos humanos funcionan como una barrera geográfica importante. En un estudio de *Citrullus lanatus* realizado por Djé *et al.* (2010), estos autores atribuyen la formación de grupos de variabilidad genética al intercambio, conservación y aislamiento de los genotipos llevados a cabo por las mujeres que habitan en la zona de distribución de esta especie.

En este estudio, la mayor distancia geográfica entre sitios de colecta se presentó entre “La Colorada” y “Navojoa” (grupos II y III), la cual fue de 272.9919 Km, lo cual coincide con la mayor distancia genética calculada entre estos dos grupos.

La estructura jerárquica de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de *Ibervillea sonora* muestreadas fue explorada mediante el análisis molecular de varianza (AMOVA) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza molecular de cuatro poblaciones de *Ibervillea sonorae* del estado de Sonora, de acuerdo a sus perfiles moleculares ISSR.

FV	SC	GL	CM	p-valor	Componentes de Varianza	Variación %
Población	758.43	3	252.81	<0.0001	11.58	17.12
Dentro	3585.53	64	56.02	<0.0001	56.02	82.88
Total	4343.96	67	64.84		67.6	100.00

FV = fuente de variación, SC = suma de cuadrados, GL = grados libertad, CM = cuadrados medios.

Los resultados obtenidos muestran que la diversidad molecular dentro de cada una de las cuatro poblaciones muestreadas fue mayor (82.9 %) que la que se presenta entre poblaciones (17.1 %). Estos resultados coinciden con los encontrados en trabajos de caracterización molecular de razas locales de *Citrullus lanatus* llevados a cabo por Djé *et al.* (2010), quienes encontraron que el 91 % de la variabilidad molecular se presentó dentro de poblaciones.

3.5.2 Descriptiva de marcadores

En el Cuadro 6 se presenta la descriptiva de los 13 iniciadores ISSR utilizados en el presente estudio para obtener los perfiles moleculares (Figura 8) de 67 plantas de *Ibervillea sonorae* colectadas en cuatro localidades del estado de Sonora. En él puede apreciarse que generaron un total de 772 bandas, todas ellas polimórficas (100 % de polimorfismo). Los iniciadores UBC816 e ISSR3 fueron los que amplificaron el mayor número de bandas (115 y 101, respectivamente). Sin embargo, los iniciadores que presentaron los mayores valores de contenido de información polimórfica (PIC) fueron ISSR10 (23 %) y LOL2 (22 %). Por otra parte, los iniciadores LOL2, ISSR2, ISSR10, PI01 y UBC842 fueron los que mostraron una mayor capacidad discriminatoria al presentar la menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar. Por lo que serían los más útiles en estudios posteriores de caracterización molecular en esta especie.

Los resultados obtenidos en el presente estudio tanto para el porcentaje de bandas polimórficas y los valores de contenido de información polimórfica (PIC) son similares a los reportados en otros trabajos. Djé *et al.* (2010) estudiaron razas

locales de *Citrullus lanatus* extrayendo ADN de hojas y usando 20 iniciadores ISSR obteniendo 258 bandas, de las cuales 252 fueron polimórficas (97.67 %). Los iniciadores Sola 3, Sola 12 y B 1 amplificaron el mayor número de bandas (16), sin embargo, el iniciador Sola 6 fue el que mostró el mayor PIC (0.24 %).

Cuadro 6. Número de bandas totales, polimórficas, proporción de loci polimórficos, contenido de información polimórfica, error estándar, porcentaje de amplificación y probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar obtenidos con trece iniciadores ISSR's en cuatro poblaciones de *Ibervillea sonora*.

Iniciador	BT	BP	% P	PMF (95)	PIC	EE	AMP	PDICMA
ISSR2	52	52	100	0.83	0.15	0.01	9.53	2.40E-10
ISSR3	101	101	100	0.65	0.15	0.01	11.15	8.30E-09
ISSR7	63	63	100	0.63	0.15	0.01	10.13	3.30E-09
ISSR10	25	25	100	0.80	0.23	0.01	25.59	1.00E-10
LOL2	49	49	100	0.82	0.22	0.01	17.92	7.90E-12
LOL8	58	58	100	0.69	0.14	0.01	9.38	4.80E-09
MESL3	21	21	100	0.48	0.14	4.90E-03	30.18	2.90E-05
PI01	43	43	100	0.67	0.18	0.01	14.64	7.40E-10
UBC815	60	60	100	0.62	0.16	0.01	11.20	1.10E-09
UBC816	115	115	100	0.27	0.07	0.01	4.32	7.40E-06
UBC842	51	51	100	0.73	0.18	0.01	13.93	2.80E-10
UBC844	69	69	100	0.61	0.12	4.60E-03	7.31	2.20E-08
UBC866	65	65	100	0.49	0.11	0.01	6.92	1.00E-07
	772	772					10.91	2.80E-108

Por su parte Esmailnia *et al.* (2015) estudiaron cinco géneros de *Cucurbitaceas* (*Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria*, *Citrullus* y *Luffa*) con iniciadores ISSR obteniendo 283 bandas, 263 de ellas polimórficas (92.93 %), en donde ISSR9 mostró el mayor número de bandas polimórficas (36), mientras que el ISSR15 fue el iniciador que exhibió el mayor PIC (0.391), lo que fue reconocido como el más discriminante y por tanto el más apropiado para estudiar la variabilidad genética entre especies. Por su parte, De Payel y colaboradores (2015) a partir de la extracción de ADN de semillas, usando ISSR obtuvieron huellas genómicas de *Cucurbita maxima*, *Lagenaria vulgaris*, *Coccinia grandis*, *Cucumis sativus*, *Cucumis maderaspatanus*, *Cucumis melo*, *Momordica charantia* y *Luffa cylindrica*. De 117 bandas, 57 fueron polimórficas (48.7 %). Entre los cinco iniciadores usados, el I-11 generó el mayor número de

bandas totales (37) así como de bandas polimórficas (22), el mayor porcentaje de polimorfismo (59.54) y el mayor PIC (0.98). Dalamu y colaboradores (2012), trabajando en *Momordica charantia*, con 11 iniciadores ISSR, obtuvieron 58 bandas, siendo 41 polimórficas (70 %). El iniciador UBC848 produjo el mayor número de bandas polimórficas (8), pero el UBC854 presentó el mayor porcentaje de polimorfismo (83 %), mientras que el mayor PIC (0.58) lo obtuvo el iniciador UBC855.

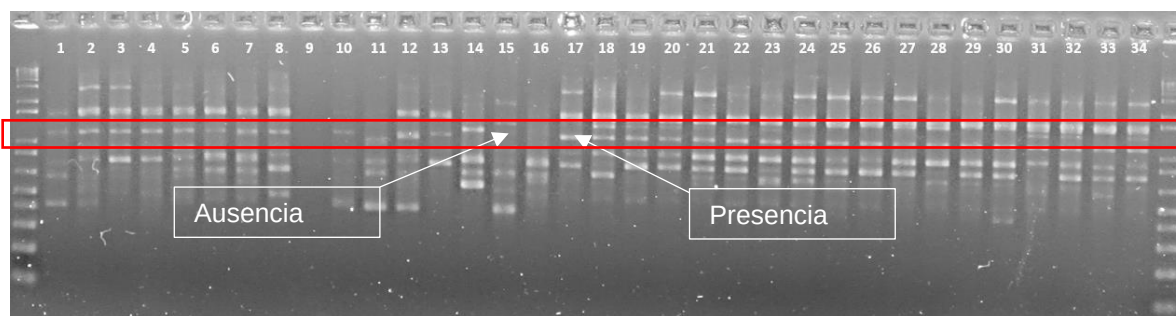


Figura 8. Ejemplo de los patrones de bandeo obtenidos con el iniciador LOL2 en dos poblaciones de *Ibervillea sonorae* del estado de Sonora. Carriles 1 al 17 población “La Colorada”. Carriles 18 al 34 población “Navojoa”.

3.6 CONCLUSIONES

Los marcadores ISSR fueron altamente polimórficos e informativos para estimar la variabilidad genética existente en poblaciones naturales de *Ibervillea sonorae* del estado de Sonora. Los iniciadores LOL2, ISSR10 y PI01 fueron los mejores para lograr la diferenciación de poblaciones debido a su alto PIC y mayor capacidad discriminatoria al presentar la menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar, por lo que serían los más recomendables a usar en futuros trabajos de caracterización molecular de esta especie. La variación molecular fue mayor dentro que entre poblaciones.

3.7 AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega, al Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández y a la M. en C. María Elisa Alvarado Cano por el apoyo en la extracción del ADN, así como el análisis e interpretación de los resultados.

Al Dr. Alberto Búrquez Montijo, a la Dra. Enriquena Bustamante Ortega y al C. José Tajia Moroyoqui por su apoyo en la colecta de muestras de las poblaciones en el estado de Sonora.

3.8 LITERATURA CITADA

Chambers, N.; Gray, Y.; Buchmann, S. 2004. Polinizadores del Desierto Sonorense, Una Guía de Campo. Arizona Sonora Desert Museum. 83 p. <http://www.denix.osd.mil/nr/priorities/pollinators/guidance/polinizadores-del-desierto-sonorense-2004-02-1703/>

Dalamu, T. K.; Behera, A. B.; Gaikwad, S. S.; Bharadwaj, C.; A. D. Munshi. 2012. Morphological and molecular analysis define the genetic diversity of Asian bitter gourd (*Momordica charantia* L.). Australian Journal of Crop Science 6 (2): 261 – 267.

De Payel.; Mala, P.; S. Sunita. 2015. Inter-genus variation analysis in few members of *Cucurbitaceae* based on ISSR markers. Biotechnology & Biotechnological Equipment 29 (5): 882 – 886.

Djé, Y.; Tah, G.C.; Zoro, B. I.; Malice, M.; Baudoin, J. P.; Bertin, P. 2006. Optimization of ISSR marker for African edible-seeded *Cucurbitaceae* species' genetic diversity analysis. African Journal of Biotechnology 5 (2):83 – 87

Esmailnia, E.; Arefrad, E.; Shabanl, S.; Karimi, M.; Vafadar, F.; A., Dehestani. 2015. Genetic diversity and phylogenetic relationship of Iranian indigenous cucurbits investigated by Inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Biharean Biologist 9 (1): 47 -54.

Hernández E., E.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Martínez-Cárdenas, M. de L. 2009. Avances en la propagación *in vitro* de *Ibervillea sonora* Greene para su conservación. Anuario de Investigación en Etnomedicina, Medicinas Complementarias y Utilización de Plantas Medicinales. Universidad Metropolitana-Iztapalapa, México. pp.53-60.

Montes H., S.; Eguiarte, L. E. 2002. Estructura genética y estimaciones indirectas del flujo de genes en tres taxones de cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*) en el occidente de México. American Journal of Botany 89(7): 1156–1163.

Murray, M.G.; Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8:4321-4325.

4 RESPUESTAS *in vitro* DE *Ibervillea sonora*

In vitro RESPONSES OF *Ibervillea sonora*

4.1 RESUMEN

Ibervillea sonora o wereke, es una *cucurbitacea* dioica y endémica de los estados de Baja California Sur, Sinaloa y Sonora. La raíz de esta planta se usa como una alternativa medicinal para el control de la *diabetes*, por lo que las poblaciones naturales han disminuido drásticamente. Una herramienta para el rescate y conservación de especies amenazadas o en vías de extinción es el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. En el presente trabajo se logró el establecimiento *in vitro* de semillas (90 %), segmentos de mesófilo de hojas (100 %), embriones cigóticos (100 %) y nudos axilares (100 %). Los porcentajes de germinación de las semillas de esta especie fueron bajos en condiciones de invernadero (1.9 %) y germinadora (1.2 %) y nulos *in vitro*, por lo que fue necesario realizar pruebas de viabilidad empleando como reactivo el tetrazolio, encontrándose una tinción positiva de embriones del 58.3 %. La mayor formación de callo a partir de mesófilo de hoja se logró usando medio MS (1962) al 100 % suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D más 1.5 mg L⁻¹ de K en condiciones de oscuridad (72.7 %). La formación de callos (100 %) y brotes (25 %) a partir de nudos axilares se obtuvo usando medio MS (1962) al 100 % suplementado con 1 mg L⁻¹ de ANA y 0.2 mg L⁻¹ de K (T8). Las comparaciones estadísticas entre tratamientos permitieron demostrar que los reguladores y las dosis empleadas resultaron exitosos para promover tanto la formación de brotes como la de callos. La adición de antioxidantes como L-cisteína (60 mg L⁻¹) combinada con PVP (70 mg L⁻¹) y nitrato de plata (20 mg L⁻¹) no impidió el necrosamiento de los tejidos cultivados *in vitro*.

Palabras clave: *Ibervillea sonora*, establecimiento, organogénesis indirecta y directa, callos, brotes.

4.2 ABSTRACT

Ibervillea sonora or wereke, is a *cucurbitacea* dioecious species endemic to the Mexican states of Baja California Sur, Sinaloa, and Sonora. Its root has been used as a medicinal alternative against diabetes; therefore, natural populations have decreased drastically. In vitro culture of plant cells and tissues represents a valuable tool for rescuing, multiplication and conservation of endangered species. Thus, in this study, *in vitro* establishment of seeds (90 %), segments of leaves mesophyll (100 %), zygotic embryos (100 %) and axillar knots (100 %) was achieved. Seed germination in this specie was very low under all conditions: greenhouse (1.9 %), seed germination chambers (1.2 %) and *in vitro* (0 %). Therefore, it was necessary to perform feasibility tests using tetrazolium as reagent, showing positive embryo staining of 58.3 %. The highest callus formation from segments of leaves mesophyll was attained using medium MS 100 % (1962) supplemented with 0.5 mg L⁻¹ of 2,4-D in combination with 1.5 mg L⁻¹ of K under dark conditions (72.7 %). The best treatment to achieve the formation of calluses (100 %) and shoots (25 %) from axillar knots was using medium MS 100 % supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of ANA plus 0.2 mg L⁻¹ of K (T8). Statistical comparisons among treatments demonstrated that these specific regulators and doses were effective promoting both, buds and calluses formation. The addition of antioxidants such as L-cysteine (60 mg L⁻¹) combined with PVP (70 mg L⁻¹) and silver nitrate (20 mg L⁻¹) did not prevent the necrosis of tissues cultured *in vitro*.

Keywords: *Ibervillea sonora*, establishment, indirect and direct organogenesis, calluses, shoot.

4.3 INTRODUCCIÓN

Ibervillea sonora o wereke es una *cucurbitacea* dioica endémica del noroeste mexicano. Es una enredadera con tallos delgados, zarcillos, hojas trilobuladas, flores amarillas, frutos tipo baya verdes inmaduros y rojos/anaranjados al madurar y semillas negras a pardas. Su raíz, la cual llega a tener un diámetro de más de 20 centímetros, tiene propiedades hipoglucemiantes, cierra canales K-ATP que regulan la liberación de insulina, por lo que personas diabéticas la consumen en infusiones, pastillas o concentrados, de manera que su extensiva colecta ha ocasionado una reducción en el número de individuos en las poblaciones naturales. Se ha determinado que el consumo del extracto de raíz de esta planta puede causar daños hepáticos (Banderas-Dorantes *et al.*, 2012). El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que permite el estudio de respuestas morfogénicas como un inicio para lograr la producción a gran escala de un gran número de individuos a través de la micropropagación de especies vegetales con diversos intereses, como las especies medicinales, bajo condiciones de asepsia. Las respuestas morfogénicas obtenidas a partir de explantes de hojas, nudos y embriones pueden contribuir a la futura preservación en bancos de germoplasma de estas especies, en medios de cultivo, para su posterior estudio. Si bien existen trabajos previos sobre respuestas morfogénicas en *Ibervillea sonora* como el realizado por Hernández y colaboradores (2009) quienes lograron la formación de brotes usando 0.04 mM (7.5 mg L⁻¹) de ácido naftalenico (ANA) más 0.004 mM (1 mg L⁻¹) de 6-bencil-aminopurina (BAP) (33 %); con 0.005 mM (1 mg L⁻¹) de ANA más 0.005 mM (1 mg L⁻¹) de Kinetina (K) (40 %) y con 0.005 mM de ANA más 0.2 mM (4.5 mg L⁻¹) de K (20 %). A pesar de que también fueron capaces de obtener callos, no pudieron controlar la oxidación por lo que los brotes obtenidos se perdieron. De manera que para conservar este recurso fitogenético es necesario el estudio de respuestas morfogénicas a través del cultivo *in vitro* para establecer a futuro un protocolo eficiente de micropropagación que permita instituir programas para su regeneración, uso, estudio y conservación, por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer y evaluar respuestas *in vitro* de *I. sonora* usando como

explantes semillas, embriones cigóticos, mesófilo de hojas y nudos axilares que contribuyan en el manejo y preservación de esta valiosa especie.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Colecta de material vegetal

Para la obtención de material vegetal de *Ibervillea sonora* se realizaron colectas de plantas y frutos en tres distintas localidades del estado de Sonora (Cuadro 7), los cuales fueron refrigerados y trasladados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales de la Universidad Autónoma Chapingo en Texcoco, Estado de México.

Cuadro 7. Localización y condiciones climáticas de tres sitios de colecta de *Ibervillea sonora* en el estado de Sonora.

Localidad	Coordenadas Geográficas	Altitud (msnm)	Temperatura promedio anual (°C)	Precipitación (mm)
Guaymas	LN 27° 58' 51.2" LE 111° 07' 33.2"	8	19.53	22.2
Teachive	LN 26° 47' 38.5" LE 109° 14' 00.6"	98	20.93	370.4
Masiaca	LN 26° 46' 42.7" LE 109° 12' 48.9"	66	20.15	486.4

4.4.2 Pruebas de germinación de semillas

4.4.2.1 En laboratorio

Debido a que los más de 100 frutos colectados se encontraban aún inmaduros, se colocaron en refrigeración a 5 ± 2 °C durante dos meses y después se pusieron bajo condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante tres meses hasta que se secaron. Posteriormente se procedió a extraer las semillas, las cuales se lavaron con jabón en polvo, se enjuagaron con agua corriente y se secaron a la intemperie, después se guardaron en sobres de papel a temperatura ambiente para realizar pruebas de germinación o para ser establecidas bajo condiciones *in vitro*.

Con objeto de explorar la posibilidad de reproducir esta especie mediante semilla, se llevaron a cabo pruebas de viabilidad con tetrazolio. Para ello se colocaron tres lotes de 24 semillas ($n=72$) en agua destilada estéril durante 48 horas para hidratarlas, activar su metabolismo y provocar el rompimiento de la testa. Después a cada semilla se le cortó un cotiledón para dejar expuesto el embrión y se sumergieron en una solución de sales de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) a tres concentraciones (v/v): 0.2, 0.1 y 1 %. Se mantuvieron en oscuridad a 37 ± 2 °C. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, en el cual cada semilla fue considerada una unidad experimental. Una vez que transcurrieron 3 horas se registró el número de semillas teñidas y se calcularon las proporciones de semillas viables (teñidas) y no viables (sin tinción).

En un segundo experimento se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas de *Ibervillea sonora* en germinadoras. Para ello se lavaron 4 lotes de 157 semillas ($n=628$) con jabón en polvo, tween (1 gota por 100 mL), NaOCl (20 % v/v), etanol (70 % v/v) y agua oxigenada (50 % v/v) por 5 minutos cada uno bajo agitación constante. Al final se enjuagaron con fungicida Captan® (100 mg L^{-1}), para después colocar 20 semillas por caja Petri, en papel filtro estéril humedecido con fungicida. Dos lotes de semillas fueron colocados en una germinadora Seedburo Modelo D-7140 a 25 °C y los otros dos lotes fueron mantenidos en otra germinadora a 30 °C. Cuando se observaron problemas de contaminación con hongos se lavaron las cajas Petri con jabón y las semillas se enjuagaron en fungicida y posteriormente en agua corriente eran colocadas nuevamente sobre papel filtro humedecido con fungicida. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, donde cada semilla se consideró como una unidad experimental. Se realizó el conteo del total de semillas germinadas en ambas cámaras y con los resultados obtenidos se realizó una prueba de comparación de proporciones binomiales para determinar si existieron diferencias estadísticas entre las dos temperaturas de germinación utilizadas.

Finalmente se realizó un tercer experimento para evaluar la germinación de semillas de *Ibervillea sonora* ($n=152$) bajo condiciones *in vitro*. Para ello en primer lugar se

procedió a desinfestar las semillas usando distintos tratamientos, los cuales se detallan en el Cuadro 8. Éstos se llevaron a cabo bajo campana de flujo laminar y en agitación constante. El diseño experimental usado fue completamente al azar y cada semilla constituyó una unidad experimental. Se realizó el conteo del total de semillas establecidas asépticamente y se hizo una prueba de comparación de proporciones binomiales para determinar el mejor tratamiento para lograr la asepsia.

Cuadro 8. Tratamientos de desinfestación de semillas de *I. sonoreae* para establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Fungimycin (1 mg L ⁻¹)	Tween (1 gota 100 mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %
T1	0†	5	10	20	0
T2	24	9	9	9	9
T3	48	10	10	10	10
T4	72	10	10	10	10

† Se muestra el tiempo en minutos, excepto el fungicida que fue en horas.

4.4.2.2 En invernadero

Para evaluar la germinación de semillas bajo condiciones de invernadero se realizaron cuatro siembras de 80 semillas (n=320) en camas de germinación con sustrato vermiculita: peat moss (50:50) saturado con agua. Las dos primeras siembras se manejaron sin cubierta, mientras que las dos últimas fueron cubiertas con plástico. El diseño experimental fue completamente al azar y cada semilla fue una unidad experimental. El sustrato se mantuvo saturado con agua. Se registró el número total de semillas germinadas para cada tratamiento y los resultados obtenidos fueron comparados mediante proporciones binomiales para determinar si el aumento de temperatura en el sustrato por efecto del plástico incrementó significativamente el porcentaje de germinación.

4.4.3 Procesos de desinfestación de explantes

Las plantas colectadas se trasplantaron a macetas que contenían vermiculita: peat moss (50:50) como sustrato, las cuales se manejaron bajo riego en invernadero para promover la formación de nuevos tallos, hojas y raicillas. Una vez formados los

tallos, se cortaron segmentos nodales con bisturíes limpios y se colocaron en una solución con NaOCl al 20 % (v/v), ácido ascórbico (150 mg L⁻¹) y ácido cítrico (100 mg L⁻¹). En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales se lavaron y sembraron *in vitro*. En el caso de las muestras tomadas de hojas se usó una solución de NaOCl al 10 % (v/v). Para utilizar embriones como fuentes de explantes, se colocaron semillas en agua estéril durante 48 horas para hidratarlas. Posteriormente se les retiró la testa y bajo un microscopio estereoscópico se localizaron los embriones y se procedió a extraerlos de la semilla.

4.4.3.1 Desinfestación de nudos axilares

Para lograr la desinfestación de los nudos axilares colectados en el invernadero (n=116), éstos se lavaron bajo una campana de flujo laminar y se mantuvieron bajo agitación constante. Se llevaron a cabo seis tratamientos distintos, los cuales se detallan en el Cuadro 9. El diseño experimental usado fue completamente al azar, en donde cada nudo axilar fue una unidad experimental. Se realizó el conteo del total de nudos axilares establecidos asépticamente para cada tratamiento y se realizaron comparaciones de proporciones binomiales para identificar el mejor tratamiento de limpieza para esta fuente de explantes.

Cuadro 9. Tratamientos de desinfestación en minutos de nudos axilares de *I. sonorae* para establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Fungimycin (1 mg L ⁻¹)	Tween (1 gota100mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %
T1	24†	15	15	15	15
T2	48	10	10	10	10
T3	0	5	5	5	5
T4	0	5	7	7	5
T5	0	5	8	7	5
T6	0	5	7	6	5

† Se muestra el tiempo en minutos, excepto el fungicida que fue en horas.

4.4.3.2 Desinfestación de segmentos de mesófilo de hojas

Para la desinfestación de segmentos de mesófilo de hojas (n=868) se realizaron varios tratamientos bajo campana de flujo laminar y en agitación constante, los cuales se detallan en el Cuadro 10. El diseño experimental fue completamente al azar y cada fragmento de mesófilo de hoja se consideró una unidad experimental. Se realizó el conteo del número de fragmentos de mesófilo de hoja establecidos asépticamente y se hizo una prueba de comparación de proporciones binomiales para determinar el mejor método de desinfestación para el establecimiento de mesófilo de hojas *in vitro*.

Cuadro 10. Tratamientos de desinfestación en minutos de fragmentos de mesófilo de hojas de *I. sonoreae* para establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Tween (1 gota100mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %
T1	10	10	10	10
T2	5	10	1	3
T3	5	12	2	3
T4	5	11	2	2
T5	5	10	3	3

4.4.3.3 Desinfestación de embriones cigóticos

Un total de 449 embriones cigóticos se extrajeron de las semillas mediante el uso de pinzas y bisturíes con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Luego se aplicaron cuatro tratamientos de desinfestación (

Cuadro 11) bajo campana de flujo laminar y con agitación constante. El diseño experimental fue completamente al azar y cada embrión se consideró como una unidad experimental. Se realizó el conteo del total de embriones cigóticos establecidos asépticamente y se hizo una prueba de comparación de proporciones binomiales para establecer el mejor tratamiento de limpieza.

Cuadro 11. Tratamientos de desinfestación en minutos de embriones cigóticos de *I. sonorae* para establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Tween (1 gota100mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %
T1	5	10	1	0
T2	5	10	1	3
T3	5	15	3	5
T4	3	10	4	5
T5	5	10	5	5

4.4.4 Evaluación de la germinación de semillas *in vitro*

Para poner a germinar las semillas de *I. sonorae* bajo condiciones *in vitro* se prepararon tubos de ensaye con 20 mL de medio de cultivo con las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100 % suplementando con sacarosa (3 % p/v), polivinilpirrolidona (PVP, 70 mg L⁻¹) más agar-agar (0.7 % p/v), con pH ajustado a 5.7 ± 0.1 ; adicionalmente, se suplementaron con reguladores de crecimiento bajo los tratamientos presentados en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para la germinación de semillas *in vitro* de *Ibervillea sonorae*.

Tratamiento	GA3 (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)
T1	0.1	3.0
T2	1.0	1.0
T3	3.0	0.1

Se prepararon 24 tubos de ensaye por tratamiento (72 tubos en total) y dentro de cada tubo se colocaron 3 semillas (n=216 semillas). Para cada tratamiento con RCV se probaron tres posiciones, en 8 tubos las semillas se colocaron sobre el medio de cultivo, en otros 8 tubos se sumergieron hasta la mitad del medio y finalmente en el grupo de 8 tubos restantes las semillas se depositaron en la base de los tubos.

Para evaluar el efecto de la luz en el proceso de germinación, la mitad de los tubos de ensaye fueron incubados a 25 ± 2 °C bajo condiciones de luz (fotoperiodo de 16/8 horas con una intensidad lumínica de 1800 lux) y la otra mitad se mantuvo bajo

condiciones de oscuridad por 3 meses. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Se realizaron conteos del total de semillas germinadas por tratamiento y los resultados obtenidos fueron analizados mediante pruebas de χ^2 y comparaciones de proporciones binomiales para identificar los mejores tratamientos.

4.4.5 Evaluación de respuestas morfogénicas *in vitro* de nudos axilares

Con objeto de evaluar las respuestas morfogénicas de nudos axilares de *I. sonorae* se preparó medio MS (1962) al 100 % suplementado con sacarosa (3 % p/v), tiamina (0.4 mg L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), ácido fólico (0.5 mg L^{-1}), ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), riboflavina (0.5 mg L^{-1}), caseína hidrolizada (CH, 500 mg L^{-1}) y agar-agar (7 % p/v), ajustado a un pH de 5.7 ± 0.1 al cual se le añadieron reguladores de acuerdo con los tratamientos presentados en el Cuadro 13, en tubos de ensayo de 20 mL. En todos los tratamientos se usaron como antioxidantes PVP (70 mg L^{-1}) y L-cisteína (60 mg L^{-1}). El diseño experimental usado fue completamente al azar en donde la unidad experimental fue un nudo axilar por tubo de ensayo ($n=109$). Se contó el total de brotes y callos obtenidos a partir de los nudos axilares sembrados y expuestos en luz por cada tratamiento, después se realizó una comparación de proporciones binomiales y se determinó por diferencias estadísticas el tratamiento que dio mayores respuestas morfogénicas. Este tratamiento se repitió para ser comparado contra su inverso (auxina>citocinina vs citocinina>auxina), ambos bajo condiciones de luz y oscuridad, con objeto de determinar la influencia de estos factores en la organogénesis. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante pruebas de χ^2 y comparaciones de proporciones binomiales.

Adicionalmente, se registraron las variables color y tamaño de brotes, así como color, tamaño y textura de callos para cada tratamiento. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante una prueba de Kruskal-Wallis.

Cuadro 13. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para inducir organogénesis a partir de nudos axilares de *Ibervillea sonora*.

Tratamientos	ANA (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Luz
T1	0.5	1.0	0.00	Presencia/Ausencia
T2	0.5	6.0	0.00	Presencia/Ausencia
T3	7.5	1.0	0.00	Presencia/Ausencia
T4	7.5	6.0	0.00	Presencia/Ausencia
T5	1.0	0.0	4.50	Presencia
T6	1.0	0.0	1.00	Presencia
T7	1.0	0.0	0.45	Presencia
T8	1.0	0.0	0.20	Presencia/Ausencia
T9	0.2	0.0	1.00	Presencia/Ausencia

4.4.6 Evaluación de la formación de callo a partir de mesófilo de hoja

Se preparó medio MS (1962) al 100 %, suplementado con sacarosa (3 % p/v), PVP (70 mg L⁻¹), 2,4-D (0.5 mg L⁻¹), K (1.5 mg L⁻¹) y agar-agar (0.7 % p/v), con pH ajustado a 5.7 ± 0.1 y se colocaron 15 mL en cajas Petri de plástico estériles. Se realizaron 5 siembras donde se tomaron segmentos de mesófilo de hojas en fragmentos de aproximadamente 1 cm² y se colocaron hasta 15 por caja Petri. La mitad de las cajas Petri se colocó en luz (fotoperiodo de 16/8 horas con una intensidad lumínica de 1800 lux) y la otra en oscuridad; todas ellas fueron mantenidas a una temperatura de 25 ± 2 °C. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar donde la unidad experimental fue un fragmento de mesófilo de hoja por caja. Se contaron todos los callos obtenidos en ambas condiciones y se hizo una prueba de comparación de proporciones binomiales para determinar si el factor luz influyó en la formación de callos.

4.4.7 Evaluación de respuestas morfogénicas en embriones cigóticos

Con objeto de evaluar las respuestas morfogénicas de embriones cigóticos *in vitro* de *I. sonora* se preparó medio MS (1962) al 100 % suplementado con sacarosa (3 % p/v), PVP (70 mg L⁻¹), con un pH ajustado a 5.7 ± 0.1 bajo los tratamientos de reguladores incluidos en el Cuadro 14, depositando 15 mL en cajas Petri. Se sembraron 5 embriones por caja y cada tratamiento se incubó a 25 ± 2 °C, tanto en

luz (fotoperiodo de 16/8 horas con una intensidad de lumínica de 1800 lux) como en oscuridad. El diseño experimental usado fue completamente al azar. La unidad experimental fue un embrión por caja. Se registró la formación de brotes y callos y los resultados obtenidos se compararon mediante proporciones binomiales.

Cuadro 14. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para inducir organogénesis a partir de embriones cigóticos de *Ibervillea sonora*.

Tratamiento	ANA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	Picloram (mg L ⁻¹)
T1	4.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
T2	0.0	1.5	0.5	0.0	0.0	0.0
T3	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0
T4	0.0	0.5	1.5	0.0	0.0	0.0
T5	0.0	15.0	5.0	0.0	0.0	0.0
T6	0.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0
T7	0.0	3.0	6.0	0.0	0.0	0.0
T8	0.0	3.0	9.0	0.0	0.0	0.0
T9	0.0	3.0	12.0	0.0	0.0	0.0
T10	0.0	0.0	0.0	0.5	2.0	0.0
T11	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0
T12	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0
T13	0.0	0.0	0.0	4.0	2.0	0.0
T14	0.0	0.0	0.0	6.0	2.0	0.0
T15	0.0	0.0	0.0	8.0	2.0	0.0
T16	0.0	0.0	0.0	10.0	2.0	0.0
T17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
T18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
T19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
T20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0

4.4.8 Evaluación de la diferenciación de callos en brotes y raíces

Los callos obtenidos a partir de nudos axilares (n=96) y mesófilo de hojas (n=192) se sembraron cada uno en un tubo de ensayo, con 20 mL de medio MS (1962) al 100 % suplementado con sacarosa (3 % p/v), tiamina (0.4 mg L⁻¹), mioinositol (100 mg L⁻¹), ácido fólico (0.5 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), riboflavina (0.5 mg L⁻¹), caseína hidrolizada (CH, 500 mg L⁻¹), hemisulfato de adenina (80 mg L⁻¹) y agar-agar (7 % p/v), con pH ajustado a 5.7 ± 0.1, al cual se le añadieron los reguladores bajo los tratamientos que se muestran en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Tratamientos aplicados al medio de cultivo para inducir organogénesis a partir de callos en *Ibervillea sonora*.

Tratamiento	ANA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)
T1	1.0	0.00
T2	1.0	0.20
T3	1.0	0.45
T4	1.0	0.50
T5	1.0	1.50
T6	1.0	2.00
T7	1.0	2.50
T8	1.0	3.00
T9	1.0	3.50
T10	1.0	4.00
T11	1.0	4.50
T12	1.0	5.00

Por cada tratamiento se prepararon 24 tubos, de los cuales 8 fueron para los callos de nudos axilares y 16 para los callos obtenidos de mesófilo de hojas. 12 tubos por cada tratamiento se incubaron a 25 ± 2 °C, tanto en luz (fotoperiodo de 16/8 horas con una intensidad lumínica de 1800 lux) como en oscuridad, por más de 60 días. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizó el conteo total de callos diferenciados en brotes o raíces por cada tratamiento y los resultados

obtenidos fueron comparados mediante proporciones binomiales. Para determinar si la luz y la oscuridad juegan un papel importante en la formación de brotes y raíces, respectivamente, se realizó una prueba χ^2 y de comparación de proporciones binomiales.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 Pruebas de germinación de semillas

4.5.1.1 Evaluación de viabilidad con prueba de tetrazolio

Los porcentajes de viabilidad encontrados en semillas de *I. sonorae* con base en la prueba de tinción con sales de tetrazolio se muestran en el Cuadro 16. En él se observa que usando una concentración del 0.1 % ninguna de las semillas tratadas se tiñó. Al incrementar la concentración de sales al 0.2 % sólo el cotiledón de una semilla presentó manchas rojas (4.2 %) (Figura 9 A), mientras que la solución al 1.0 % produjo la tinción de embriones en 14 semillas (58 %) (Figura 9 B). Los cotiledones son zonas de alta actividad metabólica después de iniciada la imbibición de las semillas, por lo que hay una mayor concentración de deshidrogenasas que se puede observar por la presencia de extensas zonas teñidas.

Cuadro 16. Porcentaje de viabilidad de semillas de *I. sonorae* por tinción con tetrazolio.

Tratamiento	[Tetrazolio] %	Viabilidad (%)
1	0.1	0.0
2	0.2	4.2
3	1.0	58.3

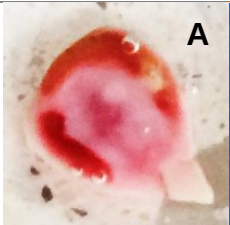



Figura 9. Tinción de semillas de *I. sonorae* con sales de tetrazolio. A) Tinción de cotiledones al 0.2 %, b) Tinción del embrión al 1 %.

Las semillas de diferentes especies vegetales muestran patrones topológicos distintos de tinción debido a la sensibilidad diferencial de los tejidos, por lo que en algunos casos la parte más sensible es el eje embrional (meristemo apical caulinar, hipocótilo y meristemo subapical-radical), mientras que en otras lo es la totalidad del embrión, como fue el caso de *Ibervillea sonora*. (Victoria *et al.*, 2006). El porcentaje de viabilidad obtenido del 58.3 % se encuentra dentro del rango reportado por otros autores para especies endémicas del desierto (Lai *et al.*, 2016).

4.5.1.2 Pruebas de germinación en germinadora

A pesar de que las pruebas de viabilidad de semillas mostraron una viabilidad bastante aceptable (58.3 %) para una especie desértica no domesticada como es *Ibervillea sonora*, las pruebas de germinación realizadas en cámaras germinadoras produjeron bajos resultados. En la germinadora mantenida a 25 °C sólo germinó 1 de las 314 semillas evaluadas (0.6 %), mientras que al incrementar la temperatura a 30 °C sólo germinaron 4 semillas (1.2 %) (Cuadro 17). Si bien la humedad, temperatura y luz juegan un papel importante en la germinación (Chakraborty y Sadhu, 1994) los porcentajes de germinación observados fueron bajos y sin diferencias significativas entre temperaturas.

Cuadro 17. Porcentaje de germinación de semillas de *I. sonora* en cámaras germinadoras.

Tratamiento	Temperatura	Germinación %
1	25 °C	0.6 a
2	30 °C	1.2 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$).

Existen muchos factores que disminuyen la capacidad de germinación de las semillas. Los bajos porcentajes de germinación obtenidos en el presente estudio pudieron deberse a que los frutos se cosecharon inmaduros, por lo que ello pudo haber influido a su vez en la madurez de la semilla, su condición fisiológica *in vivo*; adicionalmente, pudo deberse a que las condiciones de resguardo de los frutos

cosechados y de las semillas extraídas no fueron las más adecuadas para propiciar la germinación (Rao *et al.*, 2007).

4.5.1.3 Pruebas de germinación *in vitro*

Cuando las semillas de *Ibervillea sonora* se pusieron a germinar bajo condiciones *in vitro*, tampoco se obtuvieron resultados favorables a pesar de que las semillas se manejaron bajo las condiciones óptimas de laboratorio, ya que ninguna semilla germinó en un lapso de más de tres meses. La nula germinación pudo deberse a que las semillas de esta especie presenten dormancia seminal debido a la cubierta lignificada de la testa que no permita un intercambio líquido y gaseoso adecuado para lograr la germinación (Hernández *et al.*, 2013). O más probablemente a que el manejo de los frutos y semillas postcosecha haya afectado la viabilidad de las semillas (Rao *et al.*, 2007).

4.5.1.4 Pruebas de germinación en condiciones de invernadero

La germinación de semillas de esta especie no fue mejor cuando se realizaron ensayos bajo condiciones de invernadero. Las camas de siembra que no fueron cubiertas con plástico presentaron una germinación nula, mientras que cuando se cubrieron sólo se obtuvo la germinación de 3 semillas (1.87 %) (Cuadro 18). El uso de plásticos aumenta la temperatura y humedad del sustrato favoreciendo con ello la germinación (Chakraborty y Sadhu, 1994), sin embargo, en este estudio el uso de cubierta plástico no representó una ventaja significativa para mejorar la germinación.

Cuadro 18. Porcentaje de germinación de semillas de *I. sonora* en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cubierta	Germinación %
1	Sin	0.000 a
2	Con	1.875 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$).

De nuevo, los bajo porcentajes de germinación obtenidos pudieron deberse al mal manejo en la post-cosecha de los frutos, lo cual probablemente afectó el desarrollo

y viabilidad de las semillas (Rao *et al.*, 2007). Por lo que sería conveniente realizar estudios enfocados en el manejo post-cosecha de los frutos, así como las condiciones de almacenaje que favorezcan la germinación de semillas en esta especie. La Figura 10 muestra el desarrollo fenológico de las pocas semillas que lograron germinar, en la cual puede apreciarse que al crecer el tallo emergieron las hojas cotiledonales mostrando el meristemo apical, del cual se formó la primera hoja verdadera. La plántula completa mostró una raíz gruesa.



Figura 10. Desarrollo de plántulas de *I. sonorae*.

4.5.2 Protocolos de desinfestación de explantes

4.5.2.1 Desinfestación de nudos axilares

El porcentaje de asepsia conseguido mediante la aplicación de seis tratamientos de desinfestación de nudos axilares como fuente de explante se presenta en el Cuadro 19. En él se puede apreciar que los mejores tratamientos fueron T5 y T6, ambos estadísticamente iguales entre sí, por lo que pueden utilizarse cualquiera de ellos para desinfestar efectivamente los nudos axilares de esta especie.

Cuadro 19. Porcentaje de asepsia en nudos axilares de *I. sonorae*

Tratamiento	Fungimycin (1 mg L ⁻¹)	Tween (1 gota100mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %	Asepsia%
T1	24	15	15	15	15	60.0 d
T2	48	10	10	10	10	70.0 cd
T3	0	5	5	5	5	83.3 bcd
T4	0	5	7	7	5	86.2 bc
T5	0	5	8	7	5	92.6 ab
T6	0	5	7	6	5	100.0 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$). Se muestra el tiempo en minutos, excepto el fungicida que fue en horas.

Estos resultados coinciden con los encontrados previamente por Abdelnour y colaboradores (2002), los cuales desinfestaron explantes nodulares de chayote (*Sechium edule*) solo con NaOCl al 2.6 % (v/v) obteniendo solo el 22 % de asepsia. Hernández y colaboradores (2009) quienes establecieron segmentos nodulares axilares de *I. sonorae* sumergiendo los explantes en jabón líquido en agitación por 5 minutos seguido de un enjuague con agua destilada esterilizada, después sumergieron en una solución de etanol al 70 % (v/v) en agitación por 5 minutos finalizando con un enjuague con agua destilada estéril.

4.5.2.2 Desinfestación de hojas

Cuando los fragmentos de mesófilo de hoja de *I. sonorae* fueron desinfestados con el tratamiento 1 no se presentó algún tipo de contaminación inicialmente; sin embargo, al transcurrir el tiempo los explantes se necrosaron, por lo que se decidió implementar otros tratamientos (Cuadro 20). Los mejores tratamientos para lograr asepsia en fragmentos de mesófilo de hojas fueron T4 y T5, los cuales sólo difieren entre sí en 1 minuto de exposición.

Cuadro 20. Porcentaje de asepsia en fragmentos de mesófilo de hoja de *I. sonorae*.

Tratamiento	Tween (1 gota100mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %	Asepsia%
T1	10	10	10	10	100.0 a
T2	5	10	1	3	69.2 c
T3	5	12	2	3	83.3 b
T4	5	11	2	2	100.0 a
T5	5	10	3	3	100.0 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$). Se muestra el tiempo en minutos.

Para lograr la desinfestación y establecimiento de explantes foliares *in vitro* de *I. sonorae* fue necesario el uso del detergente tween pues ayudó a disminuir la tensión superficial de las hojas mejorando el contacto entre el tejido y las soluciones desinfectantes de NaOCl, etanol y agua oxigenada. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Thiruvengadam y colaboradores (2013) los cuales sembraron explantes de hojas de *Momordica dioica* usaron etanol al 70 % (v/v), después NaOCl

al 10 % (v/v) por 10 min con agitaciones ocasionales para finalizar con un lavado con agua destilada esterilizada.

4.5.2.3 Desinfestación de embriones cigóticos

Para obtener embriones cigóticos como fuente de explantes fue necesario realizar previamente un protocolo de desinfestación de las semillas de *I. sonorae* para lo cual se procedió a aplicar los tratamientos señalados en el Cuadro 21. En él se observa que los tratamientos 3 y 4 produjeron las mejores condiciones de asepsia.

Cuadro 21. Porcentaje de asepsia en semillas de *I. sonorae*.

Tratamiento	Fungimycin (1 mg L ⁻¹)	Tween (1 gota 100 mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %	Asepsia%
T1	0	5	10	20	0	0.0 c
T2	24	9	9	9	9	15.0 b
T3	48	10	10	10	10	87.5 a
T4	72	10	10	10	10	90.0 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$). Se muestra el tiempo en minutos, excepto el fungicida que fue en horas.

Es común que para lograr la desinfestación y establecimiento de semillas *in vitro* en *cucurbitáceas* se usen fungicidas, etanol y NaOCl. Sánchez y colaboradores (2009) lavaron semillas de *Cucurbita pepo* con agua destilada esterilizada con detergente durante 10 minutos, luego las sumergieron en una solución de 1 gL⁻¹ de los fungicidas Enlate®, Captan® y Tecto 60® por 25 minutos. Posteriormente bajo campana de flujo laminar colocaron las semillas en una solución de NaOCl al 25 % (v/v) adicionado con 20 gotas de Mycrodin® y dos gotas de Tween 20® durante 20 minutos, luego las enjuagaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) durante 20 minutos finalizando con tres enjuagues con agua destilada estéril.

Por su parte Liu y colaboradores (2013) lavaron semillas desnudas de *Benincasa hispida* sin testa con NaOCl al 5 % (v/v) durante 15 minutos, seguido de cinco enjuagues con agua destilada estéril. Muhammad y colaboradores (2011) desinfestaron semillas de *Cucumis sativus* con etanol al 70 % (v/v) durante tres minutos, seguido de un enjuague minucioso con agua destilada esterilizada por tres

veces, para después mantenerlas en solución de NaOCl al 5 % (v/v) durante cinco minutos y finalmente realizar tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

Una vez conseguida la asepsia con la desinfestación de semillas, se procedió a extraer los embriones cigóticos con la ayuda de pinzas y bisturíes bajo un microscopio estereoscópico. Luego se procedió a aplicar los cinco tratamientos de desinfestación que se detallan en el Cuadro 22. El mejor tratamiento fue el T5 ya que logró el más alto índice de asepsia y fue estadísticamente distinto a los demás. Al aumentar los tiempos de lavado en tween, etanol y agua oxigenada se logró la asepsia total de los explantes.

Cuadro 22. Porcentaje de asepsia en embriones cigóticos de *I. sonorae*.

Tratamiento	Tween (1 gota 100 mL ⁻¹)	NaOCl 20 %	Etanol 70 %	Agua Oxigenada 50 %	Asepsia%
T1	5	10	1	0	0.00 e
T2	5	10	1	3	10.00 d
T3	5	15	3	5	71.70 c
T4	3	10	4	5	0.87 b
T5	5	10	5	5	100.00 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$). Se muestra el tiempo en minutos.

Si bien no existen trabajos previos en desinfestación de embriones cigóticos en esta especie, los resultados obtenidos pueden compararse con los reportados por Zagatto y colaboradores (2005) quienes esterilizaron semillas de *Citrullus lanatus* durante 30 minutos en una solución de NaOCl al 2.5 % (v/v) seguido de tres enjuagues con agua destilada. Después de 12 horas extrajeron los embriones para lavarlos en una solución de NaOCl al 20 % (v/v), seguido de tres enjuagues en agua destilada esterilizada. Para obtener embriones asépticos de *Carica papaya*, Roca y Mrogisnki (1991) recomiendan lavar las semillas durante 5 minutos en alcohol al 70 % (v/v), después dejarlas en una solución de NaOCl al 20 % (v/v) de 10 a 15 minutos seguido de tres enjuagues con agua destilada esterilizada para luego remover los embriones dentro de la campana de flujo laminar.

4.5.3 Evaluación de respuestas morfogénicas

4.5.3.1 Respuesta morfogénica en nudos axilares

En relación a la respuesta morfogénica en nudos axilares de *Ibervillea sonora* cuando se aplicaron los tratamientos del 1 al 4 no hubo respuesta morfogénica en un lapso de 3 meses (Cuadro 23). El mejor tratamiento para la formación de brotes y callos fue T8, 100 y 25 %, respectivamente. Estos resultados coinciden con lo encontrado previamente por Hernández y colaboradores (2009), quienes obtuvieron un 33 % de brotes a partir de segmentos nodulares axilares de *I. sonora* al aplicar este mismo tratamiento.

Cuadro 23. Formación de brotes y callos a partir de nudos axilares de *I. sonora* bajo condiciones de luz.

Tratamiento	ANA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Brotes %	Callos %
T1	0.5	1.00	0.0 c	0.0 c
T2	0.5	6.00	0.0 c	0.0 c
T3	7.5	1.00	0.0 c	0.0 c
T4	7.5	6.00	0.0 c	0.0 c
T5	1.0	4.50	0.0 c	25.0 b
T6	1.0	1.00	18.10 b	45.4 b
T7	1.0	0.45	0.0 c	75.0 ab
T8	1.0	0.20	25.0 a	100.0 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$).

En la Figura 11 A) se muestra un brote obtenido al aplicar el tratamiento 7, el cual fue de color verde y de una longitud menor a un centímetro; en la Figura 11 B) se presenta un callo verde de consistencia gelatinosa y de una longitud menor a un centímetro obtenido también con el T7 y finalmente en la Figura 11 C) se aprecia un callo de color amarillo de una longitud mayor a un centímetro obtenido mediante el uso del tratamiento 8.

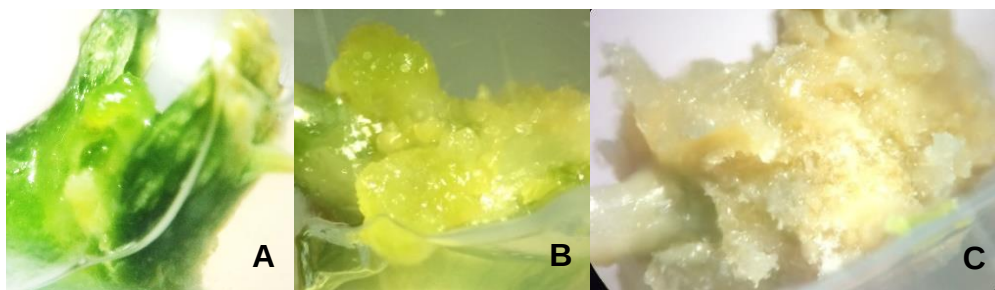


Figura 11. Brote y callos obtenidos a partir de nudos axilares de *I. sonorae* bajo condiciones de luz A) T7 (1 mg L⁻¹ de ANA más 0.45 mg L⁻¹ de K), B) T7, C) T8 (1 mg L⁻¹ de ANA más 0.2 mg L⁻¹ de K) a las dos semanas de siembra en medios MS al 100 % más suplementos.

El efecto de la luz en la promoción de la formación de brotes a partir de nudos axilares puede apreciarse en el Cuadro 24. La comparación de contrastes binomiales mostró que no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos 8 y 9 dentro de cada régimen de luz/obscuridad. Sin embargo, la prueba de χ^2 permite concluir que la presencia de luz es esencial para promover la formación de brotes.

Cuadro 24. Porcentaje de formación de brotes a partir de nudos axilares de *I. sonorae* bajo condiciones de luz y oscuridad.

Tratamiento	ANA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Luz	Oscuridad	Total
T8	1.0	0.2	53.3 a	6.7 b	30.0 A
T9	0.2	1.0	38.5 a	7.7 b	23.0 A
Total			48.8 A	6.9 B	

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$) y prueba de χ^2 ($p \leq 0.05$).

En la Figura 12 se muestran brotes formados a partir de segmentos nodulares axilares de *I. sonorae* bajo diferentes condiciones de luz. La Figura 12 A) y Figura 12 B) exponen los efectos del tratamiento 8 bajo luz y oscuridad, respectivamente. En ellas puede apreciarse que los brotes obtenidos bajo condiciones de luz fueron de color verde y longitud mayor a un centímetro, mientras que bajo condiciones de oscuridad el color del brote fue amarillo y su longitud fue inferior a 0.5 centímetros. Los brotes obtenidos con el T9 tanto bajo condiciones de luz (Figura 12 C) como bajo oscuridad (Figura 12 D) fueron inferiores a los del T8. Nuevamente, el brote obtenido bajo luz fue de color verde mientras que el generado bajo oscuridad fue de color amarillo.

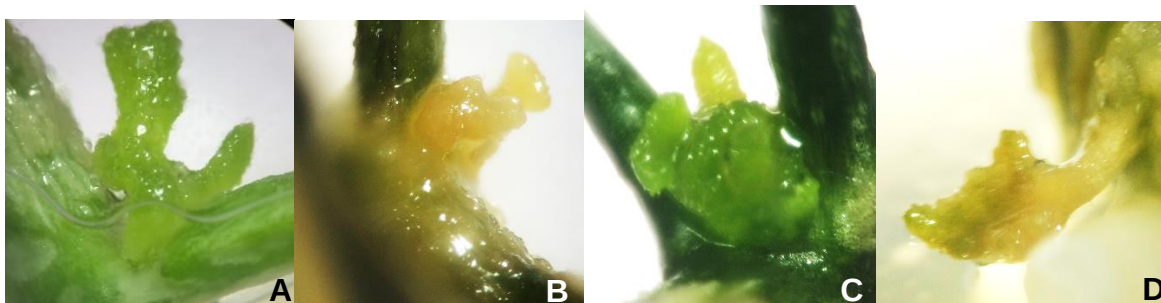


Figura 12. Brotes formados de segmentos nodulares axilares de *I. sonora* con los tratamientos T8 (1 mg L⁻¹ de ANA más 0.2 mg L⁻¹ de K) bajo luz A) y oscuridad B) y T9 (0.2 mg L⁻¹ de ANA más 1 mg L⁻¹ de K) bajo luz C) y oscuridad D) a las dos semanas de siembra en medios MS al 100 % más suplementos.

Bello-Bello y colaboradores (2016) indican que la luz tiene un importante efecto sobre la morfogénesis y las respuestas de crecimiento *in vitro*, debido a que es una señal que es recibida por un fotorreceptor (fitocromo) que regula la diferenciación celular. El fitocromo es capaz de percibir los cambios en la calidad espectral y la intensidad de la luz por lo que puede ser responsable de mediar los cambios morfogénicos observados en estos experimentos. Se han identificado múltiples formas moleculares de fitocromo entre especies que difieren en sus características espectrofotométricas, bioquímicas y fisiológicas y se cree que los genes correspondientes se expresan diferencialmente en respuesta a señales ambientales y fisiológicas, lo cual podría explicar las diferencias observadas (Marks y Simpson, 1999).

Así también Thiruvengadam y colaboradores (2013) informaron la inducción de brotes de *Momordica dioica* en callo organogénico y explantes internodales en 97.5 % en medios MS (1962) con vitaminas Gamborg, mas 5.0 µM de 2,4-D (1000 mg L⁻¹) y 2.0 µM (400 mg L⁻¹) de TDZ. Agarwal y Kamal (2004) observaron la diferenciación de brotes en *Momordica charantia* con solo 1 mg L⁻¹ de BAP en segmentos nodulares. Hernández y colaboradores (2009) obtuvieron brotes a partir de nudos axilares de *I. sonora* usando 0.04 µM (7.5 mg L⁻¹) de ANA en combinación con 0.004 µM (1 mg L⁻¹) de BAP en un 33.3 % y con 0.005 µM (1 mg L⁻¹) de ANA más 0.005 µM (1 mg L⁻¹) de K en un 40 %.

En relación a la formación de callo a partir de segmentos nodulares axilares de *I. sonora* en el Cuadro 25 nuevamente se puede observar que dentro de cada

régimen de luz no hubo diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la comparación de proporciones binomiales; sin embargo, la prueba de χ^2 señala un efecto significativo de la condición de oscuridad para promover una mayor formación de callos.

Cuadro 25. Porcentaje de formación de callo a partir de fragmentos nodulares axilares de *I. sonorae* bajo condiciones de luz y oscuridad.

Tratamiento	ANA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Luz	Oscuridad	Total
T8	1.0	0.2	20.0 a	70.0 b	45.0 A
T9	0.2	1.0	7.7 a	69.2 b	43.0 A
Total			16.2 A	69.0 B	

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$) y prueba de χ^2 ($p \leq 0.05$).

En la Figura 13 se presentan callos formados a partir de segmentos nodulares axilares de *I. sonorae* con el tratamiento T8 bajo condiciones de luz Figura 13 A) y oscuridad Figura 13 B), así como para el tratamiento T9 bajo luz Figura 13 C) y oscuridad Figura 13 D). En ella puede apreciarse que los callos generados bajo condiciones de oscuridad en ambos tratamientos fueron blancos y de mayor tamaño que aquéllos obtenidos bajo condiciones de luz.

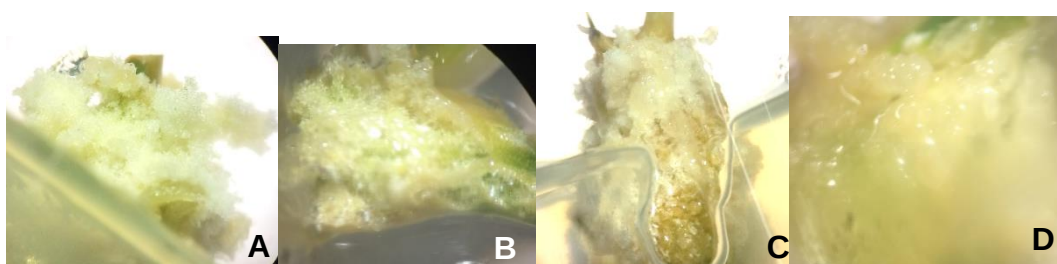


Figura 13. Callos formados de segmentos nodulares axilares de *I. sonorae* con los tratamientos T8 (1 mg L⁻¹ de ANA más 0.2 mg L⁻¹ de K) bajo luz A) y oscuridad B) y T9 (0.2 mg L⁻¹ de ANA más 1 mg L⁻¹ de K) bajo luz C) y oscuridad D) a las dos semanas de siembra en medios MS al 100 % más suplementos.

En el Cuadro 26 se presenta una descripción más detallada de las características de los callos obtenidos a partir de segmentos nodulares axilares. Dentro de las variables evaluadas sólo el color y el régimen de luz mostraron diferencias estadísticas importantes de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis. Los callos obtenidos con los tratamientos T4 y T5 presentaron color verde y fueron

estadísticamente diferentes a los obtenidos con los otros tres tratamientos, aunque iguales entre sí. El tratamiento T5 bajo condiciones de luz produjo significativamente más callos verdes (9.4 %). A pesar de que el tratamiento T6 sólo produjo callos de color amarillo (5.7 %), no fue significativamente inferior a T5 respecto a la cantidad de callos formados. Los tratamientos T8 y T9 produjeron una mayor cantidad de callos blancos que amarillos, 62.3 y 15.1 %, respectivamente, aunque no fueron estadísticamente distintos entre sí. Sin embargo, cuando se consideró el factor luz, T7 produjo una mayor cantidad de callos bajo condiciones de oscuridad en comparación con T9. Se realizó una descriptiva similar para el caso de los brotes obtenidos a partir de segmentos nodulares axilares, pero no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (datos no presentados).

Cuadro 26. Características de los callos obtenidos a partir de segmentos nodulares axilares de *I. sonorae*.

	ANA K		Color				Tamaño				Luz			Estructura		
			B	A	V		P	M	G		P	A		Gr	Ge	
T4	1.0	4.5	0.0	0.0	1.9	AB	0.0	1.9	0.0	A	1.9	0.0	AB	0.0	1.0	A
T5	1.0	1.0	0.0	0.0	9.4	AB	3.8	5.7	0.0	A	9.4	0.0	A	0.0	9.4	A
T6	1.0	0.4	0.0	5.7	0.0	B	0.0	5.7	0.0	A	5.7	0.0	A	0.0	5.7	A
T7	1.0	0.2	62.3	1.9	0.0	A	11.3	35.8	17.0	A	22.6	41.5	AB	62.3	1.9	A
T8	0.2	1.0	15.1	3.8	0.0	A	1.9	13.2	3.8	A	1.9	17.0	B	15.1	3.8	A

Color: B=blanco, A=amarillo, V=verde. Tamaño: P=pequeño (<1 centímetro), M=mediano (≥1 centímetro), G=grande (≥1.5 centímetro). Luz: P=presencia, A=ausencia. Estructura: Gr=granular, Ge=gelatinosa. Valores con letras diferentes dentro de columnas son estadísticamente distintos de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis con $p \leq 0.05$.

Los resultados obtenidos están de acuerdo a los encontrados previamente por Hernández y colaboradores (2009), quienes mediante el uso de distintas proporciones de ANA (μM): BAP (μM) lograron la formación de callos (66 %) a partir de segmentos nodulares axilares de *I. sonorae*.

La luz influye fuertemente en muchos aspectos del crecimiento en las plantas. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre los efectos de la luz en la división celular en cultivos de tejidos vegetales no verdes en la familia *Cucurbitaceae*. En *Cucumis sativus* se ha observado que la luz puede inhibir la división celular y con ello la formación de callos (Punja *et al.*, 1990). También se ha señalado que la

exposición de los cultivos de tejidos a condiciones de luz puede reducir el contenido de sustancias esenciales para la división celular (Behbahani *et al.*, 2011).

Se ha generalizado que cuando el medio de cultivo contiene una mayor concentración de citocininas que de auxinas se induce la formación de brotes adventicios, se disminuye la dominancia apical y se retarda el envejecimiento mientras que los callos se obtienen usando concentraciones similares de auxinas y citocininas (Taiz y Zeiger, 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que estas relaciones no siempre se cumplen, ya que para esta especie fue posible obtener brotes y callos tanto a mayores como menores concentraciones de auxinas en relación a citocininas.

4.5.3.2 Formación de callos a partir de segmentos de mesófilo de hoja

La formación de callos a partir de segmentos de mesófilo de hoja de *I. sonorae* se presenta en el Cuadro 27. En él se puede apreciar que las condiciones de oscuridad favorecieron significativamente la formación de callos (72.7 %). Todos los callos de explantes foliares siempre fueron friables y con apariencia gelatinosa, verdes al principio de su formación y después cambiaron a una tonalidad amarilla hasta llegar a marrón claro (Figura 14). Cuando los callos fueron almacenados bajo condiciones de oscuridad, el 30 % de ellos (18 de 62) formaron raíces: tres de ellos presentaron de 1 a 3 raíces, trece produjeron entre 3 y 6 raíces y sólo dos de ellos fueron capaces de producir más de 6 raíces. En otros trabajos se ha observado que explantes en medio MS (1962) sin reguladores han sido capaces de desarrollar raíces, como en *Cucurbita pepo* (Sánchez *et al.*, 2009) y *Bryonopsis laciniata* (Caroline y Mallaiah, 2011).

Cuadro 27. Porcentaje de formación de callo a partir de segmentos de mesófilo de hoja de *I. sonorae* bajo condiciones de luz y oscuridad.

Tratamiento	Luz	Callos %
1	Presencia	36.5 b
2	Ausencia	72.7 a

Letras iguales dentro de columnas no muestran diferencias significativas. Comparación de proporciones binomiales ($p \leq 0.05$).

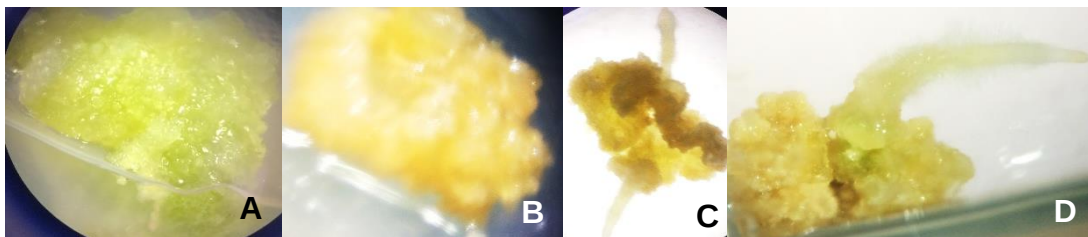


Figura 14. Diferentes estados del desarrollo de callos obtenidos de mesófilo de hoja de *I. sonorae*. Verdes a los tres días de siembra A), marrón oscuro a las dos semanas B), formación de raíces a las tres C) y cuatro semanas D) en medios MS al 100 % suplementados con 0.5 mg L⁻¹ de 2, 4-D, 1.5 mg L⁻¹ de K, sacarosa (30 % p/v) y PVP (70 mg L⁻¹).

El 2,4-D ha sido usado comúnmente para lograr la formación de callo a partir de explantes foliares en *Cucurbitaceas*. En *Bryonopsis lacinosa*, Caroline y Mallaiah (2011) lograron la formación de callo de color café en medio MS (1962) al 100 % suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de 2, 4-D más 2.0 mg L⁻¹ de ANA y callo verde en medio fortificado con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D más 2 mg L⁻¹ de BAP más 2 mg L⁻¹ de ANA. Para *Momordica dioica*, Thiruvengadam y colaboradores (2013) indujeron la formación de callo (90 %) en medios adicionados con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D más 0.08 mg L⁻¹ de putresina. Para *Cucumis sativum var. sativum*, Punja y colaboradores (1990) usaron 1 mg L⁻¹ de 2,4-D en combinación con 1 mg L⁻¹ de BAP para formar callo a partir de hoja (75 %) en oscuridad.

4.5.3.3 Respuestas morfogénicas a partir de embriones cigóticos

En trabajos previos de especies vegetales se ha observado que la siembra de embriones cigóticos tanto inmaduros como maduros en medio MS (1962) suplementado con auxinas y citocininas bajo condiciones *in vitro* puede producir callogénesis, sin embargo, en el presente trabajo no fue posible obtener alguna respuesta morfogénica a partir de esta fuente de explantes. El éxito del rescate de embriones está influenciado por el genotipo, el estado de maduración y tamaño del embrión, la temperatura de incubación, los nutrientes y reguladores de crecimiento, así como por el agar del medio de cultivo. Adicionalmente la presencia de metabolitos secundarios secretados por los embriones reduce los porcentajes de respuesta *in vitro* (Fernández *et al.*, 2000; Daorden *et al.*, 2002; Quintero y Jaramillo, 2012; Hernández *et al.*, 2013).

4.5.3.4 Diferenciación de callos en brotes y raíces

En el presente estudio sólo un callo obtenido a partir de un explante nodular axilar bajo el tratamiento T2 (1 mg L⁻¹ de ANA más 0.2 mg L⁻¹ de K), fue capaz de diferenciarse en un brote y una raíz después de transcurridos dos meses (Figura 15). Cuando el brote y la raíz se formaron se sembraron en medio de cultivo MS (1962) al 100 % suplementado con sacarosa (3 % p/v), tiamina (0.4 mg L⁻¹), mioinositol (100 mg L⁻¹), ácido fólico (0.5 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), riboflavina (0.5 mg L⁻¹), caseína hidrolizada (CH, 500 mg L⁻¹), nitrato de plata (20 mg L⁻¹), L-cisteína (60 mg L⁻¹) y agar-agar (7 % p/v). Sin embargo, a pesar de la presencia de antioxidantes en el medio, el brote se oxidó.

Las citocininas, como la K en este trabajo, funcionan como moléculas de señalización que activan células totipotentes para la organogénesis de brotes. Se usan a menudo para estimular el crecimiento y el desarrollo, ya que promueven la división celular especialmente si se agregan junto con una auxina como ANA (Agarwal, 2015).

En *Cucurbitaceas*, familia a la que pertenece *I. sonorae*, Thiruvengadam y colaboradores (2010) lograron la regeneración de brotes adventicios de callos de hoja de *Momordica charantia* en medio MS (1962) con 5.5 µM (12 mg L⁻¹) de TDZ, 2.2 µM (4 mg L⁻¹) de ANA y 3.3 mM (56 mg L⁻¹) de nitrato de plata. Así como con 4.0 µM (8 mg L⁻¹) de TDZ, 2.4 µM (0.1 mg L⁻¹) de L-glutamina y 0.07 mM (1.5 mg L⁻¹) de 2,4-D en un 96.5 %.

La composición del medio de cultivo y factores físicos como la luz, la temperatura y la humedad pudieron afectar en gran medida la vía de desarrollo de las células cultivadas en este trabajo, reduciendo así la eficiencia de la morfogénesis deseada (Khachatourians y George, 2001).

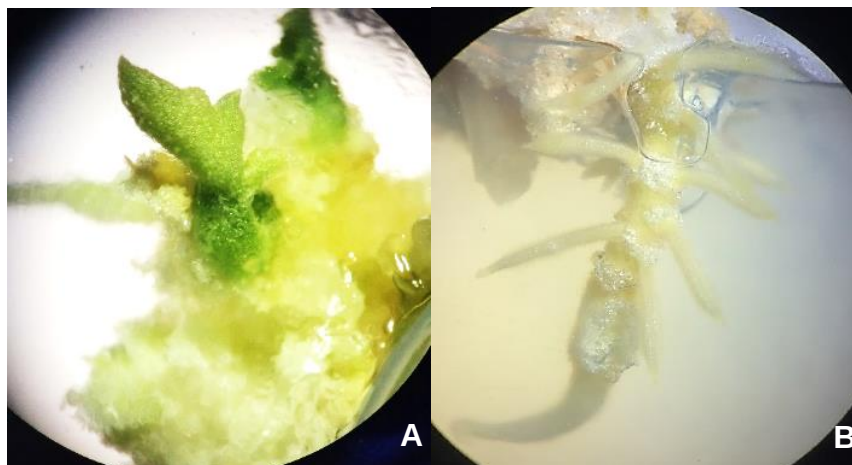


Figura 15. Respuesta morfogénica de un callo obtenido de un explante nodular de *I. sonorensis* A) Brote mayor de 1.5 centímetros, B) Raíz mayor de 3 centímetros. Ambos obtenidos a los dos meses de la siembra en medios MS al 100 % con 1 mg L⁻¹ de ANA y 0.2 mg L⁻¹ de K (T2) más suplementos.

4.6 CONCLUSIONES

La especie desértica *Ibervillea sonorensis* o wereke es recalcitrante para el cultivo *in vitro*, por lo que su micropropagación representa grandes retos. En el presente estudio se lograron establecer protocolos de desinfestación para nudos axilares, mesófilo de hojas, semillas y embriones cigóticos a ser usados como fuente de explantes. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan identificar las causas de la baja germinación de semillas y reducidas respuestas morfogénicas observadas en esta especie.

4.7 AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O, Dra. Margarita Gisela Peña Ortega y a la M. en C. María de Lourdes Martínez Cárdenas por su apoyo en la revisión y corrección de este texto, así como sus consejos.

A la Ing. Ag. Par. Linda Arely Terrazas Morales y L. A. P. Gisela García de la Rosa por su apoyo en las actividades del laboratorio.

Al Dr. Alberto Búrquez Montijo, a la Dra. Enriquena Bustamante Ortega y al C. José Tajia Moroyoqui por su apoyo en la colecta de las plantas y frutos de las poblaciones.

Al Dr. Agustín López Herrera, al C. Mario Barrientos Reyes y la C. Nallely Marcela Gómez Carillo por su apoyo y guía en la prueba de tetrazolio, así como en el préstamo de materiales y germinadoras para las pruebas de germinación.

Al M. en C. Natanael Magaña Lira y al M. en C. Gabriel Ramírez Gonzales por su valioso apoyo en los análisis estadísticos.

4.8 LITERATURA CITADA

Abdelnour, A.; Ramírez, C.; Engelmann, F. 2002. Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) a partir de brotes vegetativos. Agronomía Mesoamericana 13(2): 147 – 151.

Agarwal, M. 2015. Tissue culture of *Momordica charantia* L.: A review. Journal of Plant Sciences 3 (1-1): 24-32

Agarwal, M.; Kamal, R. 2004. *In vitro* clonal propagation of *Momordica charantia* L. Indian Journal of Biotechnology 3: 426-430.

Behbahani, M.; Shanehsazzadeh, M.; Hessami, M. J. 2011. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. Sci. Agric. 16 (1): 69 -76.

Bello-Bello, J. J.; Martínez-Estrada, E.; Caamal-Velázquez, J. H.; Morales-Ramos, V. 2016. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). African Journal of Biotechnology 15(8): 272-277.

Caroline, V. J. E; Mallaiah, B. 2011. High frequency *in vitro* rhizogenesis in *Bryonopsis laciniosa* L. Naud. A highly valuable medicinal cucurbit. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2 (1): 216 – 224.

Chakraborty, R. C.; Sadhu, M. K. 1994. Effect of mulch type and colour on growth and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Indian J. Agric. Sci. 64:608–612.

Daorden, M. E.; Marin, J. A.; Arbeloa, A. 2002. Germinación *in vitro* de embriones inmaduros a distintas temperaturas de estratificación. ITEA 98 (1): 71-80.

Fernández, H.; Pérez, C.; Sánchez T., R. 2000. Modulation of the morphogenic potential of the embryonic axis of *Juglans regia* by cultural conditions. Plant Growth Regul. 30: 125-131.

Hernández E., E.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Martínez-Cárdenas, M. de L. 2009. Avances en la propagación *in vitro* de *Ibervillea sonora* Greene para su

conservación. Anuario de Investigación en Etnomedicina, Medicinas Complementarias y Utilización de Plantas Medicinales. Universidad Metropolitana-Iztapalapa, México. pp. 53-60.

Hernández R., C. A.; Salazar M., Y.; Restrepo B., L. F. 2013. Rescate de embriones para la obtención de vitroplantas de vid (*Vitis vinífera* L.). Rev. Colomb. Biotecnol. XV: 193-201.

Khachatourians, G.; George, G. 2001. Transgenic Plants and Crops. Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp. 154-156.

Lai, L.; Chen, L.; Jiang, L.; Zhou, J.; Zheng, Y.; Shimizu, H. 2016. Seed germination of seven desert plants and its implications for vegetation restoration. AoB Plants 8: plw031; 10.1093/aobpla/plw031.

Liu, E. E.; Leungb, D. W. M.; Hua, X. Q.; Ren, Z. J.; Xiang, P. X.; Ming, X. E. 2013. Efficient plant regeneration *in vitro* from cotyledon explants of chieh-qua (*Benincasa hispida* Cogn. var. chieh-qua). ScienceAsia 39: 134–138.

Marks, T. R.; Simpson, S. E. 1999. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. Plant Growth Regulation 28: 133–142.

Muhammad, U.; Hussain, Z.; Fatima, B. 2001. Somatic embryogenesis and shoot regeneration induced in cucumber leaves. Pak. J. Bot. 43(2): 1283-1293.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.

Punja, Z. K.; Abbas, N.; Sarmiento, G. G.; Tang, F.A. 1990. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. Sativus* var. *hardwiakii*, *C. melo*, and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis, influence of explant source, growth regulator regime and genotype. Plant Cell Tissue and Organ Culture 21: 93-102.

Quintero G., O. D.; Jaramillo V., S. 2012. Rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels). Acta Agronómica 61 (1): 52-60.

Rao, N.K.; Hanson, J.; Dulloo, M.E.; Ghosh, K.; Novell, D.; Larind, M. 2007. Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia.165 p.

Roca, W. M.; Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. 299 p.

Sánchez H., M. A.; Sánchez H., C.; Villanueva V., C.; Gil V., I.; Jiménez R., M. C., Sánchez C., I. 2009. Multiplicación *in vitro* vía organogénesis en calabaza. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 11-22.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2006. *Fisiología Vegetal*, Vol. II. Universitat Jaume I. Castellón de la Plana, España. 967 p.

Thiruvengadam, M.; Rekha, K. T.; Jayabalan, N.; Praveen, N.; Kim, E.H.; Chung, I. M. 2013. Effect of exogenous polyamines enhances somatic embryogenesis via suspension cultures of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. Ex. Willd.) *Australian Journal of Crop Science* 7 (3): 446 – 453.

Thiruvengadam, M.; Rekha, K. T.; Yang, C. H.; Jayabalan, N.; Chang, M. 2010. High frequency shoot regeneration from leaf explants through organogenesis in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Plant Biotechnology Reports* 4(4): 321- 328.

Victoria T., J. A.; Bonilla C., C. R.; Sánchez O., M. S. 2006. Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica* 55 (1): 1-14.

Zagatto K., M. G.; Libório S., L. C.; Martinelli R., A. P.; Januzzi M., B. M. 2005. *In vitro* organogenesis in watermelon cotyledons. *Pesq. Agropec. Bras.* 40 (9): 861-865.