



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Tesis que presenta

Alberto Geovanny Aguilar Santana

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2022

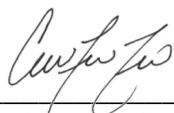
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Alberto Geovanny Aguilar Santana** titulado “***Diospyros anisandra blake: establecimiento de cultivo *in vitro* y su perfil químico***”, fue realizado en la unidad de Biotecnología en el laboratorio de fisiología Vegetal y Transformación Genética del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección de la **Dra. Rocío Borges Argáez** y el **Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de enero de 2022

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Aislamiento y evaluación antiviral de los componentes presentes en *Diospyros anisandra* y *Caesalpinnia yucatanensis*" con clave A1-S-27652, CONACYT-Ciencia Básica 2017-2018 en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez.



---

Alberto Geovanny Aguilar Santana

## AGRADECIMIENTOS

Al universo, por darme la fuerza necesaria para seguir adelante, la fortaleza para afrontar las dificultades y la salud para seguir con mi vida profesional.

A mis asesores de tesis: la **Dra. Roció Borges Argáez** y Dr. **Luis Carlos Rodríguez Zapata** por todo el apoyo, la tranquilidad, comprensión y enseñanzas que me brindaron a lo largo de estos dos años para fortalecer mi formación profesional.

A mis revisores el Dra. **Nancy Santana Buzzy**, M.C **Pablo Sansores Peraza** y Dr. **Felipe Sánchez Teyer** por invertir su valioso tiempo en la revisión de mi tesis.

A mi familia que me han apoyado todos los días a ser una mejor persona y también en mi formación profesional, a mi padre que me enseñó a ser perseverante, apasionado y nunca rendirme a pesar de las dificultades que nos enfrentamos día a día, a mi madre que me enseñó a ser una persona con buenos valores, constante y ha estado siempre a mi lado en los momentos más difíciles y, por último, pero no menos importante, a mis hermanos porque han estado presentes cuando más los necesito.

A los amigos que conocí en CICY, sin los cuales no habría podido lograr terminar este proyecto: Osmar Solís, sus consejos académicos, así como personales ya que fueron un apoyo muy importante para mí durante todo este tiempo. También a Iván, Tania y Mary por su apoyo y consejos en el laboratorio, seminarios y por brindarme su amistad.

A mi mejor amiga, novia y futura esposa la Sra. **Dafne Elizabeth Trejo Ochoa**, porque desde que nos conocimos, hace 12 años, ha estado presente cada vez que la necesito, me ha brindado su conocimiento, sus consejos y sobre todo su compañía durante todo mi camino como profesional y, por último, pero no menos importante su amor incondicional.

A los técnicos **Miguel Keb Llañez** y **Felipe Alonso Barredo Pool**, por su asesoramiento en el diseño de tratamientos relacionadas con el cultivo *in vitro*, estudios de tejidos y por todo el apoyo que me brindaron durante la maestría, por su paciencia y por sus consejos que me ayudaron mucho en mi proyecto de tesis

A la M.C **Fabiola Escalante Erosa** por su apoyo técnico y su asesoramiento en la obtención de los perfiles cromatográficos por CG-EM

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca 1019821 para los estudios de maestría, así como el apoyo para el proyecto de Ciencia Básica al que perteneció la tesis realizada.

---

---

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I .....	3
1.1 ANTECEDENTES .....	3
1.1.2. MICROPROPAGACIÓN .....	3
1.1.3. DESCONTAMINACIÓN DE SEMILLAS.....	5
1.1.4. PRUEBAS DE VIABILIDAD .....	6
1.1.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN.....	7
1.1.6 PROBLEMÁTICA Y SU DESARROLLO <i>IN VITRO</i> .....	8
1.1.7 HORMONAS VEGETALES O FITOHORMONAS.....	10
1.1.8 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS AUXINAS .....	11
1.1.9 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS CITOCININAS.....	12
1.1.10 GIBERELINAS .....	12
1.1.11 MECANISMO DE GIBERELINAS.....	13
1.1.12 MODELO BIOLÓGICO: <i>DIOSPYROS ANISANDRA</i> .....	13
1.1.13 CARACTERÍSTICAS DE LAS SEMILLAS .....	14
1.1.14 TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS .....	15
1.1.15 LATENCIA Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS EN <i>DIOSPYROS SPP.</i> .....	19
1.2 JUSTIFICACION .....	20
1.3 HIPOTESIS .....	21
1.4 OBJETIVO GENERAL.....	22

---

---

1.5 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	24
<b>CAPITULO 2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> A PARTIR <i>DE</i> SEMILLAS DE <i>D. ANISANDRA</i>.....</b>	<b>25</b>
2.1 INTRODUCCIÓN.....	25
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
2.2.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO Y MORFOLOGÍA FRUTO Y SEMILLAS. ....	26
2.2.2 ESTRATIFICACIÓN DE SEMILLA .....	26
2.2.3 ESCARIFICACIÓN DE SEMILLA.....	26
2.2.4 DISEÑO Y APLICACIÓN DEL PROTOCOLO DE DESCONTAMINACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO. ....	27
2.2.5 DISEÑO Y APLICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>D. ANISANDRA</i> . ....	28
2.2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL RECOPIACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	30
2.3 RESULTADOS.....	31
2.3.1 MORFOLOGÍA DE FRUTOS Y SEMILLAS .....	31
2.3.2 DESCONTAMINACIÓN DE SEMILLA. ....	32
2.3.3 ESCARIFICACIÓN DE SEMILLAS .....	33
2.3.3 GERMINACIÓN DE SEMILLA.....	34
<b>CAPÍTULO 3. MICROPROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>D. ANISANDRA</i> A PARTIR DE CULTIVO DE TEJIDOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 INTRODUCCIÓN.....	38
3.2 METODOLOGÍA .....	39
3.2.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	39

---

---

3.2.2 DISEÑO Y APLICACIÓN DEL PROTOCOLO DE DESINFESTACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO. ....	39
3.2.3 DISEÑO Y APLICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, PARA TEJIDOS VEGETALES. ....	40
3.2.4 USO DE DIFERENTES REDUCTORES PARA CONTROLAR LA OXIDACIÓN.....	41
3.2.4 ANÁLISIS DE TEJIDOS .....	41
3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
3.3 RESULTADOS.....	43
3.3.1 DESCONTAMINACIÓN DE EXPLANTES. ....	43
3.3.2 REGENERACIÓN DE TEJIDOS.....	44
3.3.2 ANÁLISIS DE TEJIDOS DE TEJIDOS.....	49
CAPITULO 4. PERFIL QUÍMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS. ....	50
4.1 INTRODUCCIÓN.....	50
4.2 METODOLOGÍA .....	52
4.2.1 EXTRACCIÓN HEXÁNICA DE VITROPLANTAS COMPLETAS DE <i>D. ANISANDRA</i> .....	52
4.2.2 EXTRACCIÓN HEXÁNICA DE CALLOS DE <i>D. ANISANDRA</i> . ....	52
4.2.3 PERFIL DE CG/EM .....	52
4.3 RESULTADOS.....	53
4.3.1 PERFIL QUÍMICO DE VITROPLANTAS.....	53
4.3.2 PERFIL QUÍMICO DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS.....	54
CAPITULO V. DISCUSIONES GENERALES .....	57
5.1.1 Germinación de semilla .....	57
5.1.2 Cultivo de tejido .....	58
5.1.1 Perfil químico. ....	

**CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS ..... 61**

**CONCLUSIONES..... 61**

**PERSPECTIVAS ..... 62**

**BIBLIOGRAFIAS ..... 63**

---

---

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. 3.....	3
FIGURA 1.1 4.....	4
FIGURA 1.1. 5.....	5
TABLA 1.1. 1.....	14
FIGURA 1.1. 1.....	16
FIGURA 1.1. 1.....	17
FIGURA 1.1. 2.....	17
FIGURA 2.2.3.....	27
FIGURA 2.2. 4.....	28
FIGURA 2.3. 2.....	31
FIGURA 2.3.3.....	32
FIGURA 2.3.4.....	33
FIGURA 2.3. 5.....	34
FIGURA 2.3.6.....	36
FIGURA 3.2. 1.....	43
FIGURA 3.3. 2.....	44
FIGURA 3.3. 3.....	45
FIGURA 3.3. 4.....	45



**FIGURA 3.3. 5..... 46**

**FIGURA 3.3. 6..... 47**

**FIGURA 3.3. 6..... 48**

**FIGURA 4.3.8..... 48**

**FIGURA 4.3 1..... 54**

**FIGURA 4.3. 2..... 55**

**FIGURA 4.3.3..... 56**

---

---

**INDICE TABLAS**

**TABLA1.1. 2 ..... 18**

**TABLA 1.1. 3. .... 8**

**TABLA 2.2. 5. .... 29**

**FIGURA 2.3 .2..... 32**

**FIGURA 2.3. 3..... 35**

**TABLA 3.2.1. .... 39**

**TABLA 3.2. 2 ..... 40**

**TABLA 3.2. 1. .... 43**

**TABLA 4.3 1. .... 53**

---

## RESUMEN

De las diferentes especies de *Diospyros* que existen en la península de Yucatán, muy pocas se utilizan para la extracción de compuestos con actividades biológicas. *Diospyros anisandra* es una de las principales productoras de quinonas y terpenos. Se ha descrito que las quinonas de esta planta poseen actividades antituberculosas, las cuales inhiben el crecimiento de una cepa pan resistente de *M. tuberculosis*, de igual forma, la quinona epóxido de zeylanona evita la replicación del virus de la influenza tipo A y B en las etapas tempranas y medias del ciclo replicativo. En este sentido se comprende que esta especie tiene un valor farmacológico y se necesita desarrollar un método de multiplicación sustentable; se sabe que el crecimiento en condiciones *in situ* tarda aproximadamente 10 años para alcanzar una etapa madura y poder dar semillas, esto dificulta su proliferación en su hábitat, por lo que el cultivo *in vitro* podría ser una alternativa viable y utilizar como herramienta la micropropagación, para la explotación comercial de los metabolitos secundarios. El propósito de este trabajo se centró en establecer las condiciones de cultivo *in vitro* a partir de semillas y cultivo de tejidos, con el fin de analizar el perfil químico de plantas y masas callosas crecidas en ambientes controlados. Como consecuencia de lo dicho anteriormente, la germinación obtuvo los resultados en medios MS basal suplementado con agar y GA3 a los 10 días, posteriormente a los 35 días ya tenían desarrolladas sus hojas verdaderas, de modo que, se obtuvo como producto el extracto hexánico de vitroplantas de 90 días después de la siembra, el cual fue analizado por CG/EM donde se observó la presencia de compuestos de interés farmacológico, tales como la plumbagina, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, taraxerol entre otros. Por otra parte, el cultivo de tejidos se inició con cortes transversales de hojas jóvenes y maduras, sembradas en medio MS suplementado con 2,4-D, 6-bencil amino purina, y zeatina. Como resultado a las 3 semanas se observó la formación de callos con presencia de oxidación, en consecuencia, se añadió cisteína y polivinilpolipirrolidona (PVPP) como antioxidantes dando mejor respuesta para el PVPP. En cuanto al perfil químico se evaluó la presencia de compuestos quinónicos y terpenicos.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, *Diospyros anisandra*, establecer, perfil químico.

---



**ABSTRACT**

Of the different species of *Diospyros* that exist in the Yucatan Peninsula, very few are used for the extraction of compounds with biological activities. *Diospyros anisandra* is one of the main producers of quinones and terpenes. It has been described that the quinones of this plant have antituberculous activities, which inhibit the growth of a pan-resistant strain of *M. tuberculosis*; in the same way, zeylanone epoxide, quinone isolated from the stem bark of *D. anisandra* prevents the replication of the influenza virus type A and B in the early and middle stages of the replicative cycle. In this sense, it is understood that this species has a pharmacological value and it is necessary to develop a sustainable multiplication method; it is known that growth under *in situ* conditions takes approximately 10 years to reach a mature stage and be able to produce seeds, this hinders its proliferation in its habitat, so *in vitro* cultivation could be a viable alternative and use micropropagation as a tool, for commercial exploitation of secondary metabolites. The purpose of this work focused on establishing *in vitro* culture conditions from seeds and tissue culture, in order to analyze the chemical profile of plants and callous masses grown in controlled environments. As a consequence of what was said above, germination obtained the results in basal MS media supplemented with agar and GA3 at 10 days, later at 35 days they already had their true leaves developed, so that the hexane extract of vitroplants 90 days after sowing, which was analyzed by GC/MS where the presence of compounds of pharmacological interest, such as plumbagin, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, taraxerol, among others, was observed. On the other hand, tissue culture was initiated with cross sections of young and mature leaves, seeded in MS medium supplemented with 2,4-D, 6-benzyl amino purine, and zeatin. As a result, after 3 weeks, the formation of calluses with the presence of oxidation was observed, consequently, cysteine and polyvinylpyrrolidone (PVPP) were added as antioxidants, giving a better response for PVPP. Regarding the chemical profile, the presence of quinone and terpene compounds was evaluated.

Keywords: *in vitro* culture, *Diospyros anisandra*, establish, chemical profile.

---

## INTRODUCCIÓN

La Península de Yucatán, en el sureste de México, es considerada una provincia biótica ya que cuenta con una extensión de tierra con similitudes que permiten establecer demarcaciones ambientales (Morrone, 2005). La gran riqueza cultural de esta región cuenta con una flora que está compuesta por elementos de origen centroamericano, caribeño que unidos a los elementos endémicos dan como resultado una flora nativa muy peculiar (Duran & Mendez, 1997).

*Diospyros anisandra* S.F. Blake de la familia *Ebenaceae* es un arbusto o árbol pequeño de hasta 6 metros de altura, ramas cortas, hojas subfasciculadas en las puntas de las ramas, frutos globosos, de aproximadamente 1 cm de diámetro, negros y brillantes cuando están maduros. La corteza del tallo de esta planta contiene compuestos quinónicos y terpénicos. Principalmente del extracto de hexano de la corteza del tallo de *Diospyros anisandra* se aisló un nuevo dímero de plumbagina, epóxido de zeylanona, junto con 14 compuestos conocidos, incluyendo siete naftoquinonas: Plumbagina, maritina, 3,3'-biplumbagin, chitranona, cis-isoshinanona, eliptina y droserona, cuatro triterpenos: lupeol, betulinaldehído, betulina, ácido betulínico y finalmente, tres sesquiterpenoides. Las estructuras se elucidaron mediante la aplicación de IR, UV, MS, análisis espectroscópico de RMN 1D y 2D (Uc-cachon et al., 2013). El extracto hexánico de la corteza del tallo de *Diospyros anisandra* S.F. Blake tienen actividad antimicrobiana contra una cepa sensible y una multiresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Dicha actividad se atribuye principalmente a las quinonas del tallo, siendo plumbagina, maritina y 3,3'-biplumbagina las quinonas activas (Uc et al., 2013). Así mismo se reportó la actividad larvicida de extracto metanólico de hojas y corteza del tallo de esta planta contra larvas de *Boophilus micropulus* resistentes a piretroides y organofosforados (Rosado et al., 2008). Mas aun, la actividad antiviral de las naftoquinonas aisladas de la corteza del tallo de *D. anisandra*, tales como, el epóxido de zeylanona (ZEP) inhibe la replicación de los virus de la influenza A y B, en las etapas tempranas y medias del ciclo de replicación (Cetina Montejó et al., 2019). Por lo anterior se perfila como una especie de importancia farmacéutica para la obtención de biomoléculas activas. Dentro de las alternativas que se pueden emplear a *D. anisandra*, para la extracción de compuestos de plantas jóvenes, se encuentran los métodos de cultivo de tejidos vegetales

(CTV) o técnicas de cultivo *in vitro*. Estos términos cubren una amplia gama de técnicas que involucran el cultivo bajo condiciones asépticas de una gran variedad de explantes; células, tejidos y órganos (George y Sherrington, 1984). Tales métodos permiten incrementar la disponibilidad de material biológico en tiempos relativamente cortos (Mata, 2000). Para algunas especies la propagación es más rápida que *in vivo*, y es factible obtener plantas libres de enfermedades; además, se utiliza muy poco material para establecer el cultivo y se ahorra espacio, energía, etc. (López, 1989). Su uso ha sido recomendado como una alternativa para aquellas especies con limitada propagación vegetativa, o cuando la disponibilidad, número y viabilidad de las semillas es escasa, lo que permite que puedan ser regeneradas en un lapso relativamente corto y posteriormente puedan ser reintroducidas a su hábitat, con un programa adecuado de manejo, lo cual representaría una de las primeras etapas en el rescate de poblaciones que requieran atención (Fay, 1994). Por otro lado, se han comparado métodos de extracción como maceración dinámica, maceración estática y sonicación en combinación con el tratamiento de KOH / HCl, para la separación de quinonas ligeramente polares de la mezcla de terpenoides y ésteres grasos. La comparación de cada fracción obtenida se ha realizado mediante análisis TLC y CG-MS. La cuantificación de cada componente de quinona mediante GC-MS reveló que la plumbagina y la droserona eran las principales naftoquinonas en el extracto hexánico de la corteza del tallo de esta especie (Borges-Argáez et al, 2013).

