



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CULTIVO DE TEJIDOS in vitro DE
Catharanthus roseus L.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
MARIA LUISA ROBLES CORONA

MEXICO, D. F.

1985.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Introducción	-----	1
Capítulo I	-----	5
Antecedentes:		
1.1. Breve historia de los cultivos de tejidos	--	5
1.2. Ventajas y aplicaciones de los cultivos <u>in vitro</u>	-	7
1.3. Terminología	-----	9
1.4. Bases para la obtención de cultivo de tejidos	-	10
1.5. Requerimientos nutricionales de los cultivos de tejidos	-----	13
1.6. Cultivo de callos	-----	17
1.7. Micropropagación	-----	18
1.8. Cultivo de embriones inmaduros	-----	19
1.9. Cultivo de anteras	-----	21
1.10. Cuantificación del cultivo de tejidos	-----	25
1.11. La Planta:		
1.11.1. Taxonomía	-----	28
1.11.2. Descripción botánica	-----	29
1.11.3. Distribución geográfica	-----	30
1.11.4. Datos adicionales	-----	32
1.11.5. Utilidad de la especie	-----	33
Capítulo II	-----	35
Materiales y métodos		
2.1. Elaboración del medio	-----	35
2.2. Material biológico	-----	36
2.3. Propagación	-----	38
2.4. Embriones inmaduros	-----	39
2.5. Anteras	-----	40

Capítulo III	-----	43
Resultados y Discusión		
3.1. Propagación	-----	43
3.2. Embriones inmaduros	-----	47
3.3. Anteras	-----	49
Cuadros	-----	57-
Gráficas	-----	63
Conclusiones	-----	70
Sugerencias	-----	73
Apéndices	-----	75
Bibliografía	-----	80

I N T R O D U C C I O N

El cultivo de células y tejidos vegetales se basa en un conjunto de metodologías y técnicas de laboratorio que han venido modificándose y adaptándose a distintas especies vegetales. Estas técnicas permiten hacer cierto grado de manipulación en el proceso de morfogénesis de los tejidos vegetales, de tal manera que a partir de células somáticas es posible la formación de un conjunto de células no diferenciadas morfológicamente y con cierto grado de homología bioquímica y genéticamente totipotenciales. Asimismo, ha sido posible también inducir el proceso en sentido contrario, es decir, a partir de callos se ha logrado reorganizar nue-

vamente las estructuras, diferenciar los tejidos y recuperar otra vez la planta completa.

En la actualidad, es posible regular el proceso de crecimiento y diferenciación celular en las plantas en un grado impresionante mediante manipulaciones cuantitativas de los fitorreguladores y otros factores que regulan el crecimiento a través de la regulación metabólica. Es importante mencionar, sin embargo, que este proceso se ha logrado inducir en forma completa solamente en un número muy reducido de las especies vegetales conocidas y que además no se conocen aun los mecanismos a nivel molecular que controlan dicho fenómeno.

Otro de los grandes atractivos que presentan los sistemas de cultivo de células vegetales, es la posibilidad de hacer manipulaciones genéticas con ellas. En efecto, los adelantos logrados en los cultivos de las células vegetales proporcionan ya la posibilidad de manejar éstas como si fueran sistemas bacterianos, inducir en ellos cambios fundamentales en el genoma celular y posteriormente seleccionar adecuadamente, de los sistemas de cultivos, las células transformadas (Sánchez, 1978).

La ventaja de trabajar con cultivo de tejidos vegetales es que se puede tomar cualquier parte de la planta y administrándole la concentración adecuada de fitorreguladores y teniendo un medio adecuado de vitaminas, aminoácidos, azúcar y minerales crecerá un callo o bien

un brote dependiendo de si este cultivo está en la oscuridad o en la luz. Ya que las células al tener la característica de poder desdiferenciarse y rediferenciarse - (totipotencialidad de la célula) da como resultado que este tejido sea más manejable para cualquier propósito, ya sea cultivo de órganos (hojas, tallo, raíz, anteras, etc), regeneración, cultivo de embriones, cultivo en - suspensión, propagación, etc, dándonos informaciones diferentes de acuerdo a lo que queramos estudiar. Además de que el crecimiento de las células en cultivo se da en un menor tiempo a comparación de lo que tarda en crecer la planta en condiciones normales (Hudson, 1982).

Con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Obtener a partir de embriones inmaduros y anteras callos.
- b) Obtener brotes a partir de hoja sin pasar por callo.
- c) Y hacer medios de cultivo que sean reproducibles en la práctica para más adelante encontrar un medio de mantenimiento adecuado para hacer nuevos estudios.

En lo particular lo que nos interesa a largo plazo es obtener una línea celular de estos tres tejidos, o bien de alguno de ellos que contenga vincristina y vincoleucoblastina que son alcaloides que contiene la planta Catharanthus roseus que se utilizan como anticancerígenos (Waizel, 1979), ya que la planta los produce en muy pequeñas cantidades. Además no se ha encontrado una línea celular en cultivo de tejidos que contenga estos

alcaloides o al menos alguno de ellos (Carew, 1962, 1964, 1966, y 1970; Wolfgang, et al 1980; Constabel, et al, 1981; y Kurz, et al, 1981).

Por esta razón creemos que es muy importante utilizar esta técnica ya que las ventajas que nos representa serán de utilidad en la investigación para combatir el cáncer.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1. Breve historia de los cultivos de tejidos:

La historia de los cultivos de tejidos vegetales ha sido adecuadamente revisada por los autores (White 1931, 1936, 1941; Gautheret 1935, 1937; Nobecourt 1939; Fiedler 1938 citado en Dodds y Roberts) pero aquí solamente la comentaremos brevemente.

El primer concepto fue claramente formulado en 1902 por Haberlandt, quien tuvo la idea de experimentar con los tejidos vegetales y órganos aislados bajo condiciones de laboratorio, solamente que estos experimentos no pudieron fructi-

ficar (Gamborg et al, 1976).

Los cultivos de tejidos vegetales de explantes o de órganos (raíces) fueron capaces de crecer en poco tiempo pero no sobrevivieron ilimitadamente, estos estudios fueron reportados en 1922 por Kotte y Robins (Gamborg et al, 1976).

Los primeros cultivos que fueron capaces de crecer ilimitadamente, fueron reportados en 1934 por White usando raíces de jitomate (Gamborg et al, 1976).

White en 1939, Nobecourt en 1939 y Gautheret en 1940 establecieron el primer cultivo de tejido verdadero. Tal técnica ha sido desarrollada rápidamente y ha sido aplicada para el estudio de una variedad de problemas, muchos de los cuales son de interés bioquímico (Gamborg et al, 1976; Dodds y Roberts, 1982).

Los trabajos, pioneros destinados a la obtención industrial de metabolitos de interés económico se deben a Nickell (1962); durante esta década quedó claro que si bien las células vegetales no pueden competir con los microorganismos en la producción de metabolitos primarios, no es así para la producción de metabolitos secundarios de alto peso molecular, sintetizados únicamente por plantas superiores.

Durante los sesenta se demostró que el cultivo de anteras de angiospermas tienen el potencial para producir numerosos embrioides haploides (Guha y Maheshwari, 1966, 1967; Bourgin y Nitsch, 1967). También en estas fechas se desarrollaron las técnicas de aislamiento de protoplastos y cultivo (Cocking, 1960). En general este método involucra la di

gestión enzimática de la pared celular por preparaciones purificadas de celulasa y pectinasa y se mantiene el control sobre la expansión de los protoplastos con un osmótico (por ejemplo sorbitol y manitol). Los protoplastos aislados y cultivados regeneran nuevas paredes celulares, forman colonias celulares y eventualmente plántulas (Takebe et al, 1971).

Hanning en 1904 cultivó embriones inmaduros de Rapbanus y Cochea y desde esa fecha hasta hoy se han hecho estudios de cultivo de tejidos modificándose estas técnicas para obtener un mejor crecimiento de las diferentes partes de las plantas sembradas (Dodds y Roberts, 1982).

En las secciones siguientes del presente trabajo se mencionan algunos estudios realizados para varias especies en donde se utilizaron embriones inmaduros, embriones maduros, anteras, brotes y hojas.

1.2. Ventajas y aplicaciones de los cultivos in vitro:

Los cultivos de tejidos pueden ayudar a minimizar variables tales como los factores ambientales; se puede tener un mayor control de la luz, humedad, temperatura, mezcla de gases así como la composición del medio nutritivo. Asimismo, pueden reducirse las influencias correlativas entre los órganos y como pueden crecer en la ausencia de bacterias, hongos y posibles virus se eliminan los artefactos producidos por dichos microorganismos (Loyola-Vargas, 1984). Los cultivos de tejidos también pueden ser usados para pre

servar germoplasma y como un instrumento para el fitomejoramiento de plantas.

También los cultivos de tejidos producen sustancias químicas útiles, económicamente rentables. Esta posibilidad se visualizó cuando en 1950 Arreguin y Bonner reportaron que el cultivo de tejidos vegetales de guayule producía hule. En la actualidad los cultivos de tejidos pueden ser manipulados para que puedan extraerse específicamente alguna o algunas sustancias del tejido o del medio en el cual ha crecido el cultivo (Nickell, 1980).

Las principales ventajas de los cultivos de tejidos son:

- Condiciones controladas
- Libres de contaminación
- Selección de variantes
- Independencia del medio ambiente
- Estado fisiológico uniforme
- Obtención de nuevos compuestos (Loyola-Vargas, 1984).

Hasta ahora se han identificado no menos de 200 productos producidos por los cultivos de tejidos vegetales, los que en general se pueden dividir en tres categorías:

- 1) aceites esenciales
- 2) glúcidos
- 3) alcaloides

Aunque son muchos los adelantos logrados en este terreno, aun existen obstáculos que requieren ser superados.

Entre ellos tenemos:

- a) La inestabilidad genética

- b) La baja producción de las sustancias de interés
- c) La lenta velocidad de crecimiento del cultivo.

1.3. Terminología:

Una simple definición de los cultivos de tejidos vegetales puede ser el crecimiento productivo de una masa de células vegetales sobre algún tipo de medio nutritivo. La masa de células vegetales puede ser parte de un órgano, tal como raíz o tallo, o puede ser simplemente una masa de células no diferenciadas (callo). Más comúnmente una planta en cultivo de tejidos se refiere al cultivo de tejidos de callos en crecimiento sobre un medio sólido (cultivo estático) o en un medio líquido (cultivo en suspensión) (Taylor y Farnsworth, 1975). En tanto que explante se refiere al fragmento de una planta o tejido usado al inicio del cultivo (Street, 1977).

Ya que muchos autores utilizan diferente terminología para clasificar los diferentes cultivos que se pueden hacer dependiendo de la parte de la planta utilizada, nosotros escogimos las definiciones de Street (1977) y Camborg y Shyluk (1981) porque consideramos que abarcan todas las posibilidades para hacer un cultivo; éstas son las siguientes:

Cultivo de órganos: se refiere al cultivo de órganos aislados como son puntas de raíz, puntas de tallo, primordio de hoja y/u hoja, ovarios, microsporas, anteras, etc.

este material mantiene su identidad morfológica y fisiológica básica.

Cultivo de embriones: éstos son cultivo de embriones aislados maduros e inmaduros.

Cultivo de callos o tejido: son tejidos dando origen a la proliferación desorganizada de células de explantes u órganos de plantas. Los cultivos son usualmente crecidos como una masa de células no diferenciadas sobre un medio sólido.

Cultivo en suspensión: éstos consisten en células aisladas no diferenciadas, muy pequeñas que se encuentran en un medio líquido en agitación.

Cultivo de meristemas: el cultivo de meristemas u otro tejido se utiliza con el propósito de regenerar plantas o conservar germoplasma.

Cultivo de protoplastos: es el cultivo de células que se les priva de su pared celular y también de ellas se pueden regenerar plantas completas.

1.4. Bases para la obtención de cultivo de tejidos:

El crecimiento de masas de células no organizadas (callo) sobre agar o en medio líquido (suspensión) son ampliamente utilizados en estudios bioquímicos y de crecimiento (Carew y Staba, 1965; Street, 1977 y Loyola-Vargas, 1984).

La inducción de un callo se efectúa generalmente plantando un trozo de tejido diferenciado estéril sobre un medio

nutritivo gelificado con agar y al cual se le han agregado fitorreguladores. El medio y los reguladores del crecimiento se determinan mediante un sistema de ensayo y error (Gamborg et al, 1976) o bien buscando bibliográficamente algún medio adecuado de alguna familia cercana a esa especie, se prueba ese medio y si no da resultado entonces se hacen variaciones en éste probándose simultáneamente diferentes explantes.

El callo puede cultivarse transfiriéndolo todo o una parte a medio sólido fresco con el objeto de que adquiriera un crecimiento más rápido y consistencia suave (friabilidad), esto se conoce como resiembra. Dependiendo de la planta de que provienen los callos pueden ser blancos, amarillentos o pigmentados con antocianinas (Dodds y Roberts, 1982).

Las diferencias en el medio de cultivo, medio ambiente, edad, origen celular y tasas de crecimiento pueden explicar el comportamiento de una línea en particular y no necesariamente representar una característica general de las células vegetales en cultivo. Condiciones más uniformes pueden ayudar a obtener datos y observaciones más comparables.

Hay tres factores en particular, los cuales gobiernan los sucesos de cultivos de células. Estos son: el origen del explante, el medio de cultivo y las condiciones medio ambientales (Gamborg et al, 1976).

Origen del explante: La producción útil de callos y subsecuentemente la regeneración de la planta es dependiente, en parte, de la calidad asociada con los explantes usados y és

tos están relacionados con la condición de la fuente vegetal, es decir, que haya tenido suministros nutricionales a adecuados antes de ponerse en cultivo. Las plantas jóvenes proveen los mejores explantes. Las plantas viejas pueden te ner acumulados más patógenos en sus tejidos y por lo tanto no ser saludables. Por consiguiente las plantas viejas probablemente contienen menos tejido meristemático y pueden te ner el problema adicional de madurez fisiológica (Staba, 1980).

Se ha observado que los explantes grandes presentan mayor inclusión de contaminantes microbianos en los tejidos. Hay, sin embargo, un tamaño mínimo efectivo para los explantes, para que crezcan adecuadamente y además para que el daño de bido a la disección y transferencia sean producidos; tenemos el caso de los meristemas muy pequeños que al ponerlos separados crecen lentamente, mientras que si se ponen varios en el mismo frasco, crecen más rápido y se reduce el daño causado por la disección (Seabrook, 1978).

Medio de cultivo: Dependiendo de la planta que se esté es tudiando, se utilizará el medio de cultivo adecuado, tenemos por ejemplo que existen diferentes medios basales como el de White, Gamborg, Murashige-Skoog, etc; y éstos pueden modificarse de acuerdo a las necesidades de la planta de don de se quiere obtener una línea celular (Hudson, 1982). De a quí se desprende la importancia de los requerimientos nutri cionales del cultivo que se verán más adelante.

Condiciones medio ambientales: éstas se refieren a las

condiciones que se deben de tener antes del cultivo, como se ría el tratamiento de los órganos de la planta fuente que se va a utilizar, es decir que se pongan en frío, luz, oscuridad, etc. o bien de las condiciones adecuadas que se deben de tener después de inducido el cultivo como son: el fotoperíodo, temperatura (que puede ser de un rango de 25-27 °C), etiolación, etc (Staba, 1980). Estos factores dependen de la especie vegetal que se este trabajando.

1.5. Requerimientos nutricionales de los cultivos de tejidos:

Aunque las plantas completas tienen requerimientos simples para el crecimiento, los cultivos de tejidos vegetales tienen necesidades más complejas y rara vez son autotróficos, esto quiere decir que el tejido vegetal in vitro requiere usualmente de macro y micronutrientes al igual que un cultivo hidropónico. En resumen, otros nutrientes tales como fuente de carbono y vitaminas son necesarios. Las células vegetales aislados frecuentemente requieren de la adición de vitaminas y reguladores del crecimiento que normalmente son sintetizados in vivo por una parte u órgano de la planta y transportados a otra donde son metabolizados. Poco se conoce del efecto de algunos constituyentes individuales del medio de cultivo sobre la producción de metabolitos secundarios debido a la complejidad en la composición química de los tejidos (Staba, 1980).

Los medios basales de Murashige y Skoog, Gamborg, Miller y

y Ojima son más adecuados para un amplio rango de plantas y para la promoción de organogénesis en cultivos, se deben de encontrar concentraciones adecuadas de fitorreguladores para que haya un crecimiento de las células cultivadas. Para cada especie el medio de Murashige y Skoog (MS) presenta una mayor concentración de sales, lo cual le permite mantener el crecimiento de más células en cultivo. Algunos iones, como es el caso del ión amonio, puede presentarse en altas concentraciones en el medio de cultivo para desarrollar tejido in vitro en todos los estadios. El agregar fosfato monobásico de sodio en la solución de sales del medio MS ha sido benéfica para algunos tejidos. El medio MS presenta mayor cantidad de microelementos comparado con otros medios. El incluir agentes quelantes, tales como el EDTA asegura que el hierro sea capaz de mantenerse en solución en un amplio rango de pH (Seabrook, 1976) el cual en los medios de cultivo es usualmente ajustado en un rango de 5 a 6 antes de la adición del agar, ya que el crecimiento de los tejidos en el medio de cultivo son pH dependientes. Por otro lado la concentración del nitrógeno y de potasio parecen ser importantantes para la embriogénesis somática. Reinert (1972) propuso una interacción entre nitrógeno y auxina la cual lleva a la embriogénesis. (Staba, 1980).

Las vitaminas son importantes para que haya un buen crecimiento in vitro del cultivo de tejido, la más ampliamente usada es la tiamina.HCl (Merck).

La sacarosa se utiliza como fuente de carbono la cual es

absolutamente necesaria para la mayoría de los tejidos ya que muy pocas células son autotróficas in vitro. La concentración de sacarosa más comúnmente usada es de 2 a 3 % como fuente de carbón, sin embargo, hay evidencia de que la producción de algunos metabolitos obtenidos de cultivo de tejidos vegetales pueden ser afectados por la concentración de sacarosa (Tabata, 1977; citado en Staba, 1980 y Dodds y Roberts, 1982).

Los reguladores del crecimiento, en plantas intactas, actúan para regular y coordinar procesos que ayudan al desarrollo normal de la planta. El crecimiento, la diferenciación del tejido y las células así como el metabolismo secundario, son afectados por los fitorreguladores. El agregar reguladores del crecimiento al medio de cultivo de vegetales no es siempre necesario para cultivos de callo. Sin embargo, el suministro de reguladores del crecimiento es usualmente obligado para cultivo de callos en los cuales se requiere un incremento en las tasas de crecimiento u organogénesis.

Muy pocas plantas en cultivo producirán callos abundantemente en ausencia de reguladores del crecimiento.

Generalmente el ácido indolacético (AIA) es la auxina más usada para el cultivo de tejidos vegetales debido a sus pocos efectos adversos sobre la organogénesis.

El ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) es una auxina que suprime la organogénesis y es particularmente útil para la inducción y manutención de cultivo de callos.

Las citocininas son un segundo grupo de reguladores del

crecimiento en donde las más usadas son la cinetina (K) y la benzilaminopurina (BA, BAP), esta última tiene particularmente un efecto en la dominancia apical en brotes axilares y sobre la proliferación de brotes inducidos in vitro (Staba, 1980).

Skoog y Miller (1957) reportaron que el balance de niveles de auxina y citocinina tienen un efecto sobre la formación de órganos, Ambas, auxina y citocinina, son necesarias para el control del crecimiento y la organogénesis in vitro. La propagación de los diferentes reguladores del crecimiento y las concentraciones que son requeridas para cada tejido varía con el estadio de desarrollo del tejido cultivado.

Los aminoácidos y amidas pueden ser utilizados para el cultivo de tejidos vegetales de algunas especies entre las más utilizadas están la L-asparagina, el L-ácido aspártico, la L-arginina, el L-ácido glutámico y la L-glutamina (Huang y Murashige, 1977).

Como se mencionó antes, la fuente de nitrógeno viene dada por el amonio y el nitrato en el medio MS. Además se sabe que los ácidos citidílico y guanílico sirven para mejorar el cultivo de callos (Huang y Murashige, 1977).

También algunos cultivos requieren de complejos naturales como la leche de coco, el extracto de levadura, la peptona, la lactoalbúmina, etc, que eran utilizados anteriormente y que en la actualidad se tienden a substituir debido a que su uso puede producir resultados no reproducibles. Pese a ésto algunos autores lo siguen utilizando (Vasil y Botti,

1983).

1.6. Cultivo de callos:

El cultivo de tejidos vegetales puede realizarse en un medio nutritivo solidificado con agar, en donde el tejido forma un callo o masa de células en proliferación, que es conveniente para inducir y mantener líneas celulares (Gamborg et al, 1978).

Este callo generalmente presenta un crecimiento muy lentamente lento. Las nuevas células son formadas en la periferia de la masa del callo existente, la cual está sometida a un gradiente nutricional que va desde las células que están en contacto directo con el medio nutritivo que crecen en la superficie del callo (Gamborg et al, 1981).

Desde el punto de vista funcional el callo tiene la capacidad de desarrollar órganos normales, plántulas y clones que pueden formar plántulas completas (Street, 1981).

Cuando un callo se deja crecer por mucho tiempo en el mismo medio, los nutrientes esenciales son agotados por el callo, al igual que hay una pérdida de agua y de metabolitos por el callo, por esta razón es necesario transferirlos en medio fresco después de un cierto tiempo para que no mueran y crezcan en mejores condiciones. Este tiempo puede ser de tres semanas a un mes (Street, 1981).

1.7. Micropropagación:

La micropropagación es la técnica que se utiliza para lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial en condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de la planta, tales como embriones, semillas, tallos, puntas de ramas, puntas de raíces, células individuales, hojas y granos de polen.

El tipo de patrón del crecimiento que se presenta depende del potencial genético de la planta así cultivada y del ambiente químico y físico a que está sometido el tejido en cultivo. De manera potencial, con esas técnicas es posible reproducir plantas de todas las especies si se conoce lo suficiente de sus requerimientos nutritivos, hormonales y de cultivo.

Las aplicaciones principales de esas técnicas en la propagación de plantas son:

- a) establecer plantas libres de organismos patógenos,
- b) aislar células o líneas celulares genéticamente extraordinarias que pueden convertirse en nuevas variantes de plantas
- c) y permitir una multiplicación rápida en condiciones que las mantengan libres de enfermedades.

Esas técnicas son especialmente significativas para proporcionar nuevos métodos de propagación vegetativa rápida

de plantas.

El valor del cultivo de tejidos como procedimiento de propagación de plantas, depende de la capacidad del callo para:

- 1) diferenciar raíces y brotes
- 2) desarrollar pequeñas estructuras semejantes a embrioides a partir de células individuales y agregaciones de células.

La diferenciación de raíces y brotes se hace con más facilidad en ciertas plantas herbáceas como zanahoria y tabaco (Hudson, 1982).

La propagación de los cultivos de tejidos también puede proveer la utilidad de mantener poblaciones de especies raras y que están en peligro de desaparecer o bien de especies que son difíciles de cultivar o que su crecimiento es muy lento y producen poca descendencia, tenemos el caso de las cactáceas de las que se han hecho varios estudios (Mauseth, 1977, 1979; Johnson y Emino, 1979; Johnson et al, 1979 y Stefanis et al, 1980).

También se han hecho estudios de propagación de plantas que tienen importancia económica tal como las orquídeas, col, maíz, trigo, arroz (Jagannathan et al, 1977) y Bougainvillea en donde utilizaron BAP y AIA para la obtención de los brotes (Sharma, 1981).

1.8. Cultivo de embriones inmaduros:

El cultivo de embriones inmaduros se ha aplicado para

resolver problemas prácticos tales como el prolongado periodo de latencia de muchas semillas que retarda su velocidad de reproducción, el daño de las mismas provocado por organismos patógenos que impiden su germinación y también el aborto frecuente de embriones híbridos que en muchos casos es ocasionado por un desarrollo deficiente del endospermo; problemas que en gran medida se ven solucionados con el cultivo aséptico de los embriones en un medio nutritivo adecuado. Además, estos cultivos in vitro se han utilizado para la obtención directa de callo a partir de embrión (Lowe y Conger, 1979).

El cultivo de embriones también ayuda al entendimiento de la morfogénesis. Además ha habido progreso hacia el aislamiento de embriones jóvenes (inmaduros). Se ha demostrado que los requerimientos nutricionales de tales embriones llegan a ser progresivamente menos complejos que el de los maduros. También porque se sabe que de explantes más jóvenes se obtiene callo más rápido y un mejor crecimiento.

Embriones pequeños globulares requieren un delicado balance de fitorreguladores tales como auxina, giberelinas y citoquinina, junto con adenina y vitaminas del grupo B y relativamente altos niveles de sacarosa.

En resumen, la importancia en el desarrollo de estudios del cultivo de embriones jóvenes ofrece un método para originar embriones híbridos derivados de ciertas cruces interespecíficas, tenemos como ejemplo el lino y la cebada. El hecho de que algunas células dentro de las masas de callo

sean capaces de formar embriones o meristemas organizados es altamente significativo, esto indica que tales células retienen toda la información genética requerida para el desarrollo normal de una planta completa, ellas son totipotentes (Butcher e Ingram, 1976).

Se han hecho más estudios acerca de embriones maduros, que de inmaduros, en el caso de los primeros se ha trabajado desde 1936 con embriones sembrados in vitro de Avena sativa, orquideas, Zea mays, Panicum palmifolium, Vallota purpurea, Pinus resinosa, Thuja occidentalis, Picea canadensis, Isuga canadensis y Pseudotsuga taxifolia (De La Rue, 1936) y actualmente se ha trabajado con Triticum aestivum, Zamia pumila, Pennisetum americanum, entre otras (Webb et al, 1982; Vasil y Ozias, 1983; Vasil y Botti, 1983). En los segundos, se han encontrado estudios (desde 1936) de varias especies que pueden ser crecidos en cultivo e inducir la formación de plantas completas. Estas especies son: Taraxacum officinale, Chrisathemum leucanthemum, Lactuca canadensis, Coreopsis lanceolata, Lycopersicon esculentum, Nicotiana y Bryophyllum crenatum, Zea mays. Estos embriones inmaduros median entre 0.5 y 1 mm cuando fueron transferidos al nuevo medio (De La Rue, 1936) y actualmente se ha trabajado con Papaver somniferum, Hordeum, Linum entre otras especies (Butcher e Ingram, 1976; Dodds y Roberts, 1982).

1.9. Cultivo de anteras:

Las células de plantas haploides contienen un simple complemento cromosómico, es decir si su número cromosómico diploide es 20, por ejemplo, el haploide tendría 10 cromosomas, y estas plantas son útiles en programas de fitomejoramiento para la selección de características deseables. La propuesta de cultivo de anteras y cultivo de polen es para producir plantas haploides por la inducción de embriogénesis de divisiones repetidas de esporas monoploides, microsporas o granos de polen inmaduros (Dodds y Roberts, 1982). Hay que aclarar que las anteras son cortadas cuidadosamente y transferidas a un medio nutritivo apropiado. Estas al ser cortadas en un estadio inmaduro usualmente crecen anormalmente y no hay desarrollo de granos de polen de las células madres del polen (Butcher e Ingram, 1976).

Las microsporas representan el comienzo de la generación del gametofito macho. Las microsporas maduras, especialmente siguiendo su liberación de tétradas, son referidas como granos de polen. El número cromosómico de estos haploides puede ser duplicado con la utilización de colchicina, lo que produce una planta homocigótica más estable (Vasil y Nitsch, 1975).

El estadio particular de desarrollo de las anteras en el tiempo de cultivo es el factor más importante en llevar a cabe la producción de embrioides.

En especies con un determinado número de anteras por flor o series de yemas florales pueden ser examinadas en orden para dar todos los estadios de desarrollo. Básicamente se u-

san dos métodos: 1) las anteras cortadas son cultivadas sobre un medio de agar o líquido y la embriogénesis ocurre dentro de la antera, o 2) el polen es removido de la antera, por medio de un corte o por dehiscencia natural de la antera, y el polen aislado es cultivado sobre un medio líquido. Puede tomar de 3 a 8 semanas para que emerjan plántulas haploides de anteras cultivadas (Reinert y Bajaj, 1977 citado en Dodds y Roberts, 1982).

Sunderland (1979) reportó que las flores de muchas plantas que se utilizan en cultivos de anteras caen dentro de tres categorías: premitótica, mitótica o postmitótica. En la categoría premitótica la mejor respuesta es obtenida al usar anteras en las cuales las microsporas han completado la meiosis, pero aun no comienza la primera división del polen (ejemplos, Hyoscyamus y Hordeum vulgare). Las anteras que corresponden al grupo mitótico responden óptimamente cerca de la primera división del polen (ejemplos, Nicotiana tabacum, Datura innoxia y Paeonia). Los estadios tempranos bicelulares del desarrollo de polen es mejor en las plantas postmitóticas (ejemplos, Atropa belladonna y Nicotiana) (Dodds y Roberts, 1982).

Otro factor en el cultivo de las anteras es el estadio fisiológico de la planta padre (ejemplo, fotoperíodo, intensidad de luz, temperatura y nutrición mineral). Las anteras deberán de ser tomadas de flores producidas durante el comienzo del período de floración de la planta (Sunderland, 1971).

Se han reportado altas producciones de embriones que provienen de anteras que crecen bajo días cortos y altas intensidades de luz (Sunderland, 1971).

Varios tipos de anteras requieren pretratamiento para la mejor producción de embriones en algunas plantas. El pretratamiento de anteras a bajas temperaturas por periodos de 2 a 30 días a temperatura de 3 a 10 °C pueden estimular la embriogénesis (Sunderland y Roberts, 1977).

La presencia de tejidos de anteras en el cultivo, introduce varios factores definidos que influyen la producción de embrioides. Raghavan (1978) sugirió que el gradiante de auxina endógena dentro de la antera puede jugar un papel en el desarrollo del grano de polen.

Se han hecho diversos estudios sobre el cultivo de anteras en diferentes especies, en cuanto a concentraciones de fitorreguladores, si requieren pretratamiento o no, en que fuente de sacarosa crecen mejor, producción de embriones, etc. Las especies en donde se han hecho estos estudios son: Arachis hypogaea, A. villosa, Vitis, Zea-mays, Oriza sativa, Nicotiana, Triticale, Hevea brasiliensis, Pentunia, Arabidopsis thaliana, Solanum nigrum y Anemone canadensis (Gresshoff et al, 1972; Harn et al, 1972; Chaleff et al, 1981; Bajaj et al, 1981; Zapata, 1981; Bouquet et al, 1982; Bullock et al, 1982; Chen, 1982; Jialin et al, 1983; Sharma et al, 1983; Raquin et al, 1983; Keathley et al, 1983; Johansson, 1983; Ding et al, 1984; Henry et al, 1984; Sunderland et al, 1984; Lazar et al, 1984 y Shaeffer, et al, 1984).

En el cultivo de anteras de arroz Zapata en 1981 utilizó un pretratamiento de frío a 8 °C por 13 días en la oscuridad y al final 16 horas continuas de luz, este tratamiento le dió mejores resultados de formación de callo y producción de embriones. Además de que la concentración de sacarosa fue de 20 g/l y de agar 8 g/l a un pH de 5.6 y los fitorreguladores que se utilizaron fueron de 1 ppm de 2,4-D con 1 ppm de K.

Otro autor menciona que el pretratamiento que le dió mejores resultados fue el de 4 °C en las siguientes especies Hordeum vulgare, Nicotiana tabacum y Paeonia lactiflora (Sunderland et al, 1984).

1.10. Cuantificación del cultivo de tejidos:

Después de que los callos han crecido por un tiempo en asociación con el tejido original, llega a ser necesario el subcultivo de los callos en un medio fresco. El crecimiento sobre el mismo medio por un período grande ocasiona el agotamiento de nutrientes esenciales y la desecación gradual del agar. Los metabolitos secretados por los callos durante el crecimiento pueden acumularse hasta niveles tóxicos en el medio. La transferencia del fragmento de callo debe ser una masa suficiente para asegurar la renovación del crecimiento sobre el medio fresco: si la transferencia del inóculo es también pequeña puede tener una velocidad pequeña del crecimiento o ninguna. Street, 1977, ha recomen

dado que el inóculo debe tener un diámetro de 5 a 10 mm y un peso de 20 a 100 mg. Los subcultivos sucesivos son usualmente realizados durante 28 días con tubos de cultivo conteniendo 30 ml de medio. Una curva de crecimiento típica para cultivo de callos es mostrada en la figura 1 que se asemeja a una curva de crecimiento de bacterias. Yeo - man y Mcleod (1977) sugieren que los cultivos mantenidos en agar a 25 °C o abajo de este rango podrán ser subcultivados de 4 a 6 semanas. Un callo suave puede ser subdividido con una espátula o escalpelo y transferirse directamente a la superficie del medio fresco.

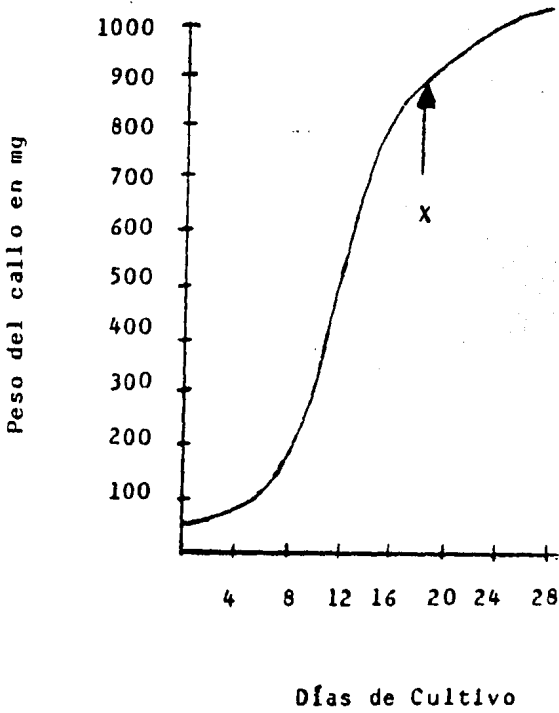


Figura 1

Respuesta del crecimiento de un cultivo de callo típico. Este callo en particular podrá ser subcultivado aproximadamente en un intervalo de tiempo indicado por X.

1.11. La Planta

1.11.1. Taxonomía:

El género Vinca fue establecido por Linneo en el año de 1753 en su "Species Plantarum" (1:209) donde distingue dos especies Vinca minor y Vinca major. La descripción genérica asociada con su diagnosis específica apareció en 1754 en la quinta edición de "Genera Plantarum", donde Vinca minor L. es el lectotipo aceptado del género (Stearn, 1966).

También esta especie recibe diferentes nombres de acuerdo al lugar donde se cultiva, entre estos tenemos: Vinca, Vicaria, Magdalena, pervinca, Teresita, Maravilla, etc. Además ha recibido los siguientes nombres científicos: Vinca rosea, Lochnera rosea, Catharanthus roseus y Ammocallis rosea. Ya que esta planta recibía tantos nombres científicos Stearn en 1966 realizó una investigación para determinar cual era el nombre científico correcto y encontró que desde 1920 los botánicos convinieron, para la flora de las apocinaceas de las Indias Occidentales, que el nombre más comúnmente usado era el de Catharanthus roseus L. G. (Don), usado por varios autores, antes de que Pichon lo tomara en 1948 y Stearn en 1956.

El primero en reconocer que Vinca rosea L. difería en muchos caracteres de la Vinca propiamente dicha y que de-

bía ser puesta en un género aparte fue Ludwig Reichenbach, quien en 1828, le propuso el nombre genérico de Lochnera. Pichon en 1948, enlistó 34 diferencias entre Lochnera y Vinca. Por esta razón en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica el género correcto es Catharanthus y no Lochnera.

Pichon (1951) en Farnsworth, 1961; la clasifica como sigue;

Familia: Apocinaceae

Subfamilia: Plumeriodeae

Tribu: Alsotonieae

Subtribu: Catharanthus G. Don.

Sección: Lochnera (Reichb. f.) Pich.

Género y Especie: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

1.11.2. Descripción botánica:

Es una planta subarborescente de 40 a 80 cm de alto, de rápido crecimiento, leñosa en su base, con ramas erectas, hojas simples, enteras, sin estípulas, opuestas, siempre verdes, coriáceas, mucronadas y obtusas, de 3 a 5 cm de largo por 1.5 a 5 cm de ancho, su peciolo bidentado o biestipulado en su base; flores axilares, solitarias o en pares, sésiles, actinomorfas, hermafroditas, de color rosa o blancas, pálidas por el envejecimiento y con el centro rojo o púrpura oscuro, aunque hay variedades sin este punto rojo (Sanchez, 1979).

Caliz de cinco divisiones y sus segmentos ciliados, corola gamopétala, pentalobulada, de perfloración contorneada, cinco estambres insertos en el tubo de la corola, con los filamentos cortos y las anteras alargadas, aproximadamente en cono, ovario súpero bicarpelar, bilocular, con placentas axilares, estilo indiviso, estigma aneho y grueso, muchos óvulos en cada división.

Los fólículos o vainas tienen de 2.5 a 4 cm de largo (sin embargo, en el laboratorio se han encontrado de 0.5 a 6 cm de largo) y de 2 a 3 mm de diámetro y contienen de 15 a 20 semillas cada una con un tegumento delgado de color negro. Hay que aclarar que la medida de las vainas puede variar de acuerdo a los nutrientes y a las condiciones ambientales, es decir mucha humedad, temperatura, etc; en que se encuentre la planta (Sánchez, 1979; Waizel, 1979 y Castillo, 1984).

Este género presenta seis especies incluyéndose Catharanthus roseus; estas especies son: Catharanthus roseus, C. lanceus, C. trichophyllus, C. longifolius, C. pusillus, C. scitulus (Farnsworth, 1961). En la figura 2 se observa a Catharanthus roseus.

1.11.3. Distribución geográfica:

Con la excepción de C. pusillus, una especie de la India, todas las especies de Catharanthus son endémicas de Madagascar. C. roseus fue introducida a París y luego a

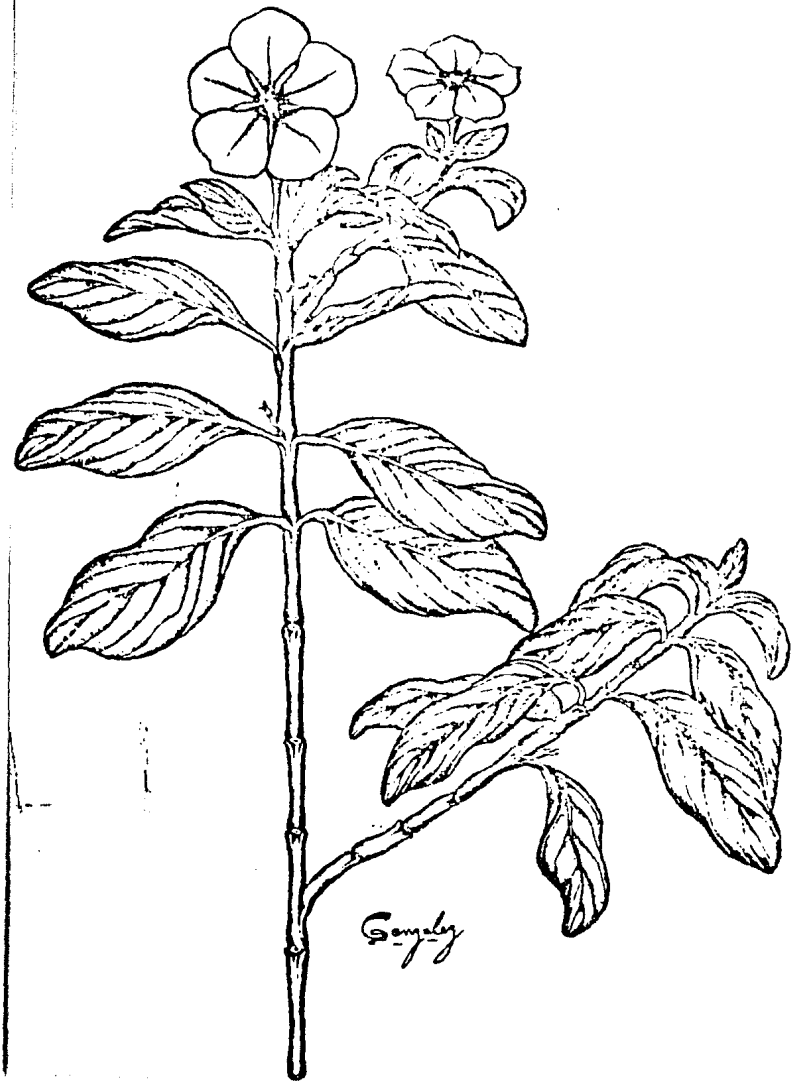


Figura 2

En esta figura se muestra a la planta Catharanthus roseus que pertenece a la familia de las Apocinaceas, ver clasificación (en el punto 1.11.1.) y descripción botánica (en el punto 1.11.2.)

los jardines botánicos europeos dentro de los trópicos como una planta ornamental y ha llegado a ser actualmente una planta pantropical.

Se dispersó por cultivo a la India, Indochina, Indonesia, Las Filipinas, Australia, Sud-Africa y el Oriente, America, Las Indias Occidentales, Europa y aún Rusia (Taylor y Farnsworth, 1975).

En México se encuentra en las zonas tropicales de Jalisco, Yucatán, Puebla, Veracruz y Oaxaca. Se ha visto desarrollándose en los estados de Michoacán, Guerrero, Morelos, Campeche, Tabasco, Querétaro, Quintana Roo y Baja California cultivadas para ornato.

Es apreciada por sus bellas flores durante todo el año, razón por la cual le llaman "Maravilla" en donde es cultivada (Taylor y Farnsworth, 1975).

No se conoce la fecha exacta de introducción a nuestro país. Se le menciona por Sesse y Mociño como cultivada en Orizaba, Veracruz y Jalisco desde el año de 1894 (Waizel, 1979).

1.11.4. Datos adicionales:

Esta especie crece en el trópico, cálido-húmedo y también puede crecer fuera de éste (Waizel, 1979).

En cuanto a enfermedades no se ha observado ninguna, como ataque de hongos u otros microorganismos, en las que se encuentran cultivadas en Quintana Roo se ha observado

un pulgón en la hoja (Castillo, 1984) y en el invernadero se han observado hormigas en las raíces de las plantas pero jamás se ha observado que se coman éstas o a las hojas. No se ha encontrado en la literatura que relación tengan las hormigas con esta planta.

El número cromosómico de C. roseus es 16 (2n) pero se ha observado este 2n de 32 cuando a la planta se le agrega colchicina, es decir son tetraploides (Taylor y Farnsworth, 1975).

1.11.5. Utilidad de la especie:

Es empleada contra diversas enfermedades en varios países por ejemplo en El Salvador, Cuba y Filipinas las hojas se utilizan para las afecciones de la garganta y ojos. En Filipinas también las raíces se utilizan como agente abortivo. En Vietnam las hojas, raíces y planta completa se utilizan para las evacuaciones intestinales. En Madagascar las raíces y plantas completas se utilizan como laxante y también para el dolor dental la raíz. En Sudáfrica la raíz y las hojas las ocupan para la menstruación excesiva, etc (Farnsworth, 1961).

La planta C. roseus contiene al menos 130 alcaloides (Taylor y Farnsworth, 1975; Carew, 1975) de los cuales dos, vincristina y vincleucoblastina, destacan por ser empleados con éxito, desde 1963, en el tratamiento de la leucemia y de otros cánceres humanos. Estas sustancias

se presentan en muy pequeñas cantidades del orden de 0.00025 %, por lo que se requiere grandes cantidades de plantas para la producción del medicamento, por ejemplo, para obtener un gramo de vincristina, se necesitan 500 kilos de hojas secas de C. roseus (Waizel, 1979).

En México esta planta es empleada como ornamental y también contra el cáncer sólo que el producto terminado es muy caro.

Una solución para producir estos alcaloides sería en contrar una línea celular en cultivo de tejidos vegetales que los contenga a ambos o por lo menos a uno de ellos. En estudios que hasta ahora se han hecho en producción de alcaloides por medio de cultivo de tejidos con esta planta no se ha producido ninguno de éstos y en dichos estudios han utilizado como inóculo tallo, no ja y pared de antera, pero en ninguno de ellos han espe cificado bien el método de trabajo para obtener una sim ple inducción de dichos cultivos, por esta razón se tuvo que iniciar el trabajo para primero inducir a la for mación de callo y posteriormente obtener la línea celular (Carew, 1962, 1964, 1966 y 1978; Wolfgang et al, 1980; Kurz et al, 1981; Constabel et al, 1981).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Elaboración del medio:

En un matraz con agua destilada en agitación se agregaron las soluciones que se muestran en el apéndice tres. Posteriormente en otro matraz con agua en agitación se agregaron los fitorreguladores (ya sea para propagación, embriones inmaduros o anteras) llevándolos a éstos a un pH ácido (de 3 ó 4). Después los fitorreguladores se mezclaron con las soluciones y se ajustaron a un pH de 5.6. En seguida se agregó la sacarosa y se aforó. Previamente

se lavó el agar, ya que se ha observado que cuando éste no es puro puede haber problemas en el crecimiento de los callos o bien no crecer. Por esta razón el agar se debe lavar hasta que tome un color blanco. Cuando el agar ya está lavado se mezcló con la solución antes mencionada y se fundió a una temperatura de 60 °C.

Posteriormente se vació entubos y/o frascos, llenando los primeros a 8 ml y los segundos a 20 ml. Ambos se taparon con papel aluminio, solo que los frascos se cerraron con ligas y por último se esterilizan en autoclave a 125 °C durante 15 minutos.

Cada mes se tuvieron que hacer soluciones nuevas (ver apéndice dos) para evitar que haya precipitaciones y contaminaciones en los medios.

Todo el material que sobraba de la resiembra es decir tubos contaminados, pinzas, frascos (con capacidad de 100 ml) y agua destilada, etc, debían ser esterilizados para evitar contaminaciones posteriores.

2.2. Material biológico:

Planta:

Las semillas de ésta fueron obtenidas en Lone star seed Co. San Antonio Texas, se germinaron en tierra y contaban con un año de edad cuando se trabajó con ellas. Fueron crecidas en el invernadero con luz natural a una

temperatura en el día de 40 °C y en la noche de 15 °C.

Propagación:

Las hojas que se escogieron fueron de diferentes tamaños, clasificándolas en tres grupos, chicas (0.8 cm - 1.0 cm), medianas (1.1 cm - 2.0 cm) y grandes (2.2 cm - 3.0 cm). Además tenían que presentar un color verde y preferentemente se escogían de las partes superiores de las plantas, las cuales están menos sucias. Se hizo un experimento previo de estos tres grupos de plantas y el mejor resultado que se obtuvo fue en las medianas.

Embriones inmaduros:

Las vainas se eligieron de diferentes tamaños observándose que no se llegara a tomar las semillas ya maduras que se distinguen por tener color negro. En general también se clasificaron por su tamaño en tres grupos: las chicas (0.5 a 0.9 cm), las medianas (1.0 a 4.0 cm) y grandes (4.0 a 6.0 cm). Se seleccionó el primer rango de esa manera ya que en 0.5 cm se podían apenas apreciar los embriones con ayuda del microscopio de disección.

Anteras:

Las yemas florales que se escogieron median desde 1 a 5

mm.

En los dos experimentos se midieron éstas, procurando que hubiera un número considerable de cada una de ellas. Se hizo un experimento previo de esas medidas dando mejores resultados en la medida de 2 a 3 mm que fue la que se utilizó,

2.3. Propagación:

El medio de cultivo que se utilizó fue el de Murashige-Skoog modificado, ver apéndice 1, y complementado con las concentraciones de fitorreguladores que se muestran en el siguiente cuadro más 8 g/l de agar y 30 g/l de sacarosa.

		AIA (mg/l)		
		10	1	0.1
BAP (mg/l)	10			
	1			
	0.1			

La esterilización de las hojas fue de la siguiente manera;

- 1.- Se lavaron las hojas perfectamente con Extrán al 5 %, ayudándose de un cepillo.
- 2.- Se pusieron en agitación con Extrán al 5 % durante 10 minutos.
- 3.- Se enjuagaron con agua destilada durante 2 minutos.
- 4.- Después se pusieron en etanol al 70 % durante 5 minutos.
- 5.- Las hojas se pusieron enteras en hipoclorito de sodio en agua en una relación 3:1 durante 10 minutos.
- 6.- Se llevaron a la campana de flujo laminar a enjuagar con agua destilada estéril y a cortarse por la nervadura cada hoja con un bisturí estéril apoyándose en una caja de Petri.
- 7.- Las hojas se colocaron en un matraz quitasato de 250 ml con hipoclorito de sodio en agua en una relación 3:1, se mantuvieron en agitación durante 10 minutos y bajo vacío.
- 8.- Posteriormente se llevaron a la campana, se vaciaron en un embudo cubierto con una gasa estéril para enjuagarse con agua destilada y posteriormente se sembraron en los diferentes medios anteriormente descritos.
- 9.- Todos los cultivos se pusieron en el cuarto de cultivo a una temperatura de 25-30 °C y luz continua.

2.4. Embriones inmaduros:

Las vainas se esterilizaron de la siguiente manera:

- 1.- Se lavaron las vainas seleccionadas con cepillo y Extrán al 5 %.
- 2.- Se lavaron en agitación con Extrán al 5 % durante 15 minutos.
- 3.- Se enjuagaron con agua destilada durante un minuto.
- 4.- Se pusieron en agitación en etanol al 70 % durante 2 minutos.
- 5.- Posteriormente se pasaron a hipoclorito de sodio agua en una relación de 3:1 durante 20 minutos.
- 6.- Se lavaron en la campana las vainas y se disectaron con el microscopio de disección para después sembrarse.

El medio de cultivo-que se utilizó fue el de Murashige-Skoog 1962 (medio M-5), modificado y suplementado con 1 ppm de 2,4-D con 0.1 ppm de K.

Se gelificó con agar a 8 g/l y 30 g/l de sacarosa.

Una mitad de los embriones sembrados se colocaron en luz continua y la otra en la oscuridad a una temperatura de 25 °C.

2.5. Anteras:

Pretratamiento: antes de que se sembraran las anteras, las yemas florales se trataron con frío a 4 °C en la oscuridad durante 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 y 13 días (primer experimento).

En el segundo experimento también las yemas florales

antes se trataron con frío a 4 °C en oscuridad los días que se mencionaron anteriormente pero después de cada día se pusieron en luz continúa durante 16 h a 25 °C (Zapata, 1981).

Esterilización de las yemas florales: Las yemas florales se cortaron de las plantas que estaban en el invernadero, se pretrataron como se menciona anteriormente y para el primer experimento se lavaron como sigue:

- 1.- Extrán al 5 % durante 5 minutos.
- 2.- Posteriormente se enjuagaron en agua destilada durante 2 minutos.
- 3.- Se pasaron a etanol al 70 % durante 2 minutos.
- 4.- Y por último se pusieron en hipoclorito de sodio en agua en una relación de 3:1 durante 17 minutos.

En este experimento se hizo una repetición de los mejores días que dieron callo. Estos días fueron 1,5,6,7,8, 11 y 12. En este caso la esterilización se cambió porque en el primer experimento hubo contaminados.

- 1.- Se pusieron en Extrán al 5 % durante 10 minutos.
- 2.- Se enjuagaron con agua destilada durante 2 minutos.
- 3.- Después se pasaron a etanol al 70 % durante 5 minutos.
- 4.- Y finalmente en hipoclorito de calcio al 6 % durante 17 minutos.

El procedimiento anterior se utilizó en el segundo experimento con el pretratamiento antes mencionado y se hizo repetición de todos los días.

Medio de cultivo: El medio de cultivo que se utilizó

fue el M-S modificado y suplementado con 1 ppm de 2,4-D más 1 ppm de K y 20 g/l de sacarosa. Se gelificó con 8g/l de agar.

C A P I T U L O I I I

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

3.1. Propagación:

Se observa en el cuadro uno que en la concentración de 1 ppm de ácido indol acético (AIA) con 10 ppm de Bencil amino purina (BAP o BA) fue con la que se obtuvo un mayor porcentaje de hojas que se mantuvieron completamente verdes (94.7 %); en la concentración de 1 ppm de AIA con 1 ppm de BAP se obtuvo un porcentaje de 57.6 y en la concentración de 1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP del 46.7 %. Observándose estos resultados después de 2 meses de haber -

los puesto en el medio de inducción.

En cuanto a las hojas con partes verdes la concentración que tuvo mayor porcentaje fue la de 0.1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP con un valor de 66.7; posteriormente la concentración de 10 ppm de BAP con 10 ppm de AIA tuvo un 60 % y 1 ppm de BAP con 0.1 ppm de AIA obtuvo un valor de 59.3 %.

Observamos que los porcentajes de la columna de hojas completamente verdes son totalmente diferentes a las de hojas con partes verdes.

Suponemos que las hojas que están completamente verdes no se están diferenciando y por lo tanto pueden dar brotes, sin pasar por callo, mientras que las otras (hojas con partes verdes) se están desdiferenciando para dar callo.

En el cuadro 2 observamos que la concentración que presenta mayor porcentaje (53.3 %) de hojas completamente verdes fue la de 1 ppm de AIA con 1 ppm de BAP, en segundo término se encuentra la concentración de 10 ppm BAP con 10 ppm de AIA con un valor de 31 % y en tercer lugar 1 ppm de BAP con 10 ppm de AIA con un valor de 9.7 %.

Comparando los dos cuadros que se mencionan anteriormente, observamos que la única concentración que mantuvo las hojas completamente verdes fue la de 1 ppm de AIA con 1 ppm de BAP, mientras que las dos concentraciones, 1 ppm de AIA con 10 ppm de BAP y 1 ppm de AIA con 0.1

ppm de BAP, ya no presentan hojas completamente verdes. En cambio, en la concentración de 1 ppm de BAP con 10 de AIA se pueden obtener algunas hojas completamente verdes mientras que en el cuadro 1 no aparecían éstas. También observamos que en la concentración de 10 ppm de BAP con 10 ppm de AIA aumenta el porcentaje de hojas completamente verdes a 31.

En las hojas con partes verdes observamos que en las concentraciones de 10 ppm de BAP con 1 ppm de AIA y 1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP hay un 100 %, la concentración de 0.1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP tiene un valor de 92.8 % y la concentración de 1 ppm de BAP con 0.1 ppm de AIA que tiene un valor de 57.6 %.

Comparando estos resultados con el cuadro uno de hojas con partes verdes, se observa que aumenta el porcentaje de la concentración de 0.1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP, en la concentración de 10 ppm de BAP con 10 ppm de AIA disminuye a un porcentaje de 20.6 y la concentración de 1 ppm de BAP con 0.1 ppm de AIA también disminuye a 57.6 %.

De las observaciones anteriores se puede concluir tentativamente que el medio que mantiene mejor las hojas completamente verdes es 1 ppm de AIA con 1 ppm de BAP.

En el cuadro 3 la concentración que presenta mayor porcentaje de callos verdes es la de 1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP (100 %), en segundo lugar está la concentración de 0.1 ppm de BAP con 0.1 ppm de AIA (92.3 %) y en

tercer lugar está la concentración de 0.1 ppm de AIA con 1 ppm de BAP (56 %).

Observamos en el cuadro 4 que la concentración con que se obtuvo mayor porcentaje de callos verdes es la de 1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP con 54.5 %, con la concentración de 10 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP se obtuvo un 50 % y con la concentración de 10 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA tiene un valor de 42.8 %.

Comparando estos resultados con el cuadro tres, observamos que la concentración de 1 ppm de AIA y 0.1 ppm de BAP el porcentaje disminuye, pero aun así tiene un considerable porcentaje en comparación a los otros. La concentración de 0.1 ppm de AIA y 0.1 ppm de BAP disminuye a un 23 % y la concentración de 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA disminuye a un 37.5 %.

En ninguno de los resultados anteriores se obtuvieron brotes, sin embargo, se puede sugerir que las concentraciones con mejores resultados para inducción de callos verdes son las siguientes: 1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP, 10 ppm de AIA más 0.1 ppm de BAP y 10 ppm de BAP con 0.1 ppm de AIA.

Posiblemente no se obtuvo brote ya que tal vez se necesitaba otro barrido de concentraciones de fitorreguladores y haberlos resembrado en intervalos de tiempo más cortos.

Las hojas que dieron mejores resultados para la obtención de callo verde fueron las medianas de 1.1 - 2.0 (ver

materiales y método) cm de largo. Las que tenían mayor tamaño se contaminaban más fácilmente y las de tamaño pequeño no daban callo o se ponían completamente transparentes.

Hay que aclarar que en todos los cuadros anteriores no se tomaron en cuenta los tubos que estaban contaminados.

3.2. Embriones inmaduros:

Los embriones sembrados en el tratamiento de luz dieron un valor del 25 % de callo, como se puede observar en el cuadro 5, hay que aclarar que este porcentaje es parcial ya que no se contaron todos los embriones dise-cutados por ser muy numerosos y muy pequeños, si no que se tomó como el 100 % el número de embriones sembrados en frascos.

En este caso se sembró en 1 ppm de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) con 0.1 ppm de cinetina (K) (medio de inducción), ya que este medio fue el que dio mejores resultados utilizando hojas y se quiso probar esta concentración con los embriones inmaduros.

En el tratamiento en la oscuridad se obtuvo un 50 % de callo en el rango de 1.1 - 2.0 cm (medianas) observándose un mejor crecimiento.

Comparando los resultados en oscuridad y en luz, los callos de oscuridad eran más grandes y más suaves que

los de luz.

Después de dos meses los callos se pasaron al medio de 0.25 ppm de ácido naftalén acético (ANA) con 0.25 ppm de 2,4-D, ya que había dado un buen resultado en hojas como medio de mantenimiento después de dos meses a partir de la siembra, datos previos en el laboratorio, y se empezaron a pesar los callos de embriones. Se obtuvieron las siguientes gráficas de porcentaje de incremento de peso fresco contra tiempo.

Gráfica 1:

Lo que se observa en la gráfica 1 parte A (meses-M) es que en el primer mes hay un incremento considerable del peso fresco del orden de 560 %, en los otros dos meses se observa que va descendiendo lo que significa que el cultivo se está estabilizando. En la parte B (días-d) se observa que el cultivo se encuentra en crecimiento en fase lineal (aunque parece ser que el último punto indica que se está estabilizando).

Sin embargo, en la gráfica B se necesita el último dato para ver si sigue creciendo o no ya que el último punto se ve que se sale un poco de esa línea de crecimiento, solo que éste no se pudo sacar porque se contaminó el cultivo.

Tal vez no hubo crecimiento de los embriones contenidos en las vainas grandes (4.0 - 6.0 cm) y chicas (0.5 -

0.9 cm) por que pudo habérseles dañado en la disección o bien por su variabilidad genética, o también por el efecto de los fitorreguladores. Los mejores resultados se dieron en las vainas medianas (1.0 - 4.0 cm de largo).

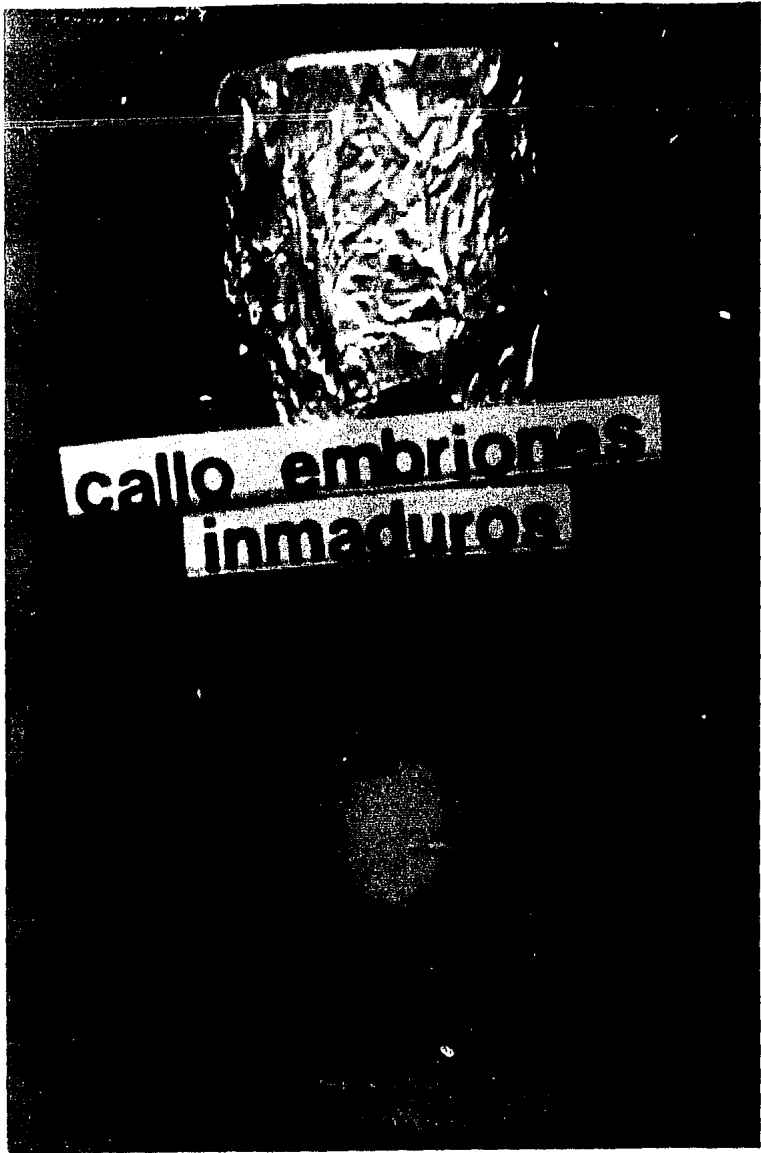
Obsérvese la fotografía uno en donde se muestra un callo de embriones inmaduros del tratamiento de oscuridad.

3.3 Anteras:

En el cuadro 6 se muestran los resultados del pretratamiento de frío utilizado por Sunderland (et al, 1984) y los días de tratamiento junto con el medio que utilizó Zapata (1981).

En el cuadro 6 se observa que los tiempos que dieron mejores resultados fueron 1, 6, 7 y 11 días, mostrándose el mayor porcentaje de obtención de callos en el día 11, 64.3 %. Si vemos la columna de promedio en gramos, se tiene que hay buena inducción de callo de 0.05 a 0.06, mientras que en el día 7 tenemos que hay buen porcentaje de callo pero poco promedio de peso, ya que hubo mayor número de contaminados en ese día y en el día 6 ocurre lo contrario.

En cuanto a los explantes que no formaron callo; pudo ser por que los individuos presentan una variabilidad genética intrínseca y no necesariamente producen callo en esas condiciones o bien a causa del tratamiento en frío.



Fotografía 1

En ésta se observa un callo de embriones inmaduros con tratamiento en oscuridad a una temperatura de 25 C. El explante pertenece al rango de 1.0 a 4.0 cm (medianas). Se encuentra en medio M-S modificado y suplementado con 0.25 ANA más 0.25 de 2,4-D (ppm).

sin embargo, se desecha esa posibilidad ya que los explantes en el tratamiento 1 y 5 si presentan callo, mientras que, en los días 2 al 4 no se presenta nada, si hubiera sido el tratamiento no hubieran dado los demás días (en este caso el 5, 6 y 7), lo mismo ocurre con los explantes en los tratamientos 8 y 9. Lo que se esperaría sería obtener inducción de callo en todos los cultivos, hasta el día 12, por que es claro que el día 13 si está afectado por el tratamiento, ya que se realizó la repetición del experimento 2 veces (en éstas si dieron los explantes en los tratamientos 2, 3, 4 y 8 días) y se aumentaron siete días más al tratamiento (20) y no se obtuvo callo en los días del 13 en adelante.

El medio que se utilizó para la inducción fue el de 1 ppm de 2,4-D con 1 ppm de K con pretratamiento de 4 °C en oscuridad.

En las siguientes gráficas observaremos los resultados del tratamiento de oscuridad.

Gráfica 2:

En ésta se muestra el tratamiento de seis días a 4 °C en oscuridad (A₆). En la parte A (meses-M) se observa que en el primer mes hay un incremento de peso fresco del 609 % aproximadamente, esto indica que se desarrolló rápidamente a partir de un tamaño tan pequeño como el de las anteras ensayadas y en los otros tres meses se comien

za a ver que el crecimiento del mismo se empieza a esta
bilizar.

En la parte B observamos que el crecimiento está en fase líneal, es decir, que los callos están desarrollándo normalmente, están creciendo.

Gráfica 3:

En cuanto a los resultados de ésta (que pertenece al tratamiento 7), es decir 7 días a 4 °C en oscuridad, se observa en la parte A que en el primer mes hay un valor de porcentaje de peso fresco de 295 y en los otros 3 me
ses se estabiliza el crecimiento del callo. En la parte B se observa que el callo está creciendo en una fase líneal.

Comparando estas dos gráficas observamos que la inducción es mucho mayor en la gráfica 2 que en la 3, sin embargo en la parte B se observa que estos dos cultivos con tratamiento diferente están creciendo.

Gráfica 4:

Tenemos que en ésta se representa al tratamiento con un día a 4 °C en oscuridad y que pertenece a la repeti
ción de los mejores días con ese tratamiento. En la parte A se observa que el porcentaje de peso fresco fue del 309 en el primer mes y en los tres meses siguientes se

observa que el crecimiento del callo se esta estabilizando. En la parte B (días-d) se ve claramente que los callos están en la fase líneal de su curva de crecimiento.

Comparando estos resultados con la gráfica tres parte A es mayor este porcentaje en la parte A de la gráfica 4 y con la gráfica dos parte A, el resultado es mayor en ésta que en la gráfica 4 parte A. En cuanto al crecimiento en las tres gráficas parte B están en fase líneal.

Los resultados en el cuadro 7 muestran las respuestas al mismo medio con el mismo pretratamiento, sólo que después de éste se pusieron las anteras en 16 h continuas de luz después de cada día.

Se observa en este cuadro que los explantes que presentan callo son los pretratados con 1 a 3 días observándose un buen promedio en peso de 0.05 a 0.06 g esto quiere decir que cualquiera de estos tres días en esas condiciones nos dará buena inducción de callo. Mientras que en los días 4 al 13 no se obtuvo nada, aquí queda bien claro que el tratamiento es el que esta afectando a los individuos.

Se repitió este experimento dos veces y se obtuvieron los mismos resultados.

A los dos meses de sembrados se hizo la primera pesada y después cada mes.

Estos resultados se observan en las siguientes gráficas:

Gráfica 5:

En ésta se muestran los tratamientos A₁, A₂, A₃ (los subíndices se refieren al día del tratamiento) con 4 °C en oscuridad con 16 h continuas de luz. En la parte A se obtuvo un porcentaje de 300 de incremento de peso fresco y en el segundo mes se está estabilizando. En la parte B se observa que hay crecimiento.

Gráfica 6:

En ésta se presenta la repetición de los tratamientos A₁, A₂ y A₃ con 4 °C en oscuridad con 16 h continuas de luz. En la parte A se ve que en el primer mes el porcentaje de peso fresco fue menor que en el segundo que alcanzó un valor de 370, esto quiere decir que está creciendo en este mes más rápido, en el tercer mes se observa que se está estabilizando. En la parte B se ve que tiene un crecimiento en fase líneal.

Comparando esta gráfica con las demás es la única que ha tenido crecimiento mayor en el segundo mes.

Hay que aclarar que todos los cultivos fueron inducidos primero en frascos (2 meses) y después fueron pasados a tubo para que no se contaminaran y se pesaran más

fácilmente, excepto los de la gráfica que se indujeron en tubo desde el principio.

Se observa que en todos los datos, los tratamientos A₁, A₂ y A₃ con 4 °C de oscuridad o bien 4 °C en la oscuridad con 16 h continuas de luz dan buenos resultados para la obtención de callos. Solamente una vez produjeron callo los explantes de tratamiento 5, 10, 11 y 12 (primera vez), en las repeticiones no se obtuvo nada. En el tratamiento de 4 °C en la oscuridad con 16 h continuas de luz desde el día 4 al 13 no se obtuvo nada en la primera vez ni en las dos repeticiones.

Las yemas florales que dieron callos fueron las de 2 - 3 mm de largo (ver materiales y método).

Gráfica 7:

Se muestra la curva de crecimiento en donde se observa que hay un crecimiento continuo hasta los 32 días. En ésta se presenta al inicio una fase lag en donde el callo se está estableciendo en el medio (2-8 días), después empieza a crecer (del día 8 al 32) y esto indica que esta planta presenta un crecimiento más prolongado si se compara con la curva teórica que se muestra en los antecedentes.

En la fotografía dos se observa el callo de anteras con pretratamiento a 4 °C de oscuridad.



Fotografía 2

Se observa un callo de anteras con tratamiento en oscuridad a 4 °C. El explante pertenece al rango de 2 a 3 mm en medio M-S modificado y suplementado con 1 ppm de 2,4-D más 1 ppm de K a una temperatura de -25 °C.

C U A D R O 1

BARRIDO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITORREGULADORES EN HOJA DE CATHARANTHUS ROSEUS PARA PROPAGACION DESPUES DE DOS MESES DE CULTIVADO A UNA TEMPERATURA DE 25 a 30 °C EN MEDIO M-S MODIFICADO.

CONC. FITORREGULADORES (ppm).	HOJAS COMPLETAMENTE VERDES %	HOJAS CON PARTES VERDES %	N TUBOS
1 AIA - 1 BAP	57.6	0	33
10 BAP - 10 AIA	13.6	60	30
1 BAP - 10 AIA	0	32.3	31
1 BAP - 0.1 AIA	11.1	59.3	27
10 BAP - 0.1 AIA	0	57.1	21
10 AIA - 0.1 BAP	0	25.8	31
1 AIA - 0.1 BAP	46.7	0	15
0.1 AIA - 0.1 BAP	26.7	66.7	15
1 AIA - 10 BAP	94.7	0	19

C U A D R O 2

BARRIDO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITORREGU
LADORES EN HOJA DE CATHARANTHUS ROSEUS PARA PROPAGA-
CION DESPUES DE UN MES DE LA PRIMERA OBSERVACION A UNA
TEMPERATURA DE 25 a 30 °C EN MEDIO M-S MODIFICADO.

CONC. FITORREGU LADORES (ppm). ⁻	HOJAS COMPLETA MENTE VERDES -- %	HOJAS CON PAR TES VERDES -- %	N TUBOS
1 AIA - 1 BAP	53.3	0	30
10 BAP - 10 AIA	31.0	20.6	29
1 BAP - 10 AIA	9.7	22.0	31
1 BAP - 0.1 AIA	7.7	57.6	26
10 BAP - 0.1 AIA	0	55.0	20
10 AIA - 0.1 BAP	0	7.6	28
1 AIA - 0.1 BAP	0	100.0	13
0.1 AIA - 0.1 BAP	0	92.8	14
1 AIA - 10 BAP	0	100.0	17

C U A D R O 3

BARRIDO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITORREGULADORES EN HOJA DE CATHARANTHUS ROSEUS PARA PROPAGACION DESPUES DE UN MES DE LA SEGUNDA OBSERVACION A UNA TEMPERATURA DE 25 a 30 °C EN MEDIO M-S MODIFICADO.

CONC. FITORREGULADORES (ppm).	CALLOS VERDES %	CALLOS CAFE CON BLANCO %	N TUBOS
1 AIA - 1 BAP	0	66.7	30
10 BAP - 10 AIA	20.8	20.8	24
1 BAP - 10 AIA	11.1	0	36
1 BAP - 0.1 AIA	56.0	4	25
10 BAP - 0.1 AIA	10.5	15.8	19
10 AIA - 0.1 BAP	23.0	0	26
1 AIA - 0.1 BAP	100.0	0	12
0.1 AIA - 0.1 BAP	92.3	0	13
1 AIA - 10 BAP	17.6	82.3	17

C U A D R O 4.

BARRIDO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITORREGU
LADORES EN HOJA DE CATHARANTHUS ROSEUS PARA PROPAGA-
CION DESPUES DE UN MES DE LA TERCERA OBSERVACION A UNA
TEMPERATURA DE 25 a 30 °C EN MEDIO M-S MODIFICADO.

CONC. FITORREGU LADORES (ppm).	CALLOS VERDES %	CALLOS CAFE CON BLANCO %	N TUBOS
1 AIA - 1 BAP	14.3	35.7	7
10 BAP - 10 AIA	12.5	85.5	8
1 BAP - 10 AIA	0	100.0	6
1 BAP - 0.1 AIA	37.5	62.5	8
10 BAP - 0.1 AIA	42.8	57.1	7
10 AIA - 0.1 BAP	50.0	50.0	6
1 AIA - 0.1 BAP	54.5	45.4	11
0.1 AIA - 0.1 BAP	23.0	76.9	13
1 AIA - 10 BAP	0	100.0	13

C U A D R O 5

TRATAMIENTO DE LUZ Y OSCURIDAD DE EMBRIONES INMADUROS DE CATHARANTHUS ROSEUS DE DOS MESES DE CULTIVADO A UNA TEMPERATURA DE 25 °C EN MEDIO M-S MODIFICADO Y SUPLEMENTADO CON 0.25 ppm DE ANA Y 0.25 ppm de 2,4-D.

TRATAMIENTO	VAINAS CHICAS (0.5 - 0.9cm)	VAINAS MEDIANAS (1.0 - 4.0 cm)	VAINAS GRANDES (4.0 - 6.0 cm)
OSCURIDAD	0	50 % DE CALLO	0
LUZ	0	25 % DE CALLO	0

C U A D R O 6

PRETRATAMIENTO DE ANTERAS DE CATHARANTHUS ROSEUS A 4 °C EN OSCURIDAD DESPUES DE DOS MESES DE CULTIVADAS A UNA TEMPERATURA DE 25 °C EN MEDIO M-S MODIFICADO Y SUPLEMENTADO CON 1 ppm DE 2,4-D MAS 1 ppm DE K.

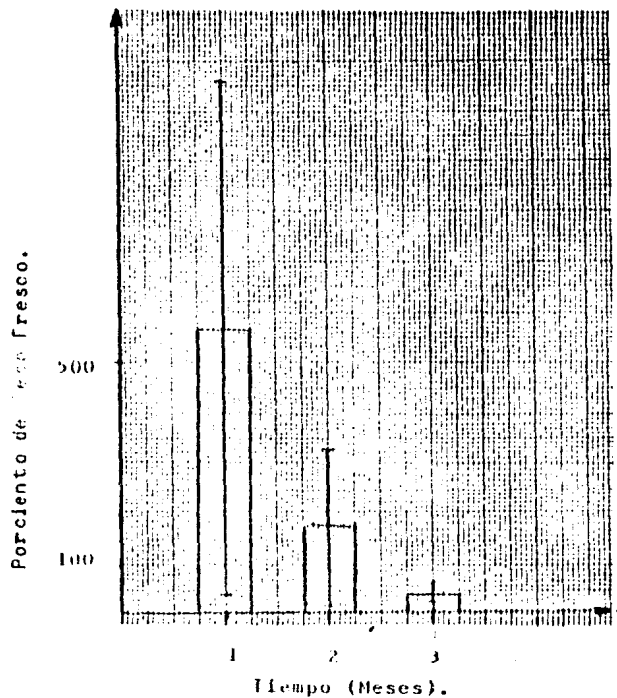
TIEMPO (DIAS)	% CALLOS	X (g)
1	60	0.06
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	27.3	0.02
6	30.7	0.06
7	63.6	0.03
8	0	0
9	0	0
10	15.4	0.02
11	64.3	0.05
12	26.7	0.02
13	0	0

C U A D R O 7

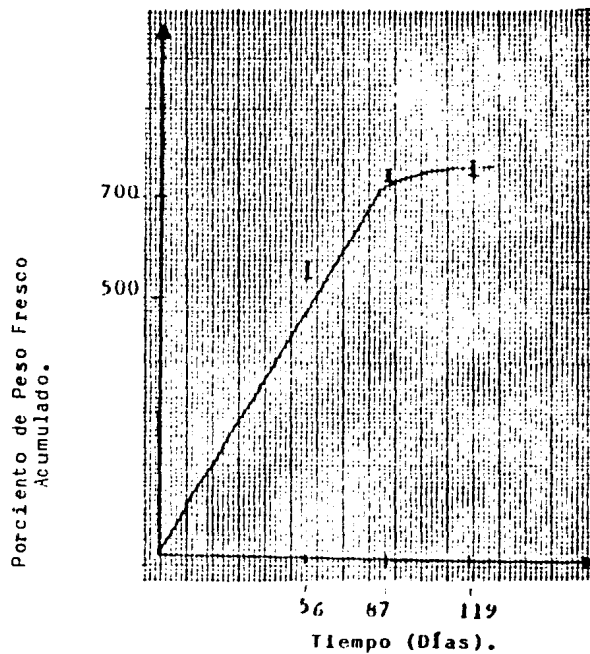
PRETRATAMIENTO DE ANTERAS DE CATHARANTHUS ROSEUS A 4 °C EN OSCURIDAD SEGUIDO DE 16 HORAS CONTINUAS DE LUZ DESPUES DE DOS MESES DE CULTIVADAS EN MEDIO M-S MODIFICADO Y SUPLEMENTADO CON 1 ppm DE 2,4-D MAS 1 ppm DE K.

TIEMPO (DIAS)	% CALLOS	X (g)
1	80	0.05
2	40	0:06
3	15	0.05
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

GRAFICA 1 A

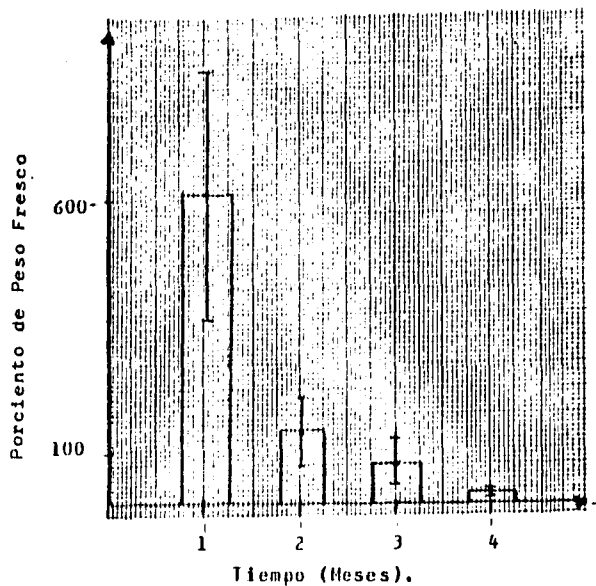


GRAFICA 1 B

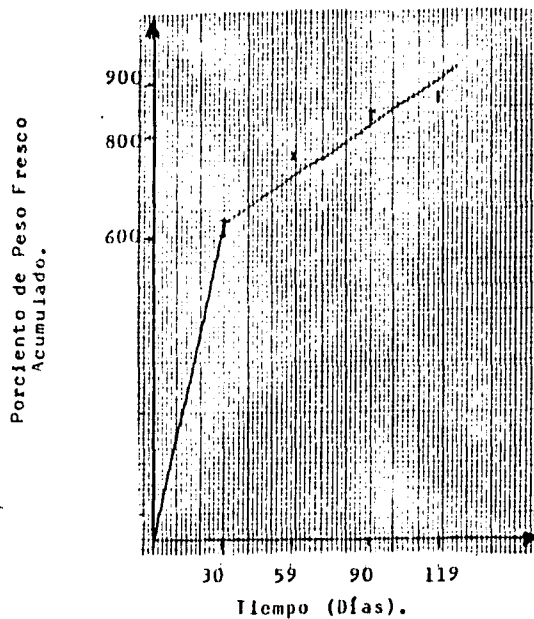


GRAFICA 1: Se presenta en esta gráfica el polígono de frecuencias de embriones inmaduros dado en porcentaje de peso fresco contra tiempo en meses (parte A) y el tiempo en días (parte B).

GRAFICA 2 A (A₆).

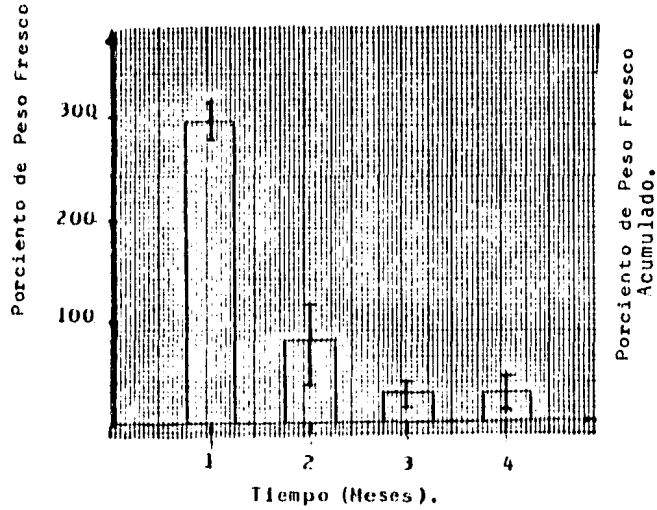


GRAFICA 2 B (A₆).

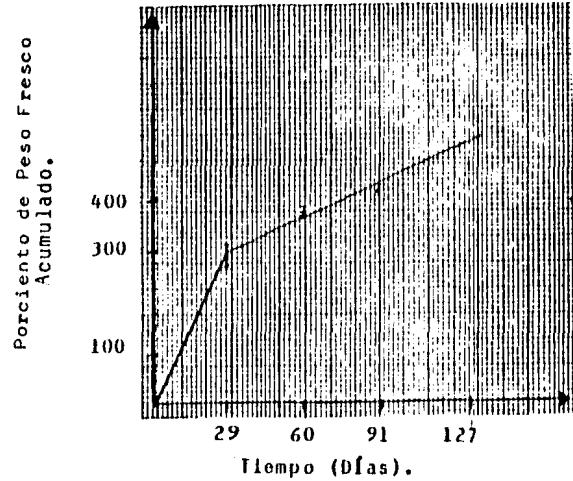


GRAFICA 2: En esta gráfica se presenta el tratamiento en el día 6 de anteras en 4 °C en oscuridad (en la parte A) y en la parte B el crecimiento acumulado con el mismo tratamiento. Las gráficas están dadas en porcentaje de peso fresco contra tiempo, en meses (A) y en días (B).

GRAFICA 3 A (A₇).



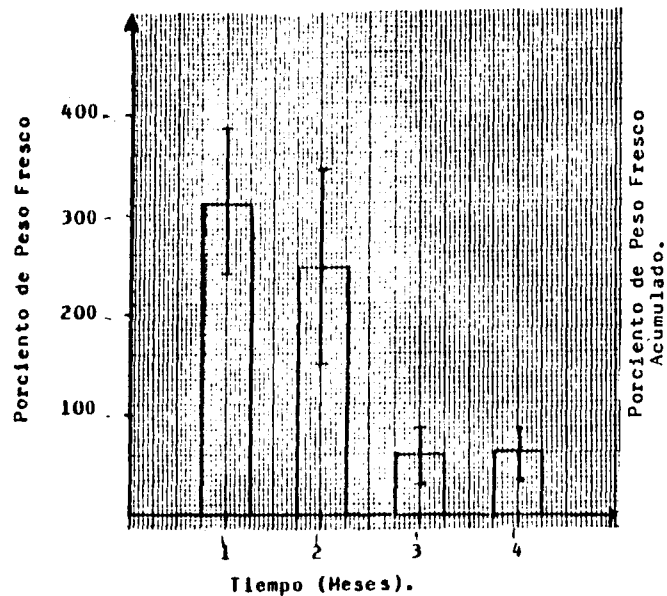
GRAFICA 3 B (A₇).



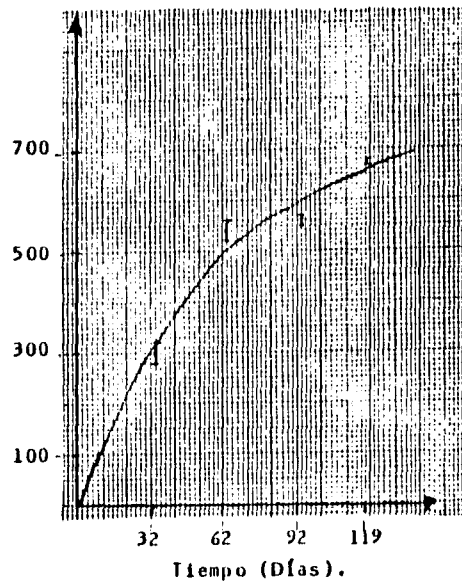
GRAFICA 3:

En esta gráfica se observa el tratamiento del día 7 en 4 °C de oscuridad de anteras (parte A y B). En la parte A se presenta el polígono de frecuencias dado en porcentaje de peso fresco contra tiempo en meses y en la parte B se presenta el crecimiento acumulado en las mismas condiciones antefiores sólo que el tiempo está dado en días

GRAFICA 4 A (A_1).

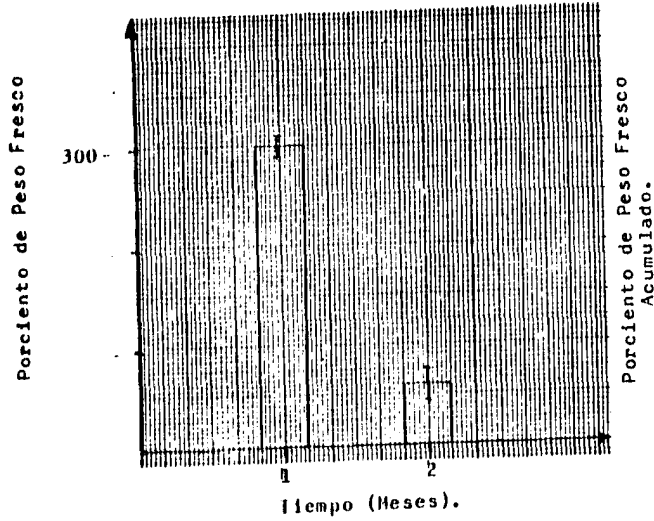


GRAFICA 4 B (A_1).

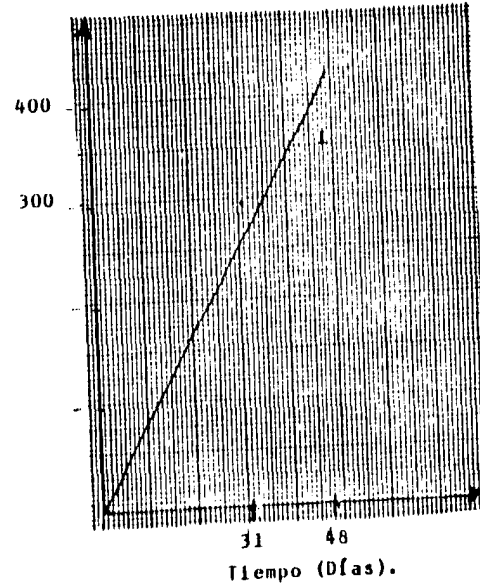


GRAFICA 4: Esta gráfica presenta el polígono de frecuencias (parte A) y el crecimiento acumulado (parte B) en anteras con tratamiento de un día en 4 °C de oscuridad en porcentaje de peso fresco contra tiempo en meses y/o en días.

GRAFICA 5 A



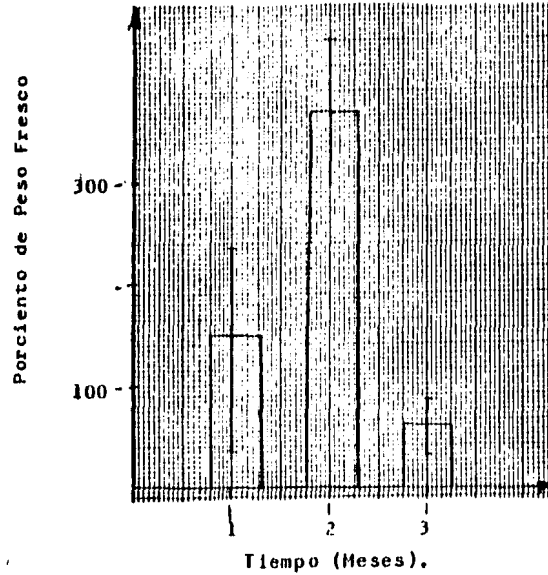
GRAFICA 5 B



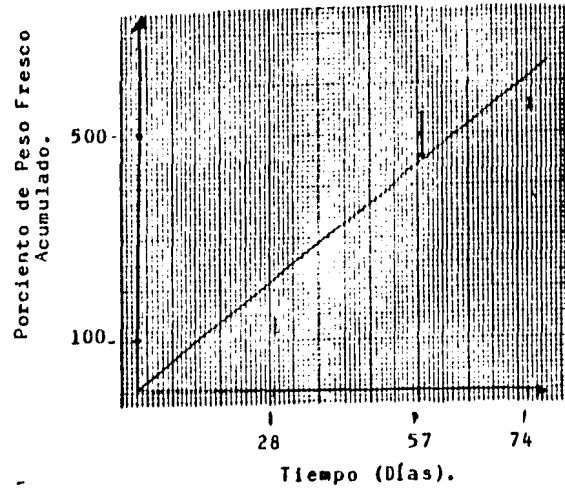
GRAFICA 5:

En esta gráfica se presenta en la parte A el polígono de frecuencias en porcentaje de peso fresco contra tiempo en meses de anteras con tratamiento de los días 1, 2 y 3 en oscuridad con 4 °C seguida de 16 horas continuas de luz y en la parte B se muestra el crecimiento acumulado en las mismas condiciones anteriores sólo que el tiempo está en días.

GRAFICA 6 A

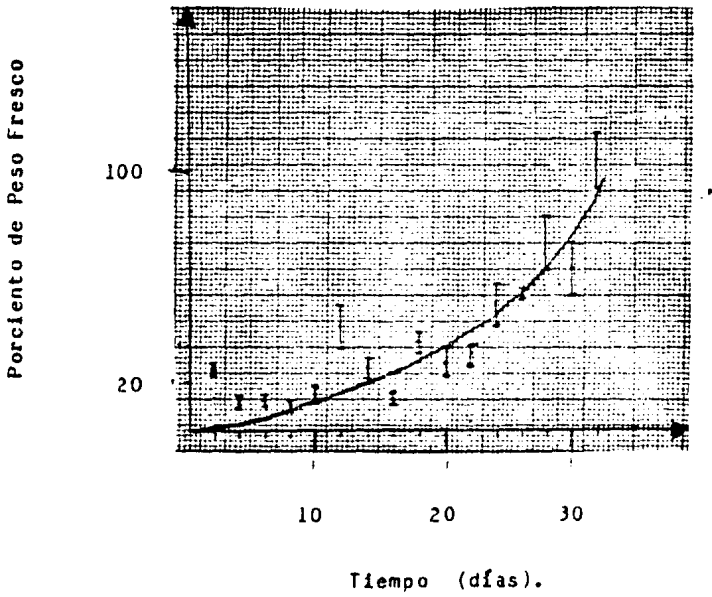


GRAFICA 6 B



GRAFICA 6: En esta gráfica se presenta en la parte A el polígono de frecuencias en porciento de peso fresco contra tiempo en meses de anteras (repetición del tratamiento de los días 1, 2 y 3) en oscuridad 4 °C seguidas de 16 horas continuas de luz y en la parte B se muestra el crecimiento acumulado en días.

GRAFICA 7



GRAFICA 7: Curva de crecimiento durante 32 días. Esta dada en porcentaje de peso fresco contra tiempo en días.

C O N C L U S I O N E S

- Se tienen que hacer más experimentos en cuanto a propagación, alrededor de las siguientes concentraciones, 1 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP; 0.1 ppm de AIA con 0.1 de BAP; 1 ppm de BAP con 0.1 ppm de AIA y 10 ppm de AIA con 0.1 ppm de BAP y de éstas tratar de obtener brotes, en lugar de callo, o bien aunque este presente el callo tratar de obtener brotes, o hacer otro barrido de concentraciones de estos fitorreguladores pero en valores intermedios a los de la tabla (ver materiales y método) o también probar períodos de resiembra más cortos con las concentraciones usadas. Las hojas que respondieron mejor fueron las medianas (1.1

- 2.0 cm).

- En cuanto a los embriones inmaduros se obtuvieron buenos resultados en el tratamiento de oscuridad con 1 ppm de 2,4-D más 0.1 ppm de K y 0.25 ppm de ANA con 0.25 ppm de 2,4-D. En cuanto al tratamiento de luz no se dieron tal vez porque la concentración no fue la adecuada aunque lo sea para la oscuridad. Las vainas que respondieron mejor fueron las medianas (1.0 - 4.0 cm).
- En anteras se encontró que el pretratamiento adecuado fue de los días 1, 2 y 3 en 4 °C de oscuridad seguidas con 16 h continuas de luz. El tamaño óptimo de las yemas florales fue el de 2 a 3 mm de largo y la inducción fue adecuada con 1 ppm de 2,4-D más 1 ppm de K. Los mejores días del tratamiento a 4 °C en la oscuridad fueron 1, 6, 7 y 11 aunque en este último día no hubiera crecimiento en las repeticiones posteriores. Además se comprueba que del tratamiento 1 al 12 sí debería de existir callo, ya que en los resultados mostrados se observa que en las repeticiones sí dan los días 2, 3, 4 y 8 y no dieron al principio por que cada individuo responde diferente a las condiciones dadas (variabilidad genética).
- El crecimiento en embriones inmaduros y anteras (ob-sérvese las gráficas) es bastante bueno para las condiciones dadas.
- En cuanto a la curva de crecimiento se concluye que

esta planta presenta un tiempo de crecimiento prolon
gadeya que durante los 32 días que se siguió la grá
fica no llegó a la fase estacionaria.

SUGERENCIAS

- En anteras y propagación hay que encontrar un medio de mantenimiento adecuado para mantener los cultivos blancos y suaves. Hay que recordar que este trabajo es el inicio de un proyecto a largo plazo, ya que en la bibliografía citada jamás mencionaron bien las técnicas de cultivo de Catharanthus roseus que se supone utilizaron para obtener un cultivo en suspensión, por esta razón se tuvo que empezar a poner las bases para encontrar una línea celular estable y posteriormente con ella hacer otro tipo de estudios, tales como los bioquímicos.
- También para que haya menos contaminación se propo-

ne la germinación de las semillas en condiciones estériles.

- Se tiene que hacer una repetición de la curva de cre
cimiento aumentando el número de tubos, para encontrar
la fase estacionaria y poder enecontrar el día de resi
embra adecuado.

APENDICES.

0.- Medio basal de Murashige y Skoog, 1962 (Medio M-S).

A. Sales	Formula	Concentración en mg/l.	Conc.
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650	41.2 mM
Nitrato de potasio	KNO_3	1900	18.8 mM
Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	3.0 mM
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 2H_2O$	370	1.5 mM
Fosfato monobásico de potasio.	KH_2PO_4	170	1.25 mM
Yoduro de potasio	KI	0.83	5.0 μ M
Acido bórico	H_3BO_3	6.2	100 μ M
Sulfato de manganeso	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3	100 μ M
Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	30 μ M
Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	1.0 μ M
Cloruro de cobalto	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.1 μ M
Sulfato de cobre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.1 μ M
EDTA	Na_2 EDTA	37.3	0.20 mM
Sulfato de hierro	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8	0.1 mM
Sacarosa		30.0	g/l

pH --- 5.7 - 5.8

B. Constituyentes orgánicos

ino-itol	100 mg/l
Ac nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina . HCl	0.5 mg/l
Tiamina . HCl	0.1 mg/l

1.- Medio basal de Murashige y Skoog modificado.

Nombre del compuesto.	Fórmula	Concentración en mg/l.	Conc.
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	3.0 mM
Nitrato de potasio	KNO_3	1900	18.8 mM
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1650	41.2 N mM
Yoduro de potasio	KI	0.83	5.0 μM
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.1 μM
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	170	1.25 mM
Acido bórico	H_3BO_3	6.2	100 μM
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	1.0 μM
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	1.5 mM
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	100 μM
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.1 μM
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	30 μM
Sulfato de hierro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55.7	0.20 mM
EDTA	$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	74.5	0.21 Na mM
Glicina		200	
Piridoxina		50	
Acido nicotínico		50	
Tiamina		1000	

Nombre del compuesto.	Fórmula	Concentración en mg/l	
M- inositol		10000	
Agar		8000	
Sacarosa		20000	para anteras
		30000	para propagación y embriones inmaduros
pH	---	5.6	

2.- Soluciones concentradas para la obtención del medio M-S.

Soluciones	Compuestos que se utilizan	Concentración en mg/l
A	Cloruro de calcio	440
B	Nitrato de potasio Sulfato de amonio	1900 1650
C	Yoduro de potasio Cloruro de cobalto	0.83 0.025
D	Fosfato monobásico de potasio Acido bórico Molibdato de sodio	170 6.2 0.25
E	Sulfato de magnesio Sulfato de manganeso Sulfato de cobre Sulfato de Zinc	370 22.3 0.025 8.6
F	Sulfato de hierro EDTA	55.7 74.5
V	Glicina Piridoxina Acido nicotínico Tiamina M-inositol	200 50 50 1000 10000
Agar		8000
Sacarosa		20000 anteras 30000 embriones inmaduros y propación.

3.- Cantidad adecuada de las soluciones para hacer un litro de medio M-S.

SOLUCIONES	ml/l
A	10
B	10
C	10
D	10
E	10-
F	5
V	10

Fitorreguladores

pH - 5.6

Sacarosa anteras	20 g/l
Sacarosa propagación	30 g/l
Sacarosa embriones inmaduros	30 g/l
Agar	8 g/l

Nota: En la solución V (vitaminas) la tiamina esta diez veces más concentrada que en el medio original de M-S

B I B L I O G R A F I A .

- Arreguin, B. and Bonner. (1950). The biochemistry of rubber formation in the guayule. II: Rubber formation in aseptic tissue culture. ARCH. Biochem., 26, 178-186.
- Bajaj, Y. P. S, Ram, A. K, Labana, K. S. and Singh, H. (1981). Regeneration of genetically variable plants from the anther derived callus of Arachis hypogaea and Arachis villosa. Plant Science Letters, 23: 35-39.
- Bouquet, A., Piganeau, B., Etlamaison, A. M. (1982). Influence du genotype sur la production de cals d'embryoides et de plantes entieres par culture d'antheres in vitro dans le genre Vitis C. R. Acad. Sc. Paris 295: 569-574.
- Bourgin, J. P. and Nitsch, J. P. (1967). Obtention de Nicotiana haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. Ann. Physiol. Veg. 9: 377-382.
- Bullock, W. P. and Baenziger, P. S. (1982). Anther culture of wheat (Triticum aestivum L.) F₁'s and their reciprocal crosses. Theor. Appl Genet. 62: 155-159.
- Butcher, N. D. and Ingram, D. S. Plant tissue culture. Edward. Arnold. Publishers. Cambridge, England. 1976.
- Castillo, A. O. 1984 (Tesis de Licenciatura), Biología, Fac Ciencias. Universidad Nacional Autonoma de México.
- Carew, D. P. (1978). Catharanthus roseus tissue culture: the effects of precursors on growth and alkaloid production. Lloydia 41-(4): 327-331.
- _____ (1962). Tissue culture of the Apocynaceae. I. Culture requirements and alkaloid analysis. Lloydia 25 (4): 200-213).
- _____ (1964). Tissue culture studies of certain members of the Apocynaceae. Lloydia. 27 (4): 322-327.
- _____ (1966). Growth of callus tissue of C. roseus in suspension culture. J. Pharmaceutical. Sci. 55: 1153-1154.
- Carew, D. P. and Staba, E. J. (1965). Plant tissue culture: its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies. Lloydia 28: 1-26.

- Cocking, E. C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 962-972.
- Constabel, F., et al. (1981). Alkaloid production in *C. roseus* cell cultures X. Mixototoxic effect of 3', 4' Dehydrovinblastina. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 105 (5): 53-58.
- Chaleff, R. S. and Stolarz, A. (1981). Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oriza sativa*) anthers. *Physiol Plant* 51: 201-206.
- Chen, Z. (1982). Recent advances in anther culture of *Hevea brasiliensis*. (Mueli-Arg). *Theor. Appl. Genet.* 62: 103-105.
- Ding-Gang, H. and Jun-Wen, O. (1984). Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages. *Plant. Science. letters.* 33: 71-79.
- Dodds, J. H. and Roberts, L. H. Experiments in plant tissue culture, Cambridge-University Press, p.p. 1-65. 1982.
- Farnsworth, R. N. (1961). The pharmacognosy of the periwinkles: *Vinca* and *Catharanthus*. *Lloydia* 24 (3): 105-138.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151.
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., and Vasil I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro* 12 (7): 473-478.
- Gamborg, O. L. and Shyluk, J. P. In plant tissue culture-methods and applications in agriculture. (Trevor A. Thorpe. ed) p. 21 Academic Press, New York. (1981).
- Gresshoff, P. M. and Doy, C. H. (1972). Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust. J. Sci.* 25: 259-264.
- Guha, S. and Maheshwari, S. C. (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* *in vitro*. *Nature* 212: 92-98.
- _____ (1967). Development of embryoids from pollen grains of *Datura* *in vitro*. *Phytomorphology*, 17: 454-461.
- Harn, C. H. (1972). Production of plants from anthers of *Solanum nigrum* cultured *in vitro*. *Caryologia*. Vol

125 (4): 429-437.

- Henry, Y., Buysen, J., Guenegou, T. and Ory, C. (1984). Wheat microspore embryogenesis during in vitro anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 67: 439-442.
- Huang, L. C. and Murashige, T. (1977). Plant tissue culture media: major constituents, their preparation and some applications. *Tissue culture-assoc Man* 3: 539.
- Hudson, T. H., et al. Propagación de plantas-principios y prácticas. C. E. C. S. A. México. 1982.
- Jagannathan, V., Mascarenhas, A.P., Hendre, P. H., Nag gir., A. L., Ghugale, D. D., Krishnamurthy, K. D. and Godbole, D. A. Propagation of plants-through tissue-culture. Symposium on Basic Sciences and Agriculture. p.p. 78-86, 1977. Indian National Science Academy, New Delhi.
- Jialin, W. et al. (1983). Selection of pure line of maize (Zea mays) by anther culture-and observations on its hybrids. *Scientia Sinica* Vol 26: N 7: 725-734.
- Johansson, L. (1983). Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiol Plant.* 59: 397-403.
- Johnson, J. L. and Emino, E. R. (1979). In vitro propagation of Mammillaria elongata. *Hortscience.* 14: (5): 605-606.
- _____ (1979). Tissue culture propagation in the cactaceae. *Caetus and Succulent Journal.* 51: 275-277.
- Keathley, D. E. and School, R. L. (1983). Chromosomal heterogeneity of Arabidopsis thaliana anther callus, regenerated shoots and plants. *Z. Pflanzenphysiol.* D. 112 S: 242-255.
- Kurz, W. et al. (1981). Alkaloid production in C. roseus cell cultures VIII. *Plant Medica.* 42: 22-31.
- Kutney, P. D. et al. (1980). Alkaloid production in Catharanthus roseus cell cultures. Isolation and characterization of alkaloids from one cell line. *Phytochemistry* vol 19: 2589-2595.
- La Rue, C. D. (1936). The growth of plant embryos in culture. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, Vol 63 (7): 365-382.
- Lazar, M. D., Schaeffer, G. W. and Baenziger, P. S. (1984). Cultivar and cultivar-X environment effects on

the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat. *Theor Appl Genet.* 67: 273-277.

- Lowe, K. W. and Conger, B. U. (1979). Root and Shoot formation from callus cultures of tallfescue. *Science*. Vol 19 May-June p. 397-400.
- Loyola-Vargas, V. M., en cuadernos de posgrado, (V. M. Loyola-Vargas editor), DEPg, Facultad de Química, UNAM, en prensa (1984).
- Loyola-Vargas, V. M. (1984). Obtención de productos secundarios de interés farmacológico a partir de cultivo de tejidos. I. consideraciones generales y proposición de un modelo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, Vol 14, N 4: 26-30.
- Mauseth, J. D. (1977). Cactus tissue culture: A potential method of propagation, *Cactus and Succulent Journal (U.S.)* Vol XLIX: 80-81.
- _____ (1979). A new method for the propagation of cacti: Sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)* Vol 51: 156-187.
- Murashige, T. and Skoog, F. A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473.
- Nickell, L. J. (1962). Submerged growth of plant cells. *Adv. Appl Microbiol.* 4: 213.
- _____ (Plant tissue culture as a source of biochemistry (ed by E. Staba) CRC. Press Inc. Boca Raton, Fl., p.p. 21-34. (1980).
- Raghavan, V. (1978). Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger*. *Am Journal of Bot.* 65: 984-1002.
- Raquin, C. (1983). Utilization of different sugars as carbon source for in vitro anther culture of petunia. *Z. Pflanzenphysiol. B. D.* 111. 5: 453-457.
- Sanchez de Jimenez E. *Perfiles bioquímicos de actualidad.* UNAM México 1978.
- Sanchez, S. O. *La flora del Valle de México.* ed Herro. S. H. México. 1979.
- Seabrook, J. E. A., Cumming, B. G. and Dionne, L. A.

- (1976). The in vitro induction of adventitious shoot and root apices narcissus (daffodil and narcissus) cul-
tivar tissue. Can tissue. Can. J. Bot. 54: 814.
- Shaeffer, G. W., Sharpe, F. T. and Cregan, P. B. (1984). Variation for improve protein and yield from rice an-
ther culture. T. A. G. 67: 383-389.
 - Sharma, A. K., Prasad, R. N. and Chaturvedi, H. C. (1981). Clonal propagation of Bougainvillea glabra- "Mag-
nifica" through shoot apex culture. Plant cell tissue and organ culture and international Journal on in vi-
tro culture-of higher plants, Martinus Nijhof/Dr. W. Junk, Vol 1 (1): 33-38.
 - Sharma, D. P., Firoozabadi, E. , Ayres, N. W. and Galor at H. D. W. (1983). Improvement of anther culture-in Nicotiana: Media, cultural conditions and flow cytome-
tric determination of ploidy levels. Z. Pflanzenphysiol. B. D. 111. S. 441-451.
 - Skoog, F. and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and-organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118.
 - Staba, J. E. Plant tissue culture--as a source of bioche-
micals CRC. Press, Inc. Boca Raton, Fla., USA. 1980.
 - Stearn, T. W. (1966). Catharanthus roseus. The correct name for the Madagascar periwinkle. Lloydia 29 (5): 196-200.
 - Stefanis, J. P. and Langhans, R. (1980). Factors influen-
cing the-culture and propagation of Xerophytic succulent species. Hortscience. 15 (4): 504-505.
 - Street, H. E. Plant tissue and cell culture. Second ed, Vol II. University of California Press, Berkeley. Los Angeles Calif. 1977.
 - Sunderland, N. (1971). Anther culture, a progress report, Sci. Progr. (Oxford) 59: 527-549.
 - Sunderland, N., Huang, H. B. and Hills, G. J. (1984). Disposition of pollen in-situ and-its-relevance anther/
pollen culture. Journal-of experimental Botany 35 (153): 521-530.
 - Sunderland, N. and Roberts, M. (1977). New approaches to pollen culture. Nature 270: 236-238.
 - Takebey, I., Labib, G. and Melchers, G. (1971). Regenera-
tion of whole plants from isolated mesophyll protoplasts

of tobacco. Naturwissenschaften. 58: 318-320.

- Taylor and Farnsworth, The Catharanthus alkaloids. Marcel Dekker Inc. New York. 1975.
- Vasil, I. K. and Botti, C. (1983). Plant regeneration by Somatic-embryogenesis from parts of cultured mature embryos of Pennisetum americanum (L.) K. Shum. Z. Pflanzenphysiol. 76: 191-212.
- Vasil, I. K. and Nitsch, C. (1975). Experimental production of pollen haploids and their uses. Z. Pflanzenphysiol. 76: 191-212.
- Vasil, I. K. and Ozias-Akins, P. (1983). Callus induction and growth from the mature embryo of Triticum aestivum (wheat). Protoplasma 115: 104-113.
- Waizel, J. B. 1979. (Tesis Doctoral) Colegio de Ciencias y Humanidades. Universidad Nacional Autonoma de México.
- Webb, D. T., Rivera, M. E., Starszak, E. and Matos, J. (1982). Callus initiation and organized developmental from Zamia pumila embryo explants. Ann. Bot. 51: 711-717.
- Wolfgang, G. W. et al. (1980). 198. Alkaloid production in C. roseus cell cultures IV. Characterization of the 953 cell line. Chimica Acta. Vol 63, Fasc. 7: 1891-1896.
- Yeoman, M. M. and Macleod, A. J. (1977). Tissue (callus) cultures techniques. In plant tissue and cell culture, 2nd ed, ed B. E. Street, pp 31-59. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Zapata, F. J. et al. (1981). Rice anther culture: Media for high-efficiency of callus and plant regeneration. Proceedings of international tissue culture workshop. 130-135 p.