A pesar de que se han realizado distintos estudios a *D. anisandra*, la mayoría están enfocados en las diversas actividades biológicas y las extracciones de compuestos químicos. A la fecha no se han elaborado reportes que desempeñen estrategias, para el cultivo masivo de la especie con el propósito de promover la multiplicación masiva como instrumento para la producción y obtención de metabolitos secundarios de interés farmacológico sin dañar su estado nativo. En este estudio se estableció una metodología para las condiciones de cultivo *in vitro* a partir de semillas y segmentos de hoja.

## CAPITULO I

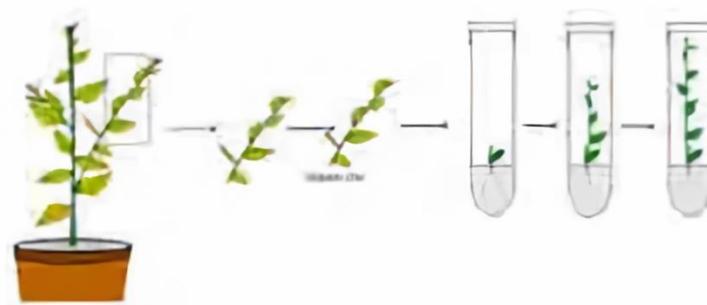
### 1.1 ANTECEDENTES

#### 1.1.1. Cultivo *in vitro*

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos como el de células y órganos, dentro de un grupo de técnicas que se fundamentan en varios principios. Entre estos principios, los más importantes son la totipotencialidad celular, propuesta por Haberlandt (1902), “todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas”; y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog et al. (1975) (Núñez & Mariño, 2008).

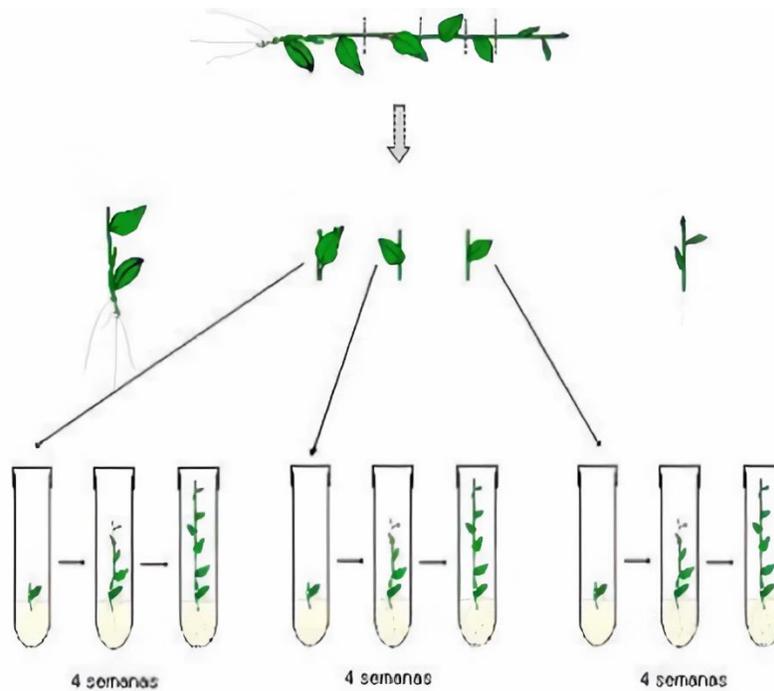
#### 1.1.2. Micropropagación

En la actualidad se sugieren cinco etapas que se numeran desde la etapa 0 hasta la IV, en cada una de ellas los objetivos están perfectamente definidos. Etapa 0. Selección del material vegetal. En esta fase se incluyen los tratamientos, preparación y selección de las plantas madre a partir de las cuales se inicia la micropropagación, siendo imprescindible comprobar la identidad (especie, variedad o cultivar) y su estado de salubridad (libre de patógenos, deficiencias o estrés). Etapa I. Iniciación del cultivo. Una vez seleccionadas las plantas (aquellas que posean unas características fenotípicas deseadas) se requiere desinfectar superficialmente el material escogido para evitar que en el medio de cultivo crezcan microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explanto (Fig. 1.1.4).



**Figura 1.1. 1.** Etapa I de micropropagación. Se selecciona el explante, se desinfecta y es sembrado en medios de cultivo.

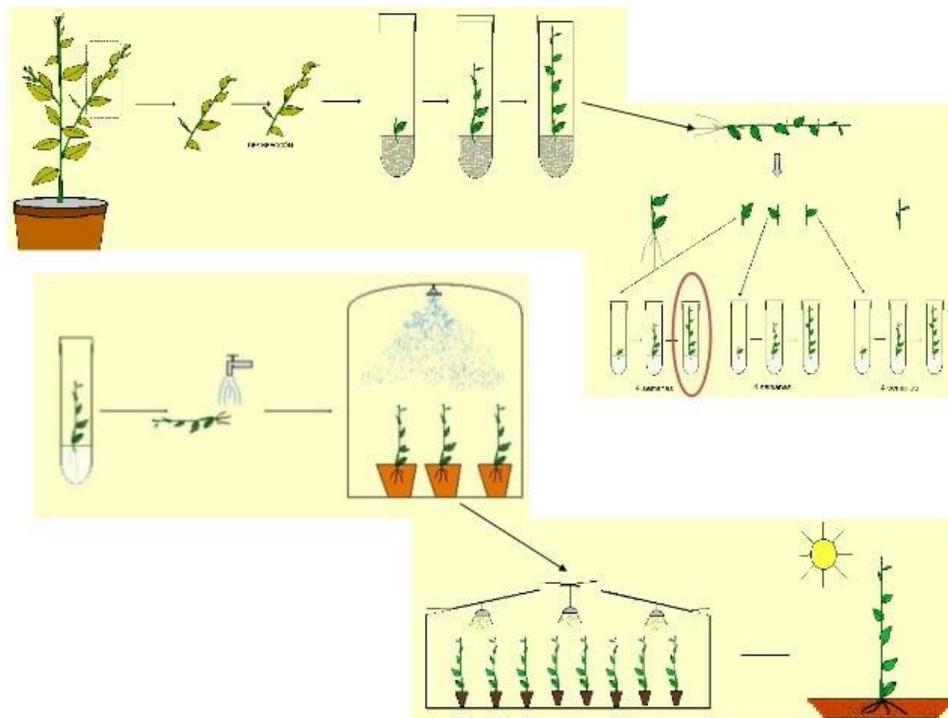
La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan inicialmente por las características del explante; en la práctica tienen que ser establecidas de forma exacta mediante el método de ensayo y error. Etapa II. Multiplicación. El objetivo de esta fase es inducir la multiplicación de los explantos mediante la formación de nuevas estructuras a través de la vía elegida (axilar o adventicia, embriogénica, etc.). En esta fase se producen nuevos brotes o propágulos que cuando son separados del cultivo son capaces de formar una planta, pudiendo usarse como el inicio de otro ciclo de multiplicación con el fin de aumentar su número (Fig. 1.1.5).



**Figura 1.1 2.** Etapa II de la micropropagación. En esta fase se induce el explante, para la formación de nuevas estructuras mediante la vía morfogénica elegida (axilar, adventicia o embriogénica, etc.).

Etapa III. Inducción y desarrollo de raíces. En esta fase se produce la formación de raíces adventicias. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso se transfieren los brotes obtenidos en la etapa anterior a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas. Esta operación se realiza en condiciones de esterilidad (en cabina de flujo). En el segundo caso los brotes se sumergen en una solución concentrada de auxinas y se transfieren a un sustrato limpio, no necesariamente

estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita. Etapa IV. Aclimatación. Las plantas cultivadas en condiciones *in vitro* poseen habitualmente estomas no funcionales y cutículas poco desarrolladas debido a la alta humedad relativa en el interior del frasco de cultivo y a la escasa realización de la fotosíntesis. Bajo las condiciones de cultivo *in vitro* los explantos son mixotróficos, casi no fotosintetizan y su necesidad de carbono orgánico lo suplen con los azúcares añadidos al medio. Por tanto, antes de transferirlas a las condiciones externas deben sufrir un proceso de acondicionamiento gradual: protección a la luz y control de la transpiración estomática y cuticular (Fig. 1.1.6)



**Figura 1.1. 3.** Etapa IV de la micropropagación y Transferencia a campo. Las plantas *in vitro* son mixotróficos y necesitan un proceso de adaptación para salir al exterior.

### 1.1.3. Descontaminación de semillas

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio Ca (OCI) 2, 6% a 12% y el cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>,

0.1% a 1.5%), aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante. En algunos casos resulta útil el agregar algún agente tensoactivo (por ejemplo, Tween-20, del 0.01% al 0.1%), pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol 70%. Asimismo, es conveniente agitar (80-150 rpm) el explante conjuntamente con la solución desinfectante (Roca & Mronginski, 1993). Así, por ejemplo, se evaluaron tres métodos de desinfección para el establecimiento y germinación de semillas *in vitro* de *Diospyros riojae*. El mejor tratamiento de desinfección de semillas se obtuvo con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comercial de 10 volúmenes al 3% (v/v), 20 minutos, alcohol etílico al 70% (v/v) 1 minuto e hipoclorito de sodio comercial al 30% (v/v), 30 min. Al realizar la disección de embriones cigóticos se logró el porcentaje de germinación más alto 60% (Sánchez et al, 2002).

#### **1.1.4. Pruebas de viabilidad**

El análisis de viabilidad por tetrazolio se presenta como una técnica útil para estimar rápidamente la capacidad germinativa de semillas de lenta germinación y con dormición postcosecha (Dias & Barros., 1995). Es una prueba bioquímica en los embriones de las semillas, diferencia los tejidos vivos de los muertos sobre la base de la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración). Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, dando como resultado la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio –2,3,5- triphenil tetrazolum chloride, incoloro- a formazán – color rojo-. El formazán tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo, podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente (Ruiz, 2009). Entre las principales ventajas están la rápida determinación de la viabilidad del lote de semillas, la adecuada evaluación de la capacidad germinativa potencial, especialmente para lotes con elevada cantidad de semillas dormidas y, por último, es muy útil para estudiar la biología de las semillas y procesos de deterioro. En contraste, la interpretación visual de la tinción es subjetiva y requiere experiencia especialmente en semillas pequeñas (Howarth & Stanwood, 1993). Otro punto importante es que no puede detectar daños menores, presencia de infección fúngica o daños por insecticidas (Vankus, 1997).

### 1.1.5 Factores que influyen en la micropropagación.

Existen diferentes factores que determinan el éxito en la micropropagación, los más importantes son los siguientes: Planta que dona el explanto. El estado fisiológico de la planta madre influye significativamente en la capacidad morfogénica del explanto. Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explanto tiene gran influencia en la morfogénesis, cuanto más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. El explante. Generalmente, la selección del explante se hace teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta. Así, si las plantas que se van a micropropagar se reproducen por semilla, las partes embrionarias son las fuentes más comunes de explantos; las semillas pueden ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. Este método se usa en coníferas y otras especies maderables. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos son, generalmente, la fuente de los explantos (Roca y Mroginski, 1991). Factores físicos. La temperatura a la que está expuesto el explanto cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que procede el explanto, del fotoperiodo, etc. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre los 24 y 28°C (Roca & Mroginski, 1993). Por otro lado, el medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua (Tabla 1, Fig. 6). A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y con otras sustancias. Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y de la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones diferentes para los medios de cultivo. El control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia, ya que su valor puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explanto y puede afectar al pH del citoplasma, y como consecuencia a la actividad de muchos enzimas (Núñez & Mariño, 2008).

**Tabla 1.1. 1.** Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales

Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	elementos	
		Fe
Azúcares	N	Zn
Aminoácidos	P	B
Auxinas	K	Mn
Citoquininas	Ca	Cu
Giberelinas	Mg	Ni
Acido abscísico	S	Co
		Al
		Mol

### 1.1.6 Problemática y su desarrollo *in vitro*

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996, Laukkanen et al., 2000, Murkute & Shanti-patil, 2003, Tang y Newton 2004). El desarrollo de este problema está estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado. Este fenómeno se produce por el desbalance entre las reacciones pro-oxidación (excesiva formación de ROS y, o RNS o de naturaleza enzimática) y los mecanismos antioxidantes para detoxificar (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), generalmente causado por una generación incrementada de radicales libres (Novoa, 2001, Turrens, 2003). A nivel celular, los ROS y, o RNS son capaces de oxidar irrestrictamente varios componentes celulares y pueden conllevar a una destrucción oxidativa de la célula. Estas moléculas, especialmente el OH•, son altamente destructoras de lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, pudiendo ocasionar el colapso (Bray et al., 2000, Cassells & Curry, 2001, Turrens, 2003, Apel e Hirt 2004, Mittler et al. 2004). Por ejemplo, en células de *Pinus virginiana*, Tang et al. (2004), correlacionaron la muerte celular con altos contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, en la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su

respuesta a estreses bióticos y abióticos). Por ejemplo, en explantes cultivados de tomate se ha reportado la presencia de vainillina, ácido p-coumárico, p-hidroxibenzaldehído y siringaldehído (Harms et al. 1983, Rao et al. 1985, Abdelwahd et al. 2008). No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir (George 1996, Ogita 2005). En *Eucalyptus tereticornis* y *Spondias purpurea*, el problema es tan severo que en torno de pocas horas el explante se oscurece y muere (Das y Mitra 1990, Azofeifa 2007). La toxicidad de los exudados está en relación con el incremento en la producción de compuestos fenólicos ya que estos son oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados (Tabiyeh et al. 2006).

### 1.1.7 Hormonas vegetales o fitohormonas.

Las hormonas vegetales o fitohormonas se producen en las células de la planta, sin formar glándulas y se definen como compuestos orgánicos que se sintetizan en una parte de la planta, y se trasladan a otro sitio donde ejercen su acción fisiológica en muy bajas concentraciones, entre  $10^9$  Mol a  $10^6$  M, muy por debajo de la concentración de otros compuestos como nutrientes y vitaminas (Izumi et ál. 2009). Las fitohormonas se caracterizan por participar en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleotrópica, esto quiere decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos y, además, que, dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta. Por otra parte, varias hormonas pueden afectar una misma respuesta, lo cual indica que hay una aparente redundancia en el control de un mismo efecto. Cada respuesta ocurre en un tiempo determinado en el desarrollo de la planta y se presenta solamente en un tejido específico u órgano (Srivastava 2002). De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), brasinosteroides, poliaminas. En el 2008, dos grupos independientemente identificaron las strigolactonas como un nuevo tipo de hormonas que inhibe la ramificación vegetal (Kamiya 2010). Si se combinan diferentes niveles de auxinas y citocininas pueden darse varias respuestas alternativas: la presencia de niveles relativamente altos de ambas hormonas conduce solo a una multiplicación celular con escasa diferenciación. Si existiese un nivel relativamente alto de citocininas vs. auxinas, el tejido manifiesta la formación de nuevos brotes a cambio de la intensa proliferación celular vista antes. Si, por el contrario, los niveles de ambas hormonas se invierten de manera de tener una relación más alta de auxinas vs. citocininas, la expresión del tejido cambia y se originan raíces. De manera que, las células vegetales que cuentan con núcleo y tienen un grado de diferenciación relativo, pueden bajo ciertas condiciones revertir a su estado meristemático y expresar luego diferentes respuestas conducentes todas a la generación de órganos y plantas. Se trata de células totipotentes. Esta propiedad se ha usado en ciencia y tecnología permitiendo regenerar plantas fértiles en forma masiva in vitro a partir de células y a la vez, lograr los avances en ingeniería genética. Con ello se han generado plantas modificadas a partir de células que han recibido y codificado positivamente nuevos genes insertos que se expresan en plantas viables y son reproducibles genéticamente y fielmente en el tiempo, mediante el potencial de la biotecnología derivada de la totipotencia celular vegetal (Jordán, 2006).

Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y las citocininas las cuales controlan la formación de la raíz, del tallo y el callo. Las Citocininas son compuestos de adenina sustituidos que promueven la división celular en los sistemas tisulares cultivados in vitro, tal como los cultivos de médula de tabaco, floema de zanahoria o tallos de soja (Salisbury, 2000). Las citocininas que más se emplean son: kinetina (KIN) y benzilamino-purina (BAP) (Hartmann, 1992). De igual manera existe un grupo de hormonas vegetales llamadas auxinas que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. La auxina estimula la iniciación de raíces en tallos, pero puede inhibir o reducir el crecimiento subsecuente de las raíces (Roca, 1991). Existen varias auxinas llamadas naturales, que incluyen el ácido indol-3-acético (AIA), compuesto de mayor utilización. También se utiliza un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente, entre las cuales 2,4-D ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el Ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) y el ácido 1H-indol-3-butanoico (AIB) que se utilizan comúnmente (Roca, 1991). El ácido indolacético, AIA, la auxina más común, se suele formar cerca de los brotes nuevos, en la parte superior de la planta, y fluye hacia abajo para estimular el alargamiento de las hojas recién formadas. Los científicos han obtenido compuestos químicos, llamados estimulantes del crecimiento, basados en las auxinas naturales.

### **1.1.8 Mecanismos de acción de las auxinas**

Las auxinas promueven el crecimiento de las plantas principalmente por un aumento de la expansión celular. De acuerdo con la hipótesis del "efecto ácido" sobre el crecimiento, las auxinas estimulan la actividad de la bomba de protones ( $H^+$ -ATPasa) localizada en la membrana plasmática a través de dos mecanismos: activación de las bombas preexistentes y por inducción de síntesis de nuevas  $H^+$ -ATPasas. La extracción de protones hacia la pared celular genera una reducción del pH (acidificación) lo que a su vez activaría proteínas que rompen enlaces de hidrógeno entre los constituyentes de la pared. Los candidatos más probables para este papel inicial son las expansinas, proteínas de pared que favorecerían inicialmente a la plasticidad de la célula. Otras enzimas hidrolíticas actuarían posteriormente y la célula crecería como resultado de la presión de turgor generada por la vacuola y por el depósito de nuevos materiales, cuya síntesis y transporte también parecen ser regulados por auxinas (Hager, 2003). Las auxinas también inducen la síntesis de giberelinas, hormonas que promueven el crecimiento del tallo, por lo que las auxinas también estimularían el crecimiento en forma indirecta.

### **1.1.9 Mecanismos de acción de las citocininas.**

Las citocininas son las hormonas vegetales de la cual existe menor información en cuanto a biosíntesis, metabolismo y transducción de señales. Sin embargo, recientemente se han descrito algunos mecanismos de acción. Las citocininas se encuentran tanto en el apoplasto como en el simplasto, de manera que se asume la existencia de transportadores específicos a este nivel. Se ha demostrado que estas hormonas son primeropercebidas por proteínas histidina-quinasa y que la transducción de la señal por ellas provoca una fosforilación en su porción conservada y con transferencia del grupo fosforilo a un regulador de respuesta más distante, regula a su vez regula la cascada de señales río abajo (Kakimoto, 2003). La primera de estas proteínas tipo histidina-quinasa fue identificada en Arabidopsis, citokinina-quinasa (CKI1), la que al ser sobre expresada en Arabidopsis produce efectos típicos asociados a citocininas en ausencia de estas hormonas (Kakimoto, 2003). Recientemente se han descubierto otros receptores tipo histidina-quinasa más genuinos y específicos que el anterior mencionado, denominados CRE1/WOL/AHK4, AHK2 y AHK3, las que iniciarían la transferencia del fosfato a nivel intracelular y que actuarían como las tres proteínas receptoras de membrana en el modelo de Arabidopsis (Yamada H, 2001); (J., 2002). En esta especie se han continuado los estudios sobre la acción de citocininas debido a que su genotipo está bien conocido. Existen 22 genes involucrados en respuestas reguladoras para genes del tipo ARR. Entre ellos se distinguen los grupos, ARR tipo A (A-ARR) y ARR tipo B (B-ARR), cada uno con 11 miembros. Estudios recientes indican que las citocininas ligadas a los 3 receptores de membrana activarían primero los genes B-ARR, los que inmediatamente activarían los A-ARRs. La activación ocurriría primero a través de la fosforilación de unas proteínas AHPs (proteínas H<sub>Pt</sub>), las que a su vez transfieren el grupo fosforilo a los A-ARRs y B-ARRs en el núcleo. Estos provocarían finalmente la activación transcripcional de otros genes blanco, produciéndose los efectos específicos de citocininas (Aoyama T & Oka, 2003); (Heyl, 2003); (Hutchison, 2002).

### **1.1.10 Giberelinas**

Las giberelinas (GAs) son hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicas involucradas en varios procesos de desarrollo en vegetales. A pesar de ser más de 100 el número hallado en plantas, sólo son unas pocas las que demuestran actividad biológica. Su descubrimiento en plantas se remonta a la época de los años 30, cuando científicos japoneses aislaron una sustancia promotora del crecimiento a partir de cultivos de hongos que parasitaban plantas de arroz

causando la enfermedad del “bakanoe” o “subida de las plantas”. El compuesto activo se aisló del hongo *Gibberella fujikoro* por Eichi Kurosawa en 1926 por lo que se denominó “giberelina”. El efecto del hongo sobre las plantas afectadas consistía en un notable incremento en altura, aunque con fuerte merma en la producción de grano. El mayor crecimiento se debió al alto contenido de este factor de crecimiento producido por el ataque fúngico (Malonek S, 2005).

### **1.1.11 Mecanismo de Giberelinas**

Mecanismos de acción A nivel de la elongación en tallos: Estimulan fuertemente la división y elongación celular en la porción sub-apical de los tallos y también en el meristema intercalar. Los mecanismos de división y elongación de la pared no están aún bien aclarados a nivel celular, pero se asume que el efecto de “soltura” de la pared celular sería diferente a la ejercida por la auxina (o reguladores de este tipo), aunque sería un efecto complementario. A nivel de la movilización de reservas en semillas al inicio del proceso de germinación. GAs endógenas o exógenas, aplicados en embriones en proceso de germinación, causan la producción de  $\alpha$ -amilasas y otras enzimas hidrolíticas en las células de la capa de aleurona dispuesta por debajo de la cubierta seminal, encima del endosperma y embrión contiguo. Con ello se produce un proceso degradativo en las células del endosperma una vez que el almidón se desdobra en sus azúcares simples que serán usados como fuente de energía por las células del embrión, ahora en desarrollo.

### **1.1.12 Modelo biológico: *Diospyros anisandra***

*Diospyros anisandra* S.F. Blake de la familia *Ebenaceae* es un arbusto o árbol pequeño de hasta 6 metros de altura, posee ramas cortas, hojas subfasciculadas en las puntas de las ramas, frutos globosos, de aproximadamente 1 cm de diámetro, negros y brillantes cuando están maduros (Méndez et al, 2012) . Parte de las especies del género es rico en componentes de tipo quinona es *Diospyros*, de aproximadamente 500 especies, ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales (Mallavadhani, 1998) . Como parte de la evaluación fitoquímica y farmacológica en especies de *Diospyros*, se ha descrito previamente la evaluación antimicrobacteriana y antiviral de *Diospyros anisandra*, una planta endémica de Yucatán, México, donde se usa en la medicina tradicional maya para tratar infecciones de la piel (Borges-Argáez et al., 2007).

**Tabla 1.1. 1.** Taxonomía de *Diospyros anisandra*

<b>Orden</b>	Ericales
<b>Familia</b>	Ebenaceae
<b>Subfamilia</b>	Ebenoideae
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Genero</b>	Diospyros
<b>Especies</b>	<i>Riojae, kaki, inconstans, lotus, malabárica, melanoxylon, pentámera, etc.</i>

### 1.1.13 Características de las semillas

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores terrestres y acuáticas (Niembro, 1988) y surge como resultado de una serie de procesos biológicos que se inician con la floración y concluyen con la maduración del fruto (Nitsch, 1995). Las semillas desempeñan una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, la regeneración de los bosques y la sucesión ecológica. Aunque las semillas son por lo general el material comúnmente utilizado para la producción de plantas

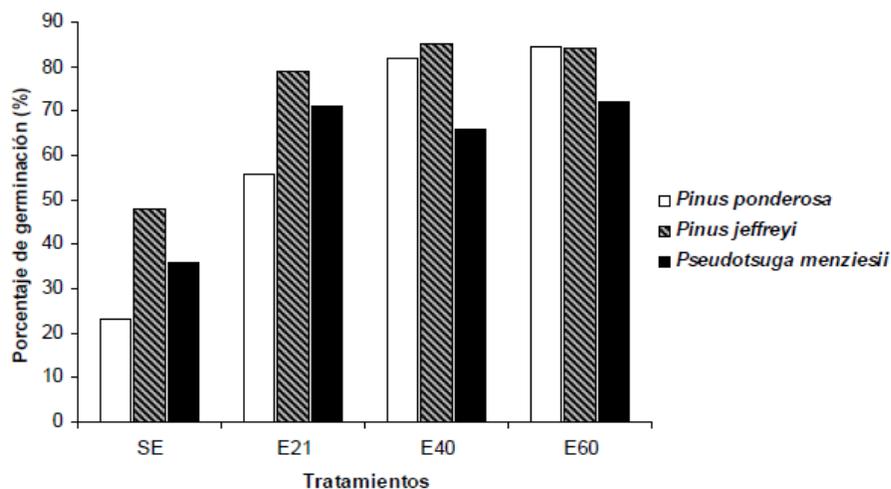
con fines de plantación, no es el único. Existe un grupo de materiales reproductivos denominado germoplasma como son las semillas, las yemas, las plántulas y las estacas (Cromwell et al., 1996). Sin embargo, las semillas son las depositarias de material genético invaluable que es necesario conocer e investigar (Rodríguez et al, 2012). El tamaño de las semillas tiene una gran variación entre especies de plantas. La forma está determinada por el tipo de óvulo de origen y por los patrones de crecimiento, desarrollo, diferenciación y posición guardada dentro del fruto (Niembro, 1988). Los recursos de una planta para producir semillas son limitados. Así se tiene que la planta produce un gran número de semillas pequeñas o en un número menor de semillas grandes. El número de semillas producido y su tamaño afectan la capacidad de sobrevivencia y perpetuación de las especies. Por ejemplo, las plantas que producen muchas semillas pequeñas se diseminan más ampliamente y tienen mayores oportunidades de encontrar un sitio favorable para germinar y crecer (Vázquez et al, 1997). Sin embargo, su tamaño pequeño aporta poco al

crecimiento de la nueva planta y su desarrollo depende de los recursos disponibles en el medio. Por lo que sólo una pequeña fracción de semillas sobrevive. Por otra parte, las semillas grandes se producen en menor número y frecuentemente se diseminan a distancias más cortas. Cuentan con más recursos para iniciar su crecimiento y establecimiento, así que se producen plántulas más grandes y resistentes, con mayor superficie de raíces y de hojas (Vázquez et al, 1997).

Las semillas de *Diospyros ebenaster* Retz. son ovoides, planas-convexas, estenospérmicas en ocasiones, con testa lisa de color marrón-oscuro, el hilo se sitúa en el ápice del eje de la semilla, la masa de 100 semillas pesa 100.6 g, cada semilla tiene una longitud de 1.9 a 2.5 cm y un diámetro de 1.1 a 1.6 cm (Silva et al., 2010). Por otro lado, las semillas de *Diospyros ebenum* son de color marrón oscuro a negro pardusco, la forma de la semilla es oblonga a globosa, la longitud es de 0.79 cm, un grosor de 0.64 cm y un diámetro de 1.19 cm (Jeyavanan et al., 2016). En el caso de *Diospyros digyna* esta contiene de 3 a 5 semillas, hasta 10 en ciertos casos, planas de 10 a 12 mm de largo, de color marrón envueltas por una membrana translúcida (González & Orejuela, 2016). Por último, el estudio de semillas de *Diospyros buxifolia*, indico que cada fruto contenía una sola semilla, que era de color rojizo, cuya longitud media de las semillas fueron  $14.82 \pm 1.51$  mm, respectivamente. El diámetro medio de semillas fue de  $7,32 \pm 1,21$  mm, el peso medio de semillas fue de  $0.56 \pm 0.19$  g.

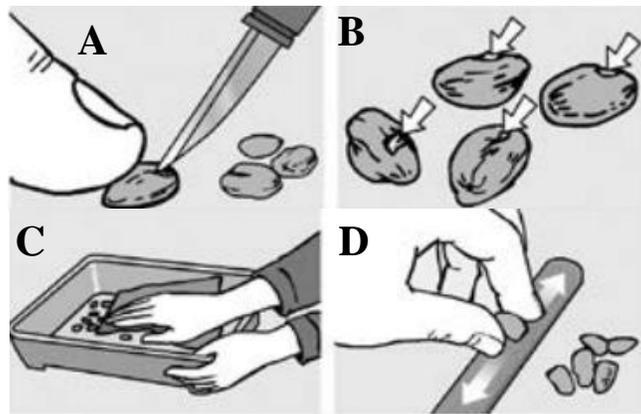
#### **1.1.14 Tratamientos pre-germinativos**

Los tratamientos pre-germinativos, son todos aquellos procedimientos necesarios para romper la latencia de las semillas, esto es, el estado en que se encuentran algunas tal que, estando vivas, no son capaces de germinar sino hasta que las condiciones del medio sean las adecuadas para ello (Donoso, 1979); (Arnold, 1996). Los métodos pre-germinativos más comunes son los siguientes: Estratificación: Este tratamiento se utiliza para romper la latencia fisiológica, y consiste en colocar las semillas entre estratos que conservan la humedad, comúnmente arena o bien turba o vermiculita, en frío o calor (Patiño et al, 1983);(Hartmann y Kester, 1977); (Hartmann y Kester, 1988); (Donoso, 1993). La estratificación fría es aquella donde se mantienen las semillas a temperaturas bajas (4 a 10 °C, Ver en la figura 1 a modo de ejemplo), asemejando a las condiciones de invierno, por un período que oscila entre 20 y 60 días, llegando inclusive hasta 120 días. (Ordoñez 1987; FAO, 1991, García, 1991).



**Figura 1.1. 1.** Pretratamiento y ensayos de germinación de semillas de tres especies de pino. En función de los ensayos realizados se deduce que con las especies *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus jeffreyi* es conveniente que se realicen estratificaciones en frío que superen los 21 días recomendados, dentro del rango de 40 a 60 días de estratificación a baja temperatura (2 a 3° C) (Varela et al, 2010).

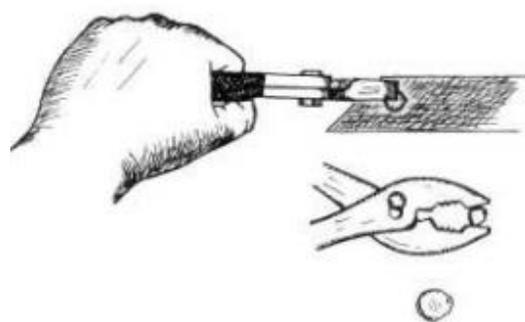
b) Escarificación: Un gran número de especies forestales no germinan debido a que la testa o cubierta seminal, es dura e impide la entrada de agua (latencia física), y la semilla no germina al menos que esta sea escarificada. Así, la escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases (Fig. 1.1.2).



**Figura 1.1. 4.** Escarificación. A) tratamiento con cuchillo B) la semilla esta rayada, cortada, etc. C) semillas lijadas con lija de grado medio D) lijado con lima. (INATEC, 2017)

Esta se divide en dos:

- 1) Mecánica: Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo o pinzas (Fig.3). Si es a gran escala se utilizan maquinas especiales como tambores giratorios recubiertos en su interior con papel lija, o combinados con arena gruesa o grava. En el caso de tratar grandes cantidades de semillas, se puede utilizar una hormigonera con grava o arena en su interior, o bien en un tambor forrado en su interior con material abrasivo (ej.: lija, cemento) o dotados de discos abrasivos giratorios (Kemp, 1975, y Goor y Barney, 1976, FAO 1991; García, 1991). Se han obtenido resultados óptimos con este tratamiento en semillas de Maitén, a las que se les ha eliminado el arilo mediante frotación con arena logrando un 81% de germinación (Cabello y Camelio, 1996).



**Figura 1.1. 5.** Esquema mostrando el proceso de escarificación mecánica mediante el uso de pinza. (tomado de Arriaga et al, 1994).

c) Hormonas y otros estimulantes químicos: Existen compuestos que estimulan la germinación, entre los más usados están: nitrato de potasio, tiourea, etileno, ácido giberélico (GA3), citocininas, entre otros. Todos estos tipos de sustancias se emplean a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, dependiendo de la especie de que se trate (Varela et al, 2010).

**Tabla 1.1. 2** Tratamientos pre-germinativos para algunas de las especies de importancia forestal de la región andino Patagonia (Varela et al, 2010)

especie	Tratamiento pre-germinativo
<b>Ciprés de la cordillera</b> <i>Austrocedrus chilensis</i>	Estratificación 4-8 semanas a 0-4 ° C en arena húmeda o bien realizar la siembra temprana a fin de que la semilla se estratifique en el mismo almacigo.
<b>Araucaria</b> <i>Araucaria araucana</i>	Las semillas pierden rápidamente su poder germinativo por lo que se deben sembrar directamente ni bien se cosechan. Estas pueden estratificarse luego del sembrado en arena húmeda por 90 días en cajones o bolsas
<b>Notro</b> <i>Embothrium coccineum</i>	La semilla se conserva bien en bolsas de polietileno transparente y en heladeras en seco. Antes de sembrar las semillas se colocan 72 horas en agua fría.
<b>Avellano</b> <i>Gevuina avellana</i>	Puede estratificarse en arena húmeda durante el invierno para evitar que las semillas pierdan su poder germinativo por deshidratación
<b>Maiten</b> <i>Maytenus boaria</i>	Escarificación con agua fría y arena para eliminar el arilo que es una película rojiza que recubre la semilla y retarda la germinación.
<b>Radal</b> <i>Lomatia hirsuta</i>	Conservar la semilla en heladera o en lugar fresco con una temperatura entre 2-5 °C en bolsas de nylon o polietileno de 50 micrones de espesor hasta la época de siembra.
<b>Arrayan</b> <i>Luma apiculata</i>	Una vez lavadas las semillas conviene sembrarlas en bandejas y luego enterrarlas unos 60 días, necesarios para la estratificación.
<b>Coihue</b> <i>Nothofagus dombey</i>	Se puede sembrar temprano o bien se puede optar por estratificar en arena húmeda entre 4-6 semanas.
<b>Roble pelín</b> <i>Nothofagus obliqua</i>	La semilla se conserva al frío en bolsas de polietileno. La estratificación puede hacerse en arena húmeda a 4° C durante 30 días o bien 85 días a 5°C. En el mes de septiembre antes de la siembra se colocan en agua 3 a 4 días eliminando las semillas que flotan. Algunos autores recomiendan remojar la semilla en ácido giberélico (GA3) en 50 a 200 mg/l por 24 horas.
<b>Raulí</b> <i>Nothofagus nervosa</i>	La semilla se conserva al frío (2 a 5 °C) en bolsas de polietileno a 8% de humedad. La estratificación se hace en arena húmeda por 45 días a 6°C. En el mes de septiembre antes de la siembra se colocan en agua fría por 48-72 horas eliminando las semillas que flotan
<b>Lenga</b> <i>Nothofagus pumilio</i>	La semilla se conserva al frío y en lugares secos. Estratificación en arena húmeda por 45 días a 2° C. Antes de la siembra se colocan en agua fría por 48-72 horas.
<b>Nire</b> <i>Nothofagus antarctica</i>	La estratificación puede hacerse o bien en arena húmeda 1 4°C durante 30 días o en arena húmeda a 2°C durante 45 días.
<b>Pino ponderoso</b> <i>Pinus ponderosa</i>	Colocar las semillas que se van a sembrar en un tambor con agua fría durante 48 horas: al cabo de ese tiempo descartar las semillas que flotan (semillas vanas). Sacar las semillas y dejarlas escurrir. Almacenar las semillas en heladera a temperaturas entre 2-5 °C durante 3-4 semanas.
<b>Pino Oregón</b> <i>Pseudotsuga mensiezi</i>	
<b>Pino murrayana</b> <i>Pinus contorta</i>	

### 1.1.15 Latencia y germinación de las semillas en *Diospyros* spp.

El estado de latencia o letargo es definido como la incapacidad de una semilla intacta y viable, de germinar bajo condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuadas para la germinación. En particular, en el sector forestal se utiliza la palabra latencia, la cual proviene del latín “latensis” y significa oculto, escondido o aparentemente inactivo para referirse a esta incapacidad de la semilla a germinar, la cual puede constituir un problema, por ejemplo, para los programas de producción de plántulas en vivero. La latencia se establece durante la formación de la semilla, y posee una importante función que consiste en restringir la germinación en la planta madre antes de su dispersión en el campo. Además, se considera que la latencia es una adaptación que contribuye a la supervivencia del individuo, ya que restringe la germinación cuando los factores ambientales son desfavorables para el desarrollo de la plántula (Varela et al, 2010). En muchas especies de angiospermas, los cotiledones de los embriones se agrandan y se llenan con nutrientes, absorbiendo el endosperma en este proceso. En otras especies los cotiledones no crecen y el endosperma ocupa la mayor parte de la semilla (especies de *Diospyros*) (Jara, 1996). *Diospyros ebenum* Koenig se identifica como una especie en peligro, por tanto, la conservación de la especie es vital debido a su germinación retardada, es por ello que sean aplicado tratamientos de estratificación de semillas en caliente y escarificación química, para interrumpir el estado de latencia de la semilla (Jeyavanan et al., 2016). En el caso de *Diospyros lasiocalyx* los tratamientos de escarificación mecánica y química probados no fueron efectivos para romper la dormancia, la baja tasa de germinación sugiere que se deben probar otras estrategias (Ibanes et al., 2019). Por otra parte, para *Diospyros digyna* recomienda remojar la semilla en agua 24 horas antes de la siembra, para romper la dormancia de las semillas y almacenarlas a una temperatura menor de 21 °C (González & Orejuela, 2016). Así mismo, en *Diospyros kaki* L. los resultados mostraron que algunas de las semillas estratificadas comenzaron a germinar 30 días después de la siembra, mientras que las semillas no estratificadas comenzaron a germinar 40 días después de la siembra. Esto indicó que la estratificación en frío acelera el proceso de germinación de la semilla y requiere un mínimo de 30 días para romper la latencia (Wangdi & Gurung, 2014). Por último, en *Diospyros riojae* se obtuvo la germinación con éxito extrayendo el embrión en comparación con la estratificación mecánica y química, logrado un 60% en la germinación (Sánchez et al, 2002).

## 1.2 JUSTIFICACION

De las diferentes especies de *Diospyros* que existen en la península de Yucatán, muy pocas se utilizan para la extracción de compuestos con actividades biológicas. *D. anisandra* es una de las principales productoras de quinonas y terpenos, en las hojas contienen plumbagina, fitol y Lupeol, entre otros aún sin identificar. La corteza del tallo es la parte más estudiada contiene plumbagina; droserona (naftoquinona); 3,3-biplumbagina (binaftoquinona); maritinona, epóxido de zeylanona chitranona, cis-isoshinanolona, 2,3-epoxiplumbagina; eliptinona, cadinol; estigmasterol. Por último, la raíz y hoja contiene de nuevo plumbagina; ácido hexadecanoico; estigmasterol;  $\beta$ -sitosterol; lupeol, ácido 9,15-octadecadienoico y  $\alpha$ -tocoferol. Las investigaciones con estos compuestos van desde antituberculosas y citotóxicas contra células de mamíferos, donde, las quinonas de la corteza del tallo mostraron la mayor actividad contra ambas cepas de *M. tuberculosis*. Otro de los componentes más importantes es el epóxido de zeylanona (ZEP), que inhibe la replicación de los virus de influenza A y B, en las etapas tempranas y medias del ciclo de replicación, al mismo tiempo se reportó que afecta su distribución intracelular y reduce el rendimiento viral. Sin embargo, la carencia de cultivares establecidos de plantas medicinales, el deterioro ambiental, la recalcitrancia, la baja producción de semillas, el lento crecimiento y la falta de estudios científicos, para el cultivo, provoca la pérdida o desaparición de estas importantes especies. A partir de esto, la falta de un control en la siembra tradicional y de manera *in vitro*, impide el aprovechamiento integral de esta especie y su potencial de generar fitomedicamentos. Este trabajo tiene como objetivo principal establecer los protocolos de descontaminación, germinación y micropropagación de tejido vegetal, con el propósito de promover la multiplicación masiva de *D. anisandra* como instrumento para la producción y obtención de metabolitos secundarios de interés farmacológico en etapas tempranas de crecimiento de la planta sin dañar su estado nativo. Así mismo cabe mencionar que este es el primer informe sobre el establecimiento de las condiciones de micropropagación, para el cultivo *in vitro* de *D. anisandra*.

### 1.3 HIPOTESIS

El establecimiento de cultivo *in vitro* favorece la obtención de metabolitos secundarios en periodos cortos de tiempo sin tener que llegar a la madures de la planta adulta.

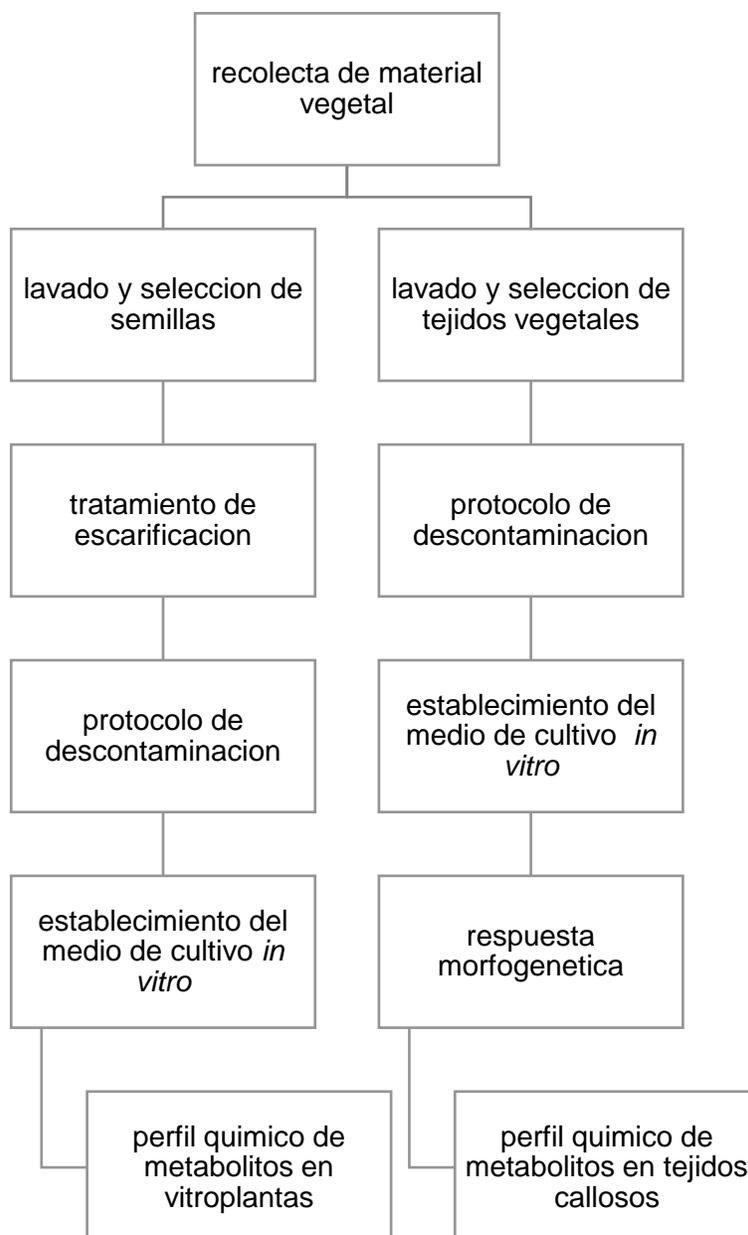
#### 1.4 OBJETIVO GENERAL

- Establecer un método de regeneración *in vitro* de la planta *D. anisandra*.

### 1.5 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer un protocolo vía morfogénesis *in vitro* a partir de semillas y segmentos de hoja de *D. anisandra*.
- Caracterizar la respuesta de regeneración de los diferentes explantes.
- Identificar el perfil de metabolitos secundarios de las plantas y de tejidos en condiciones de cultivo *in vitro*.

## 1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



**CAPITULO 2. CULTIVO *IN VITRO* A PARTIR DE SEMILLAS DE *D. anisandra*.****2.1 INTRODUCCIÓN**

La germinación es la primera fase crítica del establecimiento de la planta y puede retrasarse o verse obstaculizada por varios factores. Primero, el bloqueo de la germinación o latencia puede ser inherente a la semilla misma y puede ser de muchos tipos, a saber, morfológico, fisiológico, físico y una combinación de estos tipos (Baskin & Baskin, 2001). Cada especie en la naturaleza tiene su propio comportamiento de germinación que incluye, entre otras cosas, las condiciones necesarias para romper la latencia y promover la germinación de semillas no latentes (Liu et al., 2011). Algunas sustancias conocidas como reguladores del crecimiento de las plantas pueden mejorar la germinación de las semillas y promover el crecimiento de las plántulas. (Peixoto, et al., 2011). Los reguladores del crecimiento de las plantas son compuestos químicos o naturales biológicamente activos, que pueden cesar o disminuir el impacto de factores adversos en el rendimiento de la semilla (Silva, et al., 2014). Dependiendo del modo de acción, actúan estimulando el metabolismo de las enzimas hidrolíticas que controlan las etapas de división celular (O'brien, et al., 2010), lo que lleva a la germinación de la semilla a través de la superación de la latencia (Külen, et al., 2011). Según Dantas et al. (2012), durante las etapas iniciales del desarrollo de la planta, las giberelinas promueven el crecimiento de las raíces, permitiendo una rápida recuperación después del estrés hídrico, aumentar la resistencia a insectos, plagas, enfermedades y nematodos y promover una rápida propagación, mejorando la absorción de nutrientes y el rendimiento de los cultivos. Las giberelinas están presentes en las semillas como una hormona del espectro, como promotora en una serie de procesos de desarrollo vegetal, incluida la germinación de semillas, activando el crecimiento vegetativo del embrión, movilizándolo las reservas de endospermo y actuando en el debilitamiento de la capa de endospermo que rodea el embrión, favoreciendo así el crecimiento (Taiz et al., 2017). En este capítulo se describen las condiciones controladas a las que se sometieron las semillas, para establecer el cultivo *invitro* de *D. anisandra*, partiendo desde la maduración del fruto y semilla, en seguida la desinfestación y por último el diseño de los medios de cultivo para la siembra del material vegetal.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Colecta de material biológico y morfología fruto y semillas.**

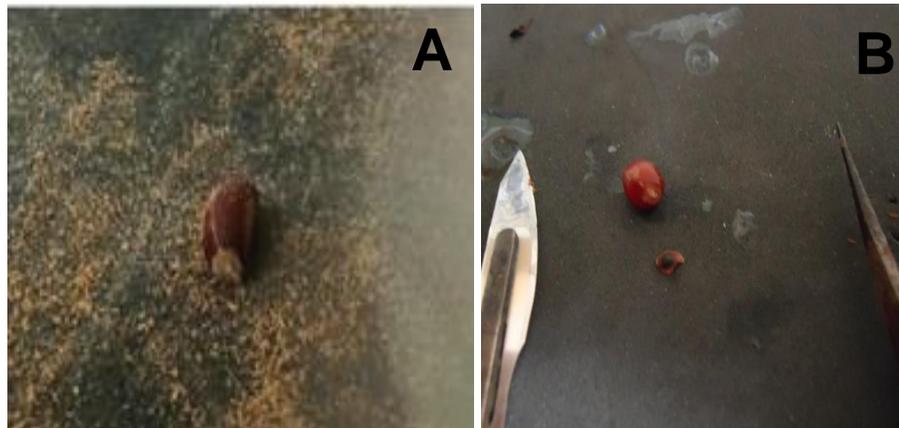
El material biológico fue colectado en un predio Particular localizado en la carretera a Dzzytia Yucatán, estos frutos fueron cortados semimaduros de color verde y se esperó siete días, para que maduraran en el laboratorio, mediante bolsas de papel periódico a Oscuridad a una temperatura de 25°C. Se utilizaron 50 frutos y 100 semillas, para medir la longitud y diámetro con ayuda de un calibrador o vernier.

### **2.2.2 Estratificación de semilla**

Para la estratificación las semillas se extrajeron del fruto maduro, se lavaron con agua corriente para quitar la pulpa del fruto, posteriormente fueron sometidas a refrigeración a una temperatura de 4 °C durante 21 días en papel periódico, de modo que la semilla interrumpiera el estado de dormancia. Esto de acuerdo a los diversos artículos realizados con la especie; *Diospyros kaki*, *Diospyros buxifolia* (Wangdi & Gurung, 2014); (Hamalton et al., 2020).

### **2.2.3 Escarificación de semilla**

Para la escarificación se aplicaron dos métodos, en primer lugar, se utilizó una lija de grado medio de #120, para lijar la parte superior, inferior y por los costados de 50 semillas, con el fin de adelgazar el endospermo y el medio de cultivo tenga mayor contacto con el embrión, en consecuencia, de acortar el tiempo de germinación figura 2.2.2.A. Las semillas estarán listas para pasar a la descontaminación. Para el segundo método se utilizó un bisturí esterilizado y se cortó por la parte superior 50 semillas dejando expuesto al embrión con el medio de cultivo. La semilla fue previamente descontaminada en una solución de hipoclorito y agua estéril, posteriormente sembradas en los medios diseñados. Figura 2.2.2A.



**Figura 2.2.3.** A) Semilla escarificada con ayuda de una lija. B) semilla cortada por la parte superior con bisturí en semilla esterilizada.

#### 2.2.4 Diseño y aplicación del protocolo de descontaminación de material biológico.

Para el establecimiento aséptico de la semilla se evaluó las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en combinación con tween 80° el cual se agregó 1 $\mu$ L por mL de solución. Se utilizaron 2 lotes de 100 semillas de *D. anisandra*; se extrajo del fruto y se enjuagaron en agua durante 10 minutos en agitación constante; posteriormente se pasaron por alcohol etílico al 70% (v/v) por 5 minutos e inmediatamente después, fueron sumergidas en una solución con hipoclorito de sodio comercial al 20%, 25% y 30% (v/v) y agua destilada al 80%, 75% y 70% por 20, 25 y 30 minutos en agitación constante, se enjuagaron con agua estéril en 3 ocasiones; todo esto se realizó en campana de flujo laminar en condiciones estériles, las semillas fueron sembradas. A 30 semillas se les aplicó el mismo método anterior, pero con la diferencia que se extrajeron los embriones. Para extraer el embrión se dejó remojando la semilla esterilizada en agua estéril por 48 horas, con el fin de que se ablande el endospermo y el embrión sea más fácil de sacar. Finalmente, fueron sembrados en los medios de cultivo. Por último se d

**Tabla 2.2.4.** Tratamientos para la descontaminación de semilla con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de exposición

Hipoclorito de sodio	Numero de semillas	Agua estéril	Tiempo
30%	50	70	30
25%	50	75	25
20%	50	80	20



**Figura 2.2. 4.** Descontaminación. Semillas descontaminándose en solución de hipoclorito de sodio y agua estéril.

### **2.2.5 Diseño y aplicación de medios de cultivo para la germinación de semillas de *D. Anisandra*.**

Se aplicaron diferentes medios utilizando como base las sales de Murashige Skoog MS al 100 y 50%, agua estéril en algodón y MS suplementado con ácido Giberelico, como se presenta en la tabla 2.2.1. El GA3 se aplicó para romper la latencia a la producción y pueda germinar en menor tiempo. A continuación, se describe el procedimiento que se empleará para la elaboración de los medios de cultivo: en una parrilla con agitación magnética se colocó un frasco de laboratorio, se adiciono 1000 mL de agua destilada, luego se suplemento con 10 mL de cada Stock (I al VII) de sales inorgánicas para medio MS, 10 mL del stock de vitaminas en forma de tiaminas y 30 g/L de sacarosa. El pH del medio se ajustó con potenciómetro a 5.8 con la adición de NaOH 1M y/o HCl 1M, por último, se le añadió 8 g/L de agar para micropropagación y se dispensaron en frascos de vidrio y cajas Petri (aproximadamente 20 mL de medio de cultivo por cada uno). Los frascos con medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C a 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos y se guardaron a temperatura ambiente para su posterior uso. MS al 50%. En una parrilla con agitación

magnética se colocó un frasco de laboratorio, se adiciono 1000 mL. de agua destilada, luego se suplemento con 5 mL de cada Stock (I al VII) de sales inorgánicas para medio MS, 10 mL del stock de vitaminas en forma de tiaminas y 30 g/L de sacarosa. El pH del medio se ajustó monitorizado con potenciómetro a 5.8 con la adición de NaOH 1M y/o HCl 1M, por último, se le añadió 8 g/L de agar para micropropagación y se dispensaron en frascos de vidrio y cajas Petri (aproximadamente 20 mL de medio de cultivo por cada uno). Los frascos con medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C a 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos y guardados a temperatura ambiente para su posterior uso. MS suplementado con ácido giberélico. en una parrilla con agitación magnética se colocó un frasco de laboratorio, se adiciono 1000 mL de agua destilada, se suplemento con 10 mL de cada Stock (I al VII) de sales inorgánicas para medio MS, 10 mL del stock de vitaminas en forma de tiaminas, 30 g/L de sacarosa y ácido giberélico, en diferentes concentraciones las cuales son 2, 5, 10, 20 y 30 mg/L. el pH del medio se ajustó monitorizado con potenciómetro a 5.8 con la adición de NaOH y/o HCl 1M, por último se llevaron los medios con frascos de vidrio a esterilizar en autoclave a 121 °C a 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos y guardados a temperatura ambiente para su posterior uso.

**Tabla 2.2. 5.** Tratamientos de semilla. Lote de 200 semillas en medios MS y MS suplementado con GA3

Nombre de tratamiento	Número de semillas sembradas	Medio de cultivo
T0	25	agua estéril
T1	25	MS 100%
T2	25	MS 50%
TG	25	2mg/L
TG5	25	5mg/L
TG10	25	10mg/L
TG20	25	20mg/L
TG30	25	30mg/L

**2.2.6 Diseño experimental recopilación de datos y análisis estadístico**

Los datos de los estudios de frutos y semillas se expresan como Media  $\pm$  mediante un análisis ANOVA. Para los experimentos de esterilización de la superficie de la semilla, se mantuvieron 3 repeticiones, para cada tratamiento. La germinación de la semilla se registró hasta los 60 días y luego se calculó el porcentaje de germinación de la semilla.

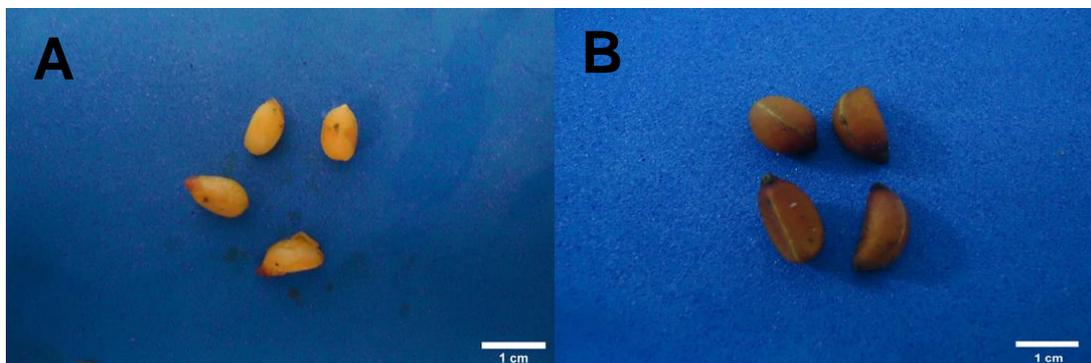
## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 morfología de frutos y semillas

Se examinaron los caracteres morfológicos del fruto y semilla durante el proceso de maduración. los frutos frescos eran globosos aproximadamente de 1 cm de diámetro, la longitud media era de 2 cm, de color verde cuando están semimaduros, a los siete días la coloración del fruto fue rojiza indicando la maduración por lo que la extracción de la semilla es más fácil, es importante mencionar que cuando el fruto tenía una coloración oscura la semilla se mohecía y se pegaba con la pulpa, dificultando su extracción, en la figura 2.3.1. se observa la coloración del fruto. La semilla madura es de color marrón, forma ovoide de aproximadamente 9 mm de largo con un diámetro de 5 mm. Como se muestra en la figura 2.3.2.



**Figura 2.3. 1.** Maduración del fruto. La Coloración del fruto es el indicativo de la maduración de la semilla



**Figura 2.3. 2.** Pretratamiento de semillas. A) semilla de fruto inmaduro. B) semilla de fruto maduro.

### 2.3.2 Descontaminación de semilla.

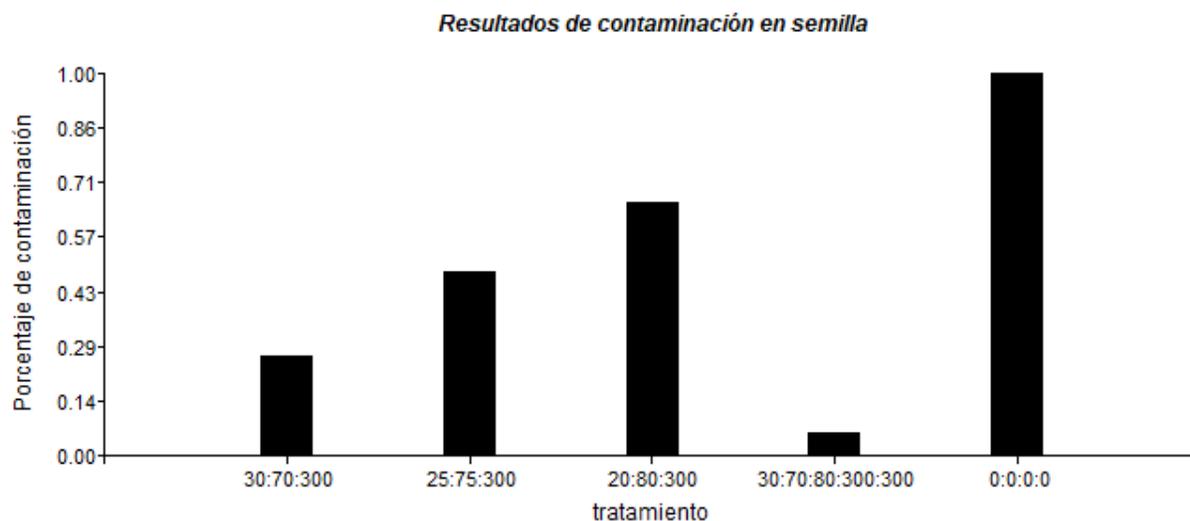
Para la descontaminación de semilla se obtuvieron mejores resultados cuando se aplicó una concentración de 30% de hipoclorito de sodio en agua estéril al 70% por 30 min ya que solo se obtuvo una contaminación del 20% en comparación con las otras concentraciones de 20% y 25% de hipoclorito de sodio; a los 6 días después de la siembra estas tenían presencia de hongo en la mayoría de los medios de cultivo. Es por ello que se añadió un 1µL por cada mL en el medio de antimicótico para la prevención del hongo obteniendo menores porcentajes de contaminación que llegaron al 5% como se muestra en la figura 3.3.4.

**Tabla 2.3 .2.** Resultados de descontaminación. El tratamiento que presento menor contaminación fue la concentración de 30:70 hipoclorito de sodio, Agua estéril.

Tratamiento	Tiempo (min)	Porcentaje de contaminación
Hipoclorito 30%, agua estéril 70 % y tween °80 300µm	30 minutos	20%
Hipoclorito 25%, agua estéril 75 % y tween °80 300µm	25 minutos	40%
Hipoclorito 20%, agua estéril 80 % y tween °80 300µm	20 minutos	60%
Hipoclorito 30%, agua estéril 70 %, tween °80 1 µm/ml y 1µL de antimicótico por ml de solución	30 minutos	5%



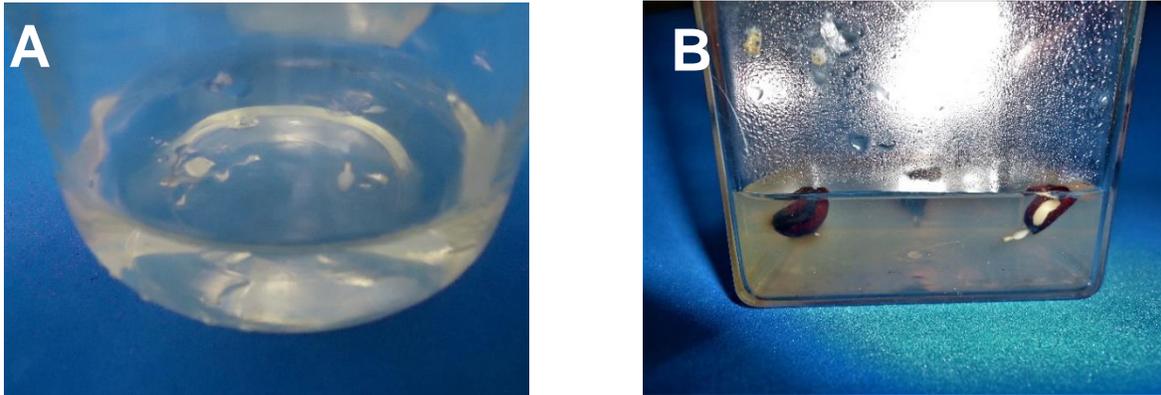
**Figura 2.3.3.** Contaminación. Ejemplo de los tratamientos con porcentajes altos de contaminación en la mayoría de las repeticiones (ver resultados de la tabla 2.3.2).



**Figura 2.3.4.** Resultados de contaminación. Se añadió un  $\mu\text{L}$  por mL de solución de antimicótico para prevenir la contaminación por hongo que se tenía en los tratamientos reduciendo hasta un 5% en la contaminación.

### 2.3.3 Escarificación de semillas

Para los ensayos de escarificación de semillas de *D. anisandra* se observó la salida de la radícula a los 5 días y un mayor porcentaje de germinación en el segundo tratamiento que consistía en diseccionar la parte superior con un bisturí estéril, después de la esterilización. Por otra parte, para el primer tratamiento que consistía en lijar la semilla antes de la descontaminación presento un menor porcentaje de germinación, probablemente a la filtración del hipoclorito de sodio hasta el embrión, el cual pudo provocar la muerte. Así mismo para la extracción del embrión no presento respuesta debido a la dificultad de la extracción ya que la semilla era muy pequeña y el endospermo muy rígido, de modo que se daña al embrión.



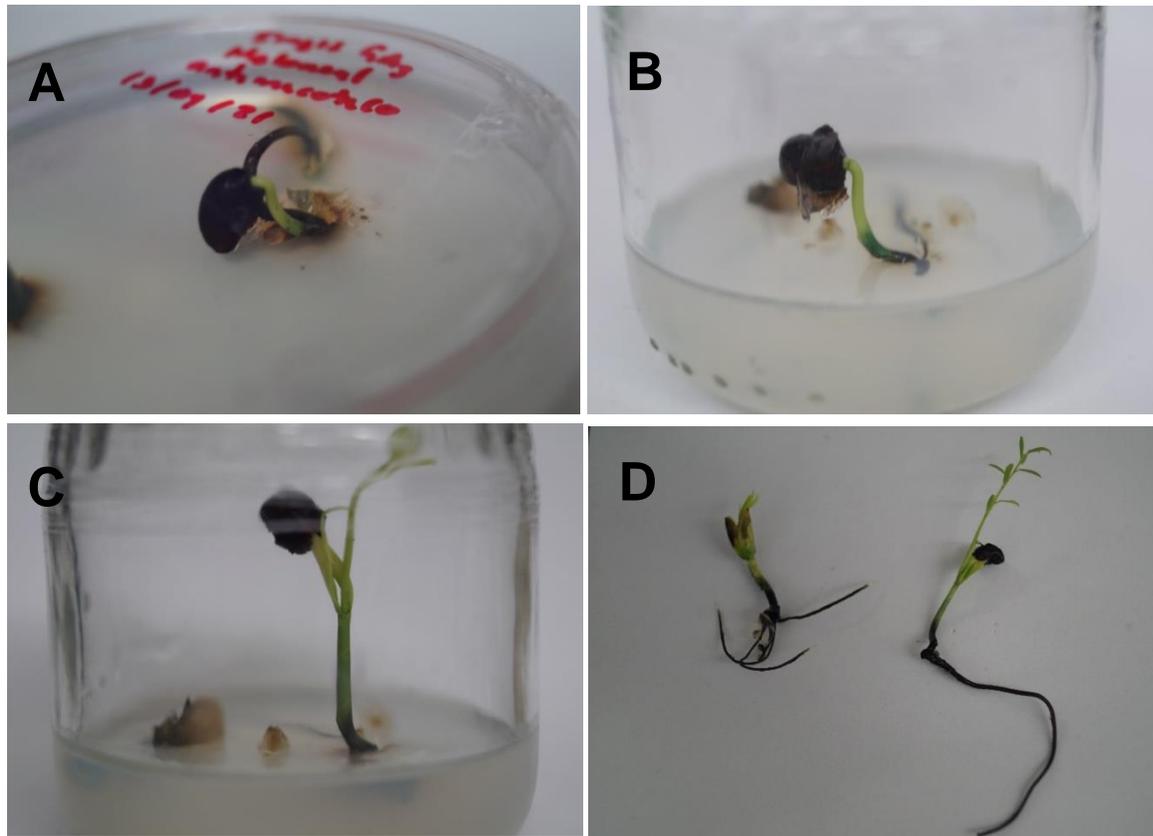
**Figura 2.3. 5.** Escarificación de semillas. A) embrión extraído de semilla en medio MS suplementado con 2 mg/L de GA3. B) semilla lijada en medio MS suplementado con 2 mg/L de GA3.

### 2.3.3 Germinación de semilla

Para la germinación los mejores tratamientos fueron los suplementados con GA3 20 mg/L presentado mayor porcentaje de germinación a los 20 días después de la siembra con presencia de raíz vigorosa de 4 cm y crecimiento del coleóptilo, los medios MS enriquecido y MS al 50% el crecimiento no fue homogéneo, debido al poco desarrollo de la radícula que no paso de 1 cm de largo. Por tanto, a los 40 días después de la siembra los tratamientos con GA3 ya presentaban plantas desarrolladas con hojas verdaderas, tallo vigoroso, raíz oscurecida y vigorosa, para los tratamientos de solo MS algunas radículas se ennegrecieron indicando oxidación y necrosamiento. Finalmente, a los 60 días de evaluación se obtuvo el 72% de germinación, para la concentración de 20 mg/L resultando el mejor tratamiento ya que se obtuvieron dieciocho vitroplantas de aproximadamente 4 cm de alto y raíz de 4 cm. Se tomaron 60 días ya que fue el tiempo que tardo en salir la radícula de una semilla sin escarificar. En la figura 2.3.7 muestra el desarrollo de la radícula, el desprendimiento del endospermo, y crecimiento de los cotiledones o hojas no verdaderas hasta presentar las hojas verdaderas

**Tabla 2.3. 3.** Resultados de germinación. Los tratamientos con GA3 20 y 30 mg/L se obtuvo el mayor porcentaje de germinación con el 72% a los 40 días después de la siembra. Se sobresalta los resultados con mejores respuestas en escalas de color gris.

Tratamientos	Número de semillas	Tiempo (días)	Semillas germinadas	porcentaje de germinación
T0	25	20	2	8
T1	25	20	2	8
T2	25	20	3	12
TG2	25	20	5	20
TG5	25	20	8	32
TG10	25	20	11	44
TG20	25	20	14	56
TG30	25	20	14	56
T0	25	40	3	12
T1	25	40	2	8
T2	25	40	3	12
TG2	25	40	10	40
TG5	25	40	12	48
TG10	25	40	14	56
TG20	25	40	18	72
TG30	25	40	18	72
T0	25	60	7	28
T1	25	60	8	32
T2	25	60	8	32
TG2	25	60	10	40
TG5	25	60	12	48
TG10	25	60	14	56
TG20	25	60	18	72
TG30	25	60	18	72



**Figura 2.3.6.** Germinación de semilla diseccionada en combinación con GA3. A) semilla con 20 días después de la siembra. B) semilla resembrada en un frasco a los 30 días. C) semilla a los 40 días después de la siembra. D) vitroplantas a los 60 días después de la siembra. Con relación a la tabla 2.3.



## **CAPÍTULO 3. MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *D. anisandra* A PARTIR DE CULTIVO DE TEJIDOS**

### **3.1 INTRODUCCIÓN**

El cultivo de tejidos es una técnica de cultivo de células, tejidos u órganos de una planta en condiciones asépticas (libres de todas las formas de microorganismos) y en un ambiente controlado (Pick et al., 2007). Algunos de los beneficios que se obtienen del cultivo de tejidos son obtener nuevas plantas en grandes cantidades en un tiempo relativamente corto, tener las mismas características fisiológicas y morfológicas que su parental, y también se espera obtener plantas nuevas y superiores en calidad de planta (Dalauleng et al., 2020). Según Zulkarnain (2011), el principal beneficio de la técnica del cultivo de tejidos vegetales es la multiplicación de los clones o la propagación masiva de plantas que son genéticamente idénticas entre sí (Zulkarnain, 2011). Las técnicas de cultivo de tejidos tendrán éxito si cumplen los requisitos establecidos; El proceso de esterilización de explantes de material vegetal es una de las actividades cruciales en el cultivo de tejidos. El propósito de la esterilización de explantes es eliminar los microorganismos transportados durante la extracción de explantes que pueden causar contaminaciones que pueden inhibir el crecimiento de explantes (Batti et al., 2020). Las etapas que se llevan a cabo en el proceso de esterilización del explante son la esterilización del ambiente de trabajo, la esterilización de los medios y la preparación de la esterilización del explante (Dalauleng et al., 2020).

Los protocolos de cultivo de tejidos incluyen la inducción de callos en medios que contienen auxinas. La regeneración de los brotes se induce reduciendo el contenido de auxinas y aumentando los niveles de citoquininas en el medio (Mathur & Koncz, 1998). De manera especial se harán consideraciones generales sobre: a) el explante; b) las normas de asepsia; c) los medios de cultivo; y d) las condiciones ambientales de incubación; la interacción de estos factores determinará las respuestas que se obtengan *in vitro*. En este capítulo se describe la metodología de cultivo de tejidos utilizando segmentos de hoja que serán sembrados en medios enriquecidos y suplementados con auxinas y citocininas, para evaluar la respuesta morfogénica, la regeneración de tejido, la colocación del explante en el medio y, por último, la adición de agentes reductores de oxidación en los explantes.

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 Colecta de material biológico.

El material biológico fue colectado en el jardín botánico del Centro de Investigación Científica de Yucatán, Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México; fueron cortadas de árboles adultos ramas con hojas de las cuales se seleccionó yemas axilares, yemas apicales y segmentos de hoja, estos fueron lavados con agua corriente para posteriormente ser usados.

### 3.2.2 Diseño y aplicación del protocolo de desinfección de material biológico.

Para el establecimiento de desinfección de los tejidos *in situ*, se utilizaron cuatro segmentos de hoja, microestacas (yemas axilares y yemas apicales) de *D. anisandra*; se lavaron en agua durante 5 minutos en agitación constante; posteriormente fueron pasados por alcohol etílico al 70% (v/v) durante 5 minutos e inmediatamente después fueron sumergidos en una solución con hipoclorito de sodio comercial, agua estéril 30:70 por 30 minutos y otro de 20:80 por 20 minutos en agitación constante, por último se agregó 1µm de tween por cada ml de la solución, se enjuagaron con agua estéril en 3 ocasiones; todo esto se realizó en campana de flujo laminar en condiciones estériles. Cada tratamiento estaba compuesto por 50 explantes como se muestra en la tabla 3.2.1. Se evaluó la respuesta de regeneración y el porcentaje de contaminación a los 5 días después de la siembra.

**Tabla 3.2.1.** Tratamientos de descontaminación. Se analizaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición de los explantes a la solución.

Hipoclorito de sodio	Numero de tratamientos	Agua estéril	Tiempo
30%	50	70	30
20%	50	80	20
0	50	0	0

### 3.2.3 Diseño y aplicación de medios de cultivo, para tejidos vegetales.

Para la siembra de tejidos se utilizaron plantas *in situ*, se tomaron 4 segmentos de hoja, una yema apical y una yema axilar por cada tratamiento, fueron sembrados en medio MS enriquecido suplementado con 1, 3, 5, 10 mg/L de bencil amino purina (BAP) combinado con 1, 3, 5, 10 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), así como se muestra en la tabla 3.2.2. Como control se utilizó MS enriquecido sin hormonas, se suplemento con 5 mL de cada Stock (I al VII), 30 g/L de sacarosa, 8mg/L de agar de propagación, el pH del medio se reguló a 5.8 con potenciómetro, se esterilizó en autoclave a 121 °C a 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos. Dichos tratamientos serán colocados en una cámara de aclimatización, a una temperatura promedio de 28 + 2°C, con un fotoperíodo de 12 horas y otro de oscuridad total. Las evaluaciones fueron realizadas diariamente durante 60 días y se analizó el porcentaje de contaminación y supervivencia de los explantes.

**Tabla 3.2. 1.** Diferentes concentraciones de los medios de cultivo para la micropropagación y tipos de explante.

Medio de cultivo	Tipo de explante
D1B1	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D3B1	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D5B5	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D10B1	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D1B3	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D5B3	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D10B3	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D1B5	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D3B5	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D5B5	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D10B5	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D1B10	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D3B10	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja
D5B10	Yema axilar y apical, entrenudos, 4 segmentos de hoja

### 3.2.4 Uso de diferentes reductores para controlar la oxidación.

La siembra de explantes fue realizada en cajas Petri que contenían 15 ml de medio de cultivo establecido en la sección anterior, constituido por las sales MS y suplementado con 2,4-D combinado con BAP y el respectivo reductor de oxidación; L-cisteína a 25 mg·L<sup>-1</sup> y PVPP a 250 mg·L<sup>-1</sup>. Dichos tratamientos fueron colocados en una cámara de aclimatización, a una temperatura promedio de 28 + 2°C, con un fotoperíodo de 12 horas y otro de oscuridad total. Las evaluaciones fueron realizadas diariamente durante 60 días y se analizó el porcentaje de oxidación. Para evaluar el nivel de oxidación, se utilizó la siguiente escala cualitativa: poco oxidado (cuando el 10-40 % del volumen del explante presentó señales de oxidación aisladas), medianamente oxidado (para explantes con el 40-70 % del volumen de oxidación y presencia de un halo de color parduzco en el medio alrededor del explante) y muy oxidado (para aquellos explantes donde el 100 % de su volumen se encontraba fenolizado o necrosado y además se observó un halo de color negruzco muy intenso en el medio). Este método de evaluación fue adaptado a los tejidos de hoja de *D. anisandra*, tomando como base el propuesto, para evaluar segmentos de hojas de guayaba cultivados *in vitro* (Ramírez & Salazar, 1998). Con esta escala se calculó el porcentaje de explantes pertenecientes a cada categoría en cada uno de los tratamientos de acuerdo con (Concepción et al., 2005).

### 3.2.4 Análisis de tejidos

En las distintas etapas del procesamiento histológico se realizan modificaciones al protocolo establecido por (Piven et al., 2001). Muestras biológicas de callos y embriones de aproximadamente 0.5 mm<sup>2</sup>-1cm<sup>2</sup> de área, fueron fijadas en una solución de F.A.A.; durante 96 horas (Berling, 1976). Que consiste de formaldehído, ácido acético glacial, etanol al 95 % y agua destilada. 10: 5: 50 :35 partes respectivamente. Posterior a la fijación se lavaron los tejidos con agua destilada, esto permitió eliminar los residuos del fijador y fueron lavados por tres ocasiones con un tiempo de media hora, para cada muestra. Al término del lavado se continuo con la deshidratación con etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) a diferentes concentraciones de manera gradual y ascendente (Ruzin, 1999). Se comenzó la deshidratación con etanol al 30%, luego 50% y 70%; se dejó reposar durante 24 horas las muestras en esta última concentración y al día siguiente se continuo con las concentraciones de 85%, 96% y etanol absoluto. fueron realizados dos cambios de

alcohol, para cada concentración con un tiempo de inmersión de una hora en cada cambio. Seguidamente los tejidos fueron embebidos en resina plástica JB-4 (Embedding Solution Polysciences. Los Ángeles, California, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El embebido comenzó sumergiendo las muestras en la solución A + catalizador durante 96 horas a temperatura ambiente. Al término de la infiltración con resina en moldes se colocaron los tejidos, para su seccionamiento en sentido transversal y tangencial en un microtomo de rotación HM 325; Microm; con un espesor de 2-4  $\mu\text{m}$ . Los cortes histológicos fueron realizados en serie, extendidos en agua destilada y colectados sobre un porta objetos de 26 x 76 mm.

Para visualizar la organización celular fueron teñidos los cortes histológicos con el colorante azul de Toluidina 0.05%, 0.2 M, en acetato de sodio, esta técnica de tinción consistió en sumergir los cortes histológicos durante 30 segundos (McManus et al., 1960). seguidamente se lavaron con agua destilada durante 30 segundos y se dejaron secar los cortes a temperatura ambiente. Se lavaron los tejidos las ocasiones necesarias hasta que se observe el contraste entre los tonos azules y púrpura. Finalmente fueron realizadas preparaciones permanentes empleando como medio de montaje Polymount, Inc. (Polysciences. Los Angeles, California, USA). Los cortes histológicos fueron analizados y fotografiados en un microscopio óptico en campo claro, las imágenes fueron fotografiadas en aumentos de 10x, 40x y 100x.

### **3.2.5 Análisis estadístico.**

Los datos fueron analizados, para evaluar el rendimiento de la respuesta o diferenciación celular en los diferentes medios probados y poder determinar cuál es, el más eficiente para la inducción de tejidos vegetales en esta especie. Se utilizó el método ANOVA para el estudio de los factores que influyen en el desarrollo de la planta mediante el software infostat/L.

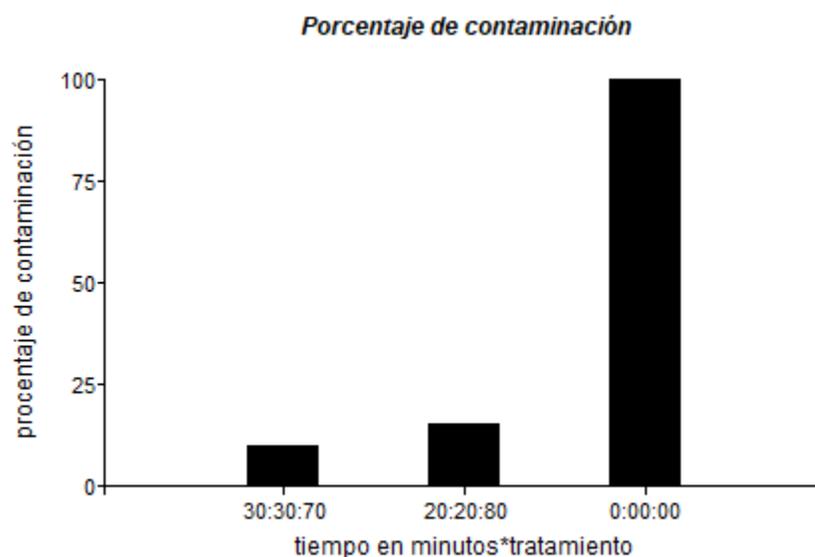
### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Descontaminación de explantes.

El mayor porcentaje de desinfección sin dañar el tejido fue la solución con la concentración de 20:80 hipoclorito de sodio, agua destilada por 20 minutos. Por otra parte, la concentración 30:80 hipoclorito de sodio, agua destilada no presentaba respuesta en la mayoría de los tejidos y se fueron necrosando. De manera que, al incrementar la concentración y el tiempo de exposición de hipoclorito de sodio el número de explantes contaminados disminuyó. Sin embargo, esto condujo en un incremento de número de explante necrosados. Los resultados logrados en esta investigación muestran niveles inferiores de 15%. Esto indica que la utilización del hipoclorito de sodio (NaClO) como agente desinfectante constituye un método simple, rápido y eficaz para la obtención de explantes viables y libres de contaminación.

**Tabla 3.2. 1.** Resultados de la contaminación. No hubo diferencias significativas en la contaminación, pero presento más daño el primer tratamiento, ya que no hubo respuesta en los tejidos.

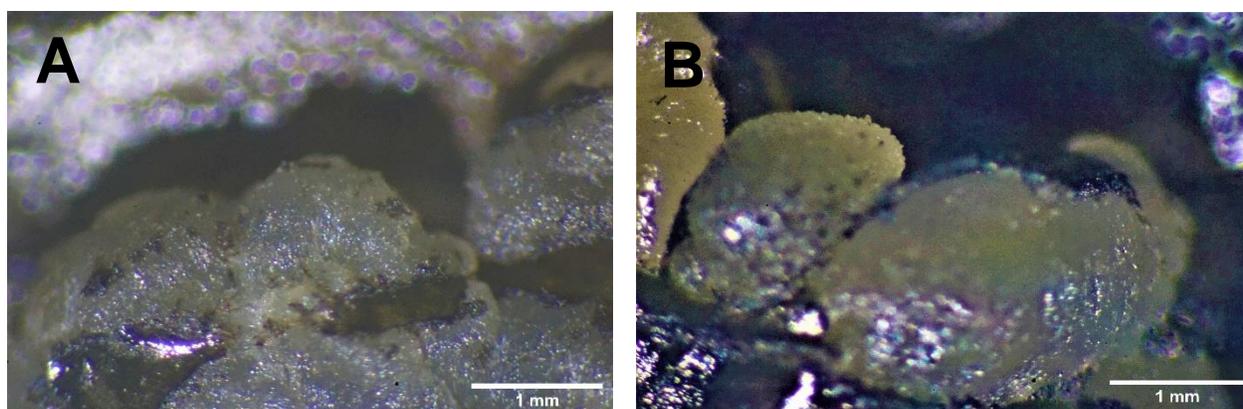
Tratamiento	Solución	tiempo en minutos	placas contaminadas	Tratamientos	porcentaje de contaminación
1	30:70	30	2	20	10
2	20:80	20	3	20	15
3	0:0	0	20	20	100



**Figura 3.2. 1.** Porcentaje de contaminación. El efecto del hipoclorito de sodio es efectivo para la desinfección cuando se incrementa su concentración, sin embargo, disminuye la viabilidad del tejido vegetal.

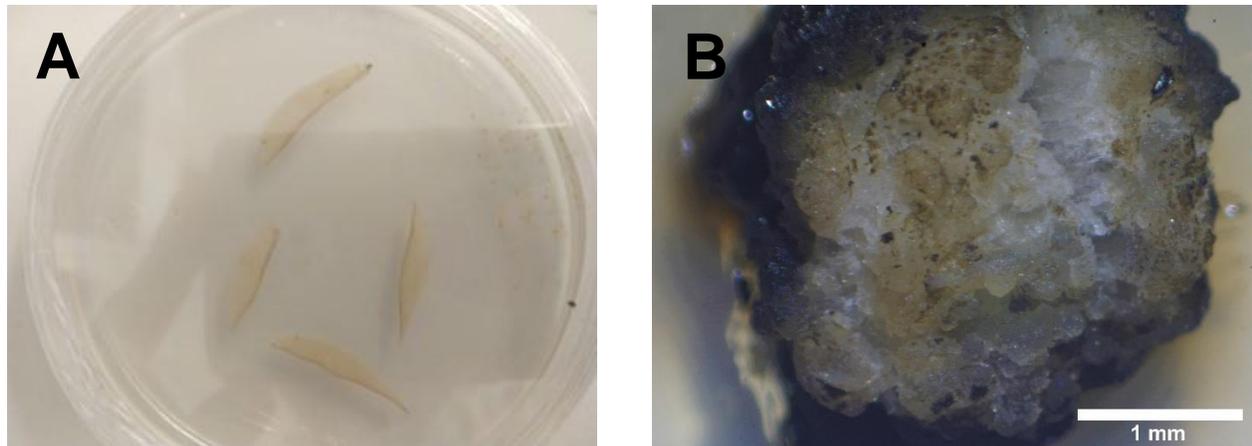
### 3.3.2 Regeneración de tejidos

La figura 3.3.2 muestra los resultados obtenidos de los tratamientos utilizados de hojas jóvenes, en efecto comenzó con una desdiferenciación celular de manera que resulto una masa proembriogénica (MPEs) (Guevara et al., 2012) y posteriormente la proliferación de nuevas estructuras globulares. La presencia de 2,4-D en combinación con BAP favoreció la inducción y desarrollo de células indiferenciadas, lo que causa una eliminación de la polaridad celular y promueven una reorganización del material genético asociado con cambios en la expresión genética (Suárez et al., 2004; Polanco, 2017).



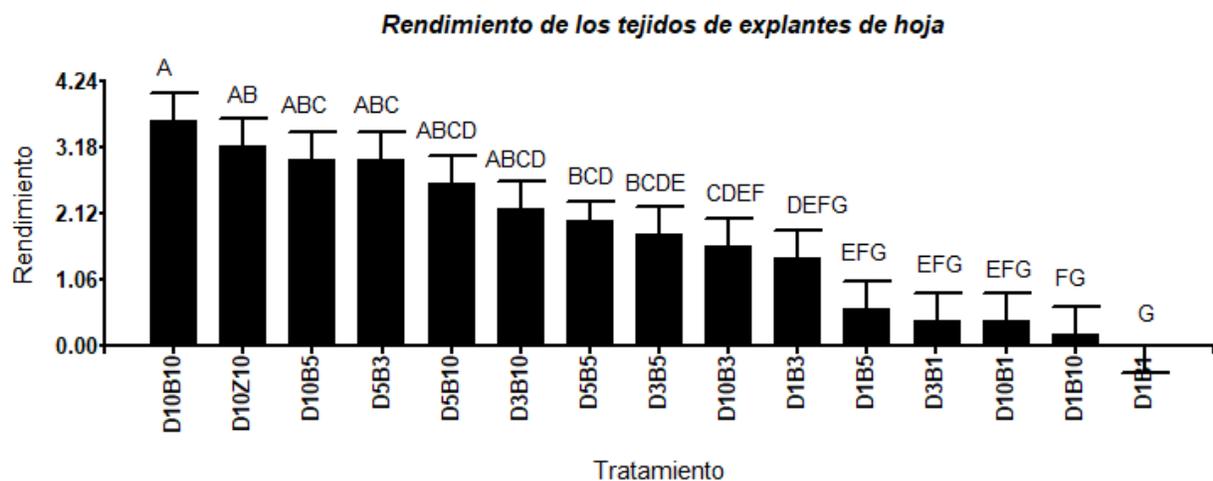
**Figura 3.3. 2.** Respuesta morfogénica. A) callo a partir de segmentos de hoja. B) formación de células proembrionarias.

Por otra parte, la concentración del tratamiento D10B10 registro más del 85% en la desdiferenciación de los explantes de hoja. Las condiciones de luminosidad que se emplearon en esta investigación como se muestra en la figura 3.2.3A muestra la etiolación de las hojas y muerte de los tejidos, en cuanto a la respuesta de obscuridad total como se muestra en la figura 3.2.3B se observa mayor respuesta en cada explante en forma de masas callosas blancas con una oxidación media. Con respecto a la posición del explante la parte axial de los segmentos de hoja en contacto con el medio origino la desdiferenciación celular a las 3 semanas en comparación con la parte adaxial que está en contacto con el medio, donde los explantes permanecieron verdes y al término de la semana 11 fueron oscureciendo y necrosaron. Por otro lado, la edad ontogénica de la planta determino la desdiferenciación celular dando mayor respuesta en los tejidos juveniles obtenidos de plantas de 1 año de edad.



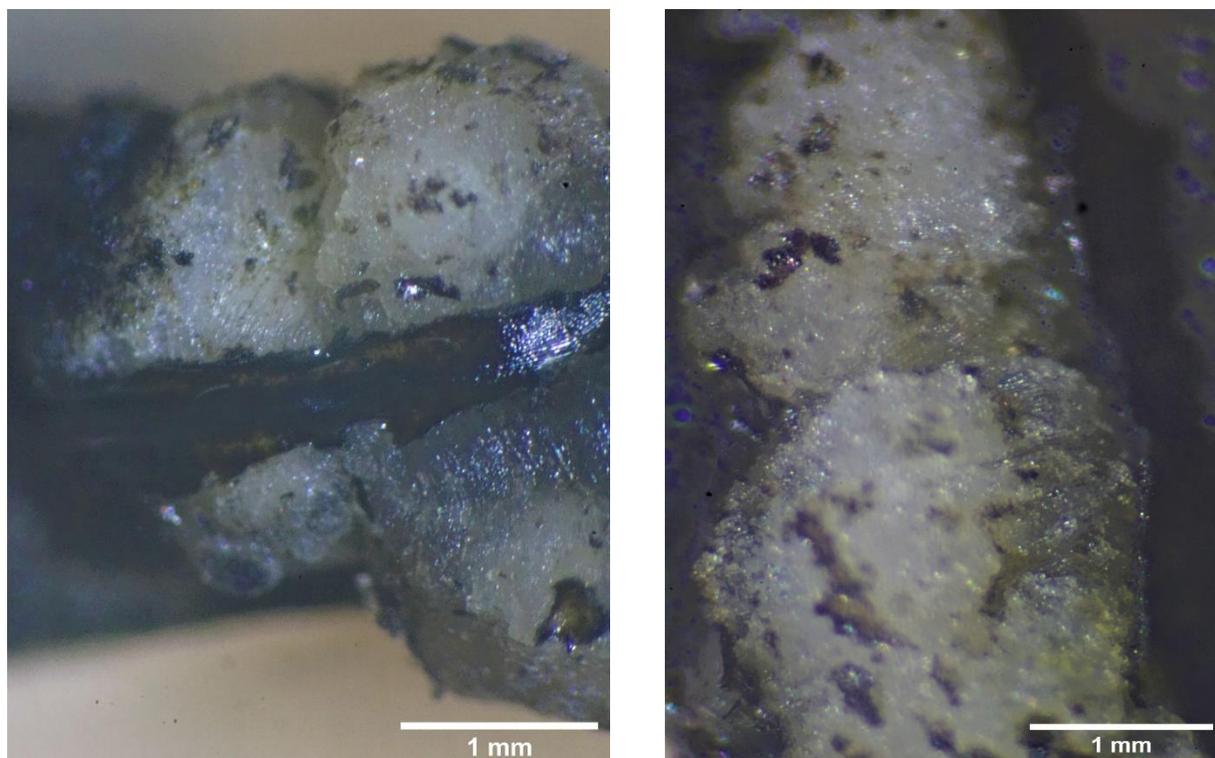
**Figura 3.3. 3.** Efecto de la incubación. A) fotoperiodos de luz de 12 horas en explantes de hoja. B) segmentos medianamente oxidados en oscuridad total.

En general, el número de callos obtenidos en cada uno de los tratamientos utilizados, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas mediante un análisis de bloques al azar como se muestra en la figura 3.2.5. Como resultado final puede afirmarse que la mejor combinación en términos de formación de callo, consistió en emplear el protocolo de desinfestación con NaClO 20:80 durante 20 minutos y una concentración mayor o igual a 5 mg/L, para ambas fitohormonas.



**Figura 3.3. 4.** Gráfica de bloques al azar. Se demostró estadísticamente que existe una diferencia significativa en los tratamientos. El tratamiento D10B10 resultó con la mayor formación de callos en los explantes.

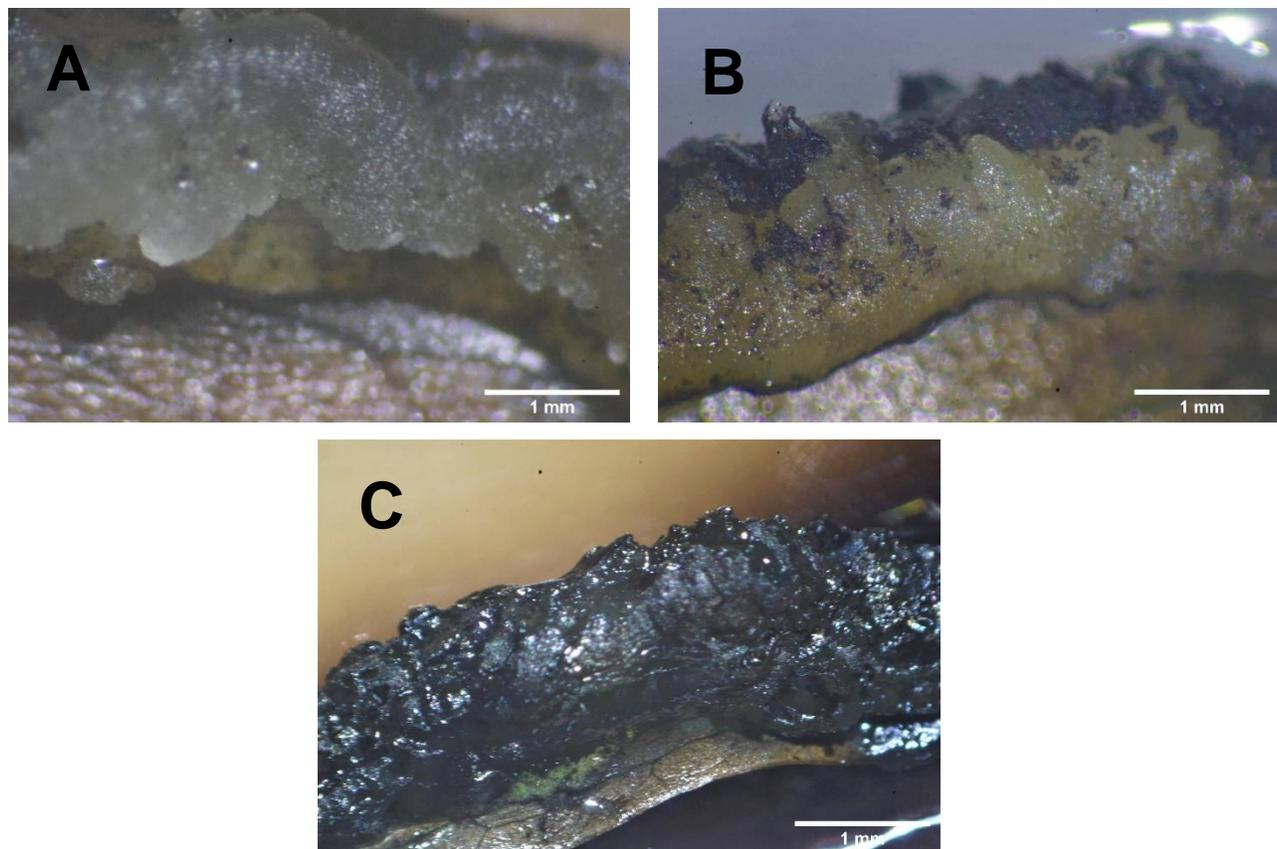
En este caso específico, la inducción de callos es favorecida en un ambiente de oscuridad permanente. Igualmente, al utilizar zeatina a 10 mg/L, suplementado con 10 mg/L de 2,4-D y bajo condiciones de oscuridad, se observó aparición de callos de color blancuzco con partes cafés en un muy alto porcentaje de explantes figura 3.2.6.



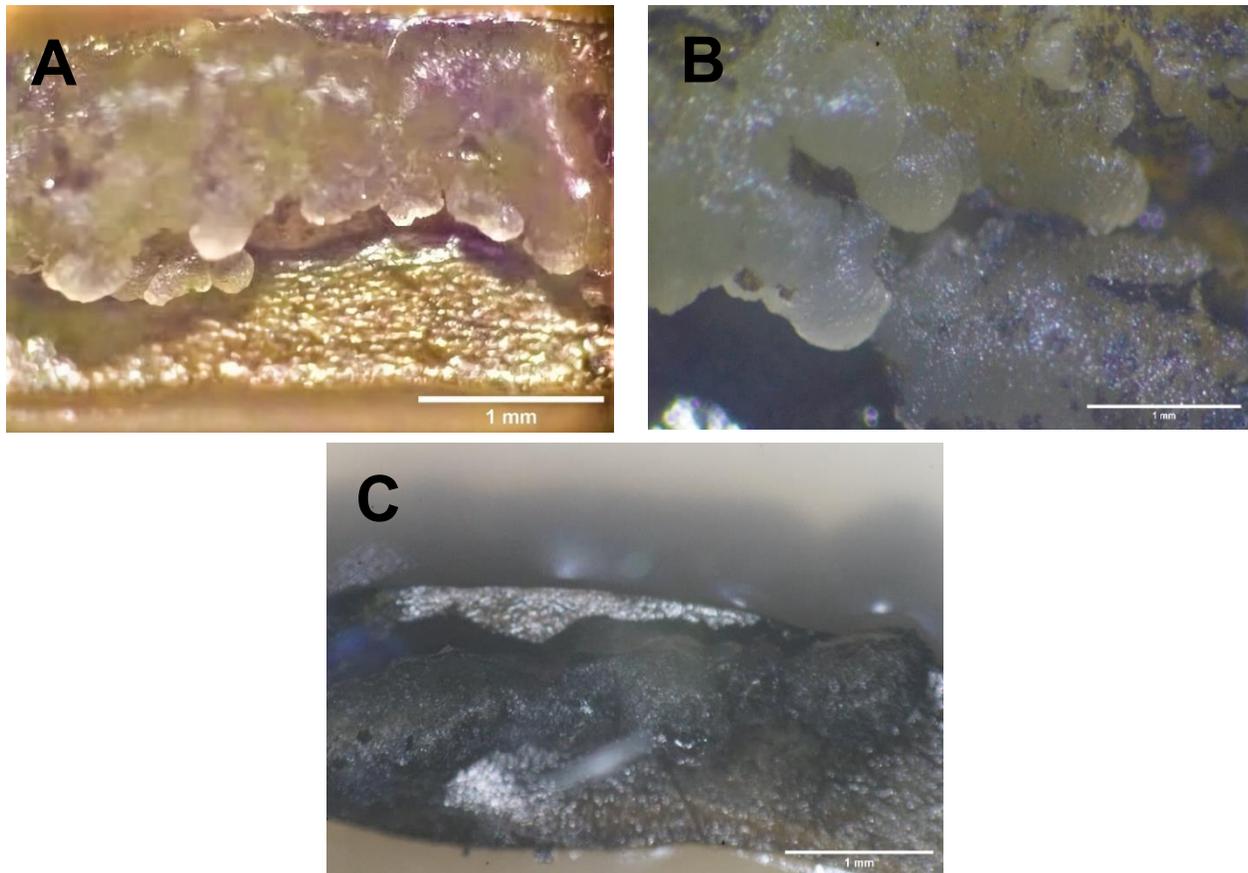
**Figura 3.3. 5.** Respuesta del tratamiento D10Z10. Formación de callos de color blanco con zonas parduzcas, con nivel mediano de oxidación.

Para puntualizar en la mayoría de los explantes, se presentó más del 50% de oxidación a las 4 semanas con la escala medianamente oxidado y aumento hasta llegar a completamente oxidados a las 8 semanas, esto ocurrió en medios sin reductores de oxidación. En contraste, los tejidos sembrados en los tratamientos con los agentes antioxidantes manifestaron oxidación, pero no a igual intensidad. En el caso de la L-cisteína se observó la formación de callos transparentes a las 4 semanas sin manchas dispersas de oxidación en el explante, posteriormente a las 8 semanas

fueron cubiertos por un halo café oscuro alrededor del medio y con más del 50% del explante de color café, al final de la semana 12 los explantes estaban completamente oxidados, como se muestra en la figura 3.2.6. Los niveles más bajos de oxidación se obtuvieron con la utilización del PVPP, el cual propició una clasificación más heterogénea de los explantes, dando lugar a un 15 % de explantes sin oxidación y un 30 % medianamente oxidado a las 4 semanas, luego de las 8 semanas los explantes se mantenían medianamente oxidados, con diferencias cuantitativas con el tratamiento de L-cisteína. Además, se observó que solo un 10 % de los explantes se clasificaron como de alto índice de oxidación, pero al final de la semana 12 estos se oxidaron completamente.

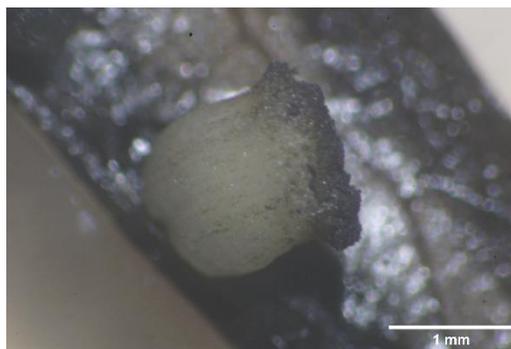


**Figura 3.3. 6.** Medios con L-cisteína. A) explante sin oxidación a las 4 semanas. B) explante de color café con un nivel mediano de oxidación. C) explante completamente oxidado a las 12 semanas.



**Figura 3.3. 6.** Medios con PVPP. A) explante sin oxidación a las 4 semanas. B) explante parduzco medianamente oxidado a las 8 semanas. C) explante completamente oxidado después de 12 semanas

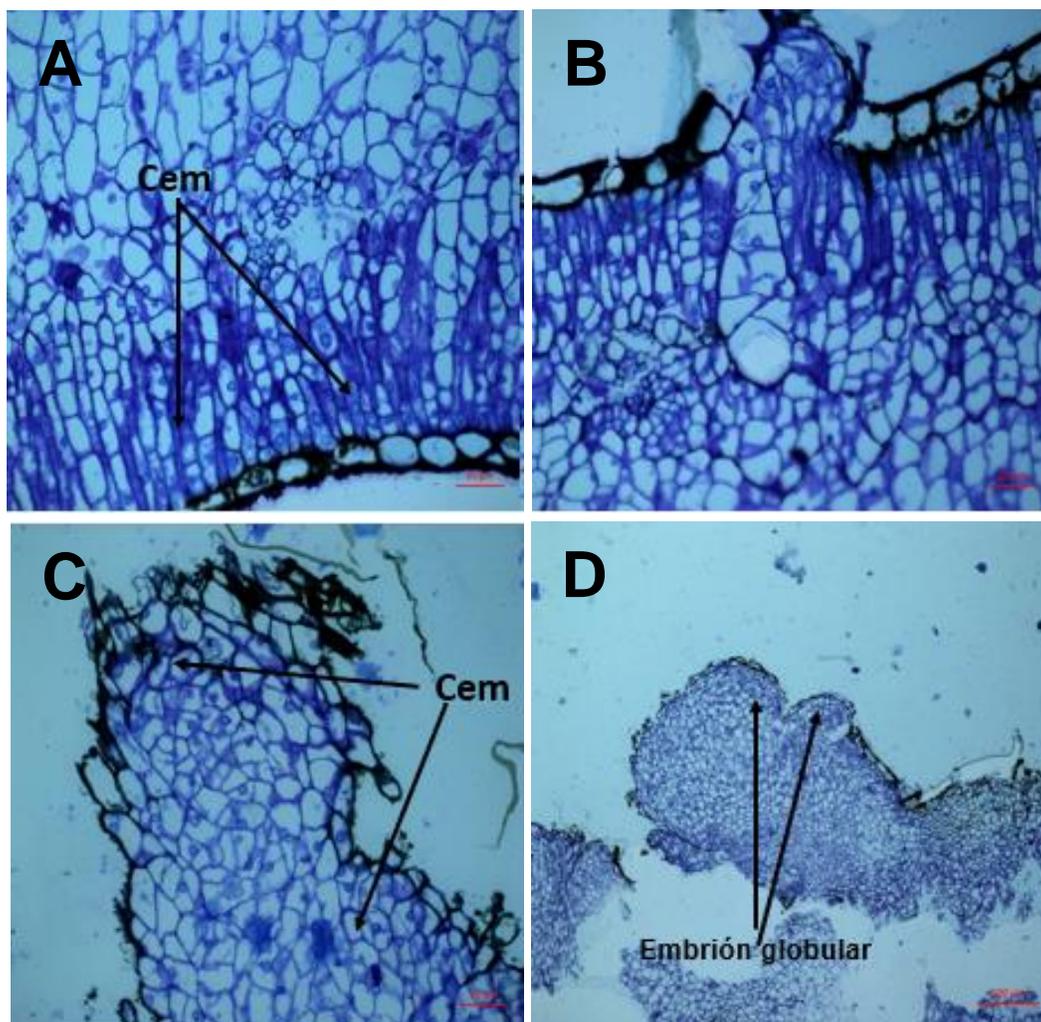
Por último, de manera heterogénea se presentó un embrión en etapa de desarrollo con forma de torpedo, por lo que la perspectiva es realizar nuevamente la repetición del tratamiento, las mismas características del medio y del tejido para poder producir de manera directa los embriones (embriogénesis directa). La figura 3.3.8 muestra el medio D5B5 con un embrión en etapa de maduración.



**Figura 4.3.8.** Formación de embrión. Se origino la respuesta de embriogénesis directa como se observa en la imagen el origen de un embrión en forma de torpedo

### 3.3.2 Análisis de tejidos de tejidos

Estos fueron los primeros estudios realizados de los cortes histológicos. El resultado obtenido mostro tentativamente la formación de embriogénesis. En particular podemos apreciar en la imagen 3.2.7A el inicio de la división celular debajo de la epidermis, en la imagen 3.2.7B se observó el inicio del desarrollo embrionario, otra de las observaciones es la imagen 3.2.7C las secuencias de los cortes mostro la presencia de células con características embrionarias y por último la imagen 3.2.7D muestra potencialmente un embrión globular.



**Figura 3.2.2.** Análisis de tejidos. A) divisiones celulares debajo de la epidermis (40x). B) proembrión (40x). C) células con características embriogénicas (Cem)(40x). (40x). D) potencial embrión globular(10x)

## CAPITULO 4. PERFIL QUÍMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

### 4.1 INTRODUCCIÓN

*Diospyros anisandra* es una planta endémica de Yucatán, México, que se utiliza en la medicina tradicional maya para tratar infecciones cutáneas (Vera, 2004; Borges et al., 2007). Las partes estudiadas (hojas, flores, fruto, corteza y raíz), contienen principalmente dos tipos de compuestos, clasificados en términos fitoquímicos como quinonas (que le dan el sabor amargo a esta especie) y terpenos (compuestos conocidos por sus propiedades aromáticas y presentes en diversas plantas). Hasta el momento se han identificado más de 20 compuestos químicos en la especie (Uc. Cachon et al., 2013; Cetina-Montejo et al., 2019, Juárez-Mendez et al., 2021). Algunos de estos estudios han descrito la actividad de extractos de hojas contra células cancerígenas y diversos microorganismos; así como su efecto antiinflamatorio (Ankli et al., 2002). Por otro lado, los extractos de corteza han demostrado actividad contra garrapatas (acaricida) y parásitos intestinales (antihelmíntica) de importancia en la ganadería (Flota-Burgos et al., 2020). En 2019, Cetina-Montejo y colaboradores demostraron que un compuesto de tipo quinona (denominado epóxido de zeylanona), que se encuentra en forma de cristales color amarillo, posee la capacidad de reducir el número de partículas virales de influenza A y B. Lo anterior es de suma importancia debido a que los virus de influenza son causantes de graves problemas de salud pública, ocasionando epidemias anuales y algunas pandemias a lo largo de la historia. En trabajos recientes realizados por mi grupo de investigación, se observó que los esteroides son otros tipos de compuestos que han presentado esta actividad antiviral por lo que ambos compuestos son de interés, para observar el comportamiento de plantas *in vitro* con respecto a las silvestres. Por otra parte, en relación a su identificación, las quinonas son metabolitos altamente oxidables, debido a que sufren reacciones de adición y sustitución para formar un radical de semiquinona que puede oxidarse de nuevo a la forma de quinona mediante una reacción de transferencia electrónica. Esto confiere una ventaja al momento de su identificación en placa o en su aislamiento y purificación. La reducción reversible a una forma incolora y la restauración del color por oxidación aérea son características de las quinonas. Este principio se utiliza para identificar quinonas, que se vuelven rojas y moradas en presencia de soluciones básicas (Harborne, 1998). Si hablamos de solubilidad, tanto los esteroides y las quinonas son compuestos de baja polaridad y es posible disolver estas moléculas en disolventes no polares como soluciones hexánicas de acuerdo a (Uc-Cachon et al., 2013). Teniendo en cuenta esta característica se utilizaron técnicas de extracción convencionales como es la extracción por sonicación en n-hexano, el cual permite una fácil

extracción de estos compuestos. Otra de las técnicas que se utilizan para la caracterización de estos compuestos debido a su alta volatilidad es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de GC/EM, mediante el empleo de esta técnica es fácil identificar los compuestos de baja polaridad. En el presente capítulo describimos los perfiles cromatográficos obtenidos de extractos hexánicos de *D. anisandra* de plantas completas obtenidas *in vitro*, así como de embriones somáticos empleando GC/MS y mediante el uso de estándares de CCD.

## 4.2 METODOLOGÍA

### 4.2.1 Extracción hexánica de vitroplantas completas de *D. Anisandra*.

Se usaron tres vitroplantas de 5 cm de alto, crecidas a partir de semillas cultivadas *in vitro*, estas plantas tenían 90 días después de la siembra, las cuales tenían un peso de 0.646 gramos frescas y pulverizadas con nitrógeno líquido con un peso de 0.124 gramos, en seguida se disolvió en n-hexano y finalmente se sónico por 30 minutos. El Extracto hexánico fue analizado por CG/EM. Fueron empleados estándares de compuestos puros aislados previamente de esta especie los cuales incluyen: plumbagina, lupeol, Betulina, epóxido de zeylanona, sitosterol, estigmasterol, taraxerona, entre otros con el fin de identificar su presencia en las plantas cultivadas *in vitro*. Se realizó una cromatografía de capa delgada CCD en un sistema 8:2 hexano, acetato de etilo (AcOEt).

### 4.2.2 Extracción hexánica de callos de *D. anisandra*.

Se tomaron 4 segmentos de hoja con callos embriogénicos crecidos en los medios anteriormente descritos, con un peso de 0.180 gramos y pulverizadas con nitrógeno líquido con un peso de 0.085 gramos y finalmente fueron sonicados en hexano por 30 minutos. El Extracto hexánico se analizó por CG/EM y se empleó estándares de compuestos puros aislados previamente de esta especie, para la comparación de compuestos mediante cromatografía de capa delgada CCD en un sistema 8:2 hexano, acetato de etilo (AcOEt).

### 4.2.3 PERFIL DE CG/EM

Las condiciones de corrida fueron las reportadas por (Uc-Cachon et al., 2013). Una muestra de cada extracto y compuestos puros obtenidos se disolvió en cloroformo (1 mg / ml) y se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 N conectado a un detector selectivo de masas inertes (MDS) 5975B de Agilent Technologies. El fraccionamiento cromatográfico se realizó tres veces para garantizar la reproducibilidad del experimento. Para el análisis se empleó una columna capilar Ultra 1 (25 m × 0.321 mm i.d.; 0.52 µm df; 100% dimetilpolisiloxano). Se usó helio como gas portador a una presión constante (1,5ml / min). La temperatura inicial del horno se mantuvo a 180 ° C durante 5 min y luego se incrementó hasta 300 ° C a 10 ° C / min.

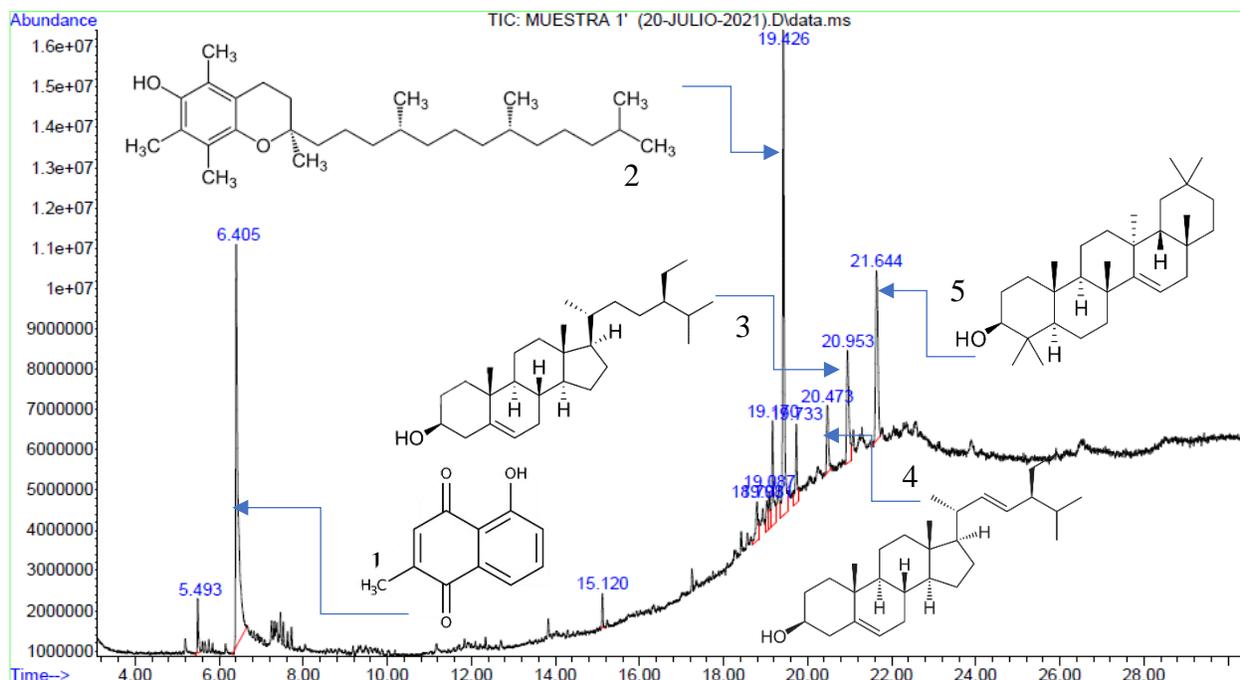
## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Perfil químico de vitroplantas

En la Tabla 4.3.1 se enlistó los componentes presentes, identificados en los extractos n-hexánicos de plantas completas desarrolladas de manera *in vitro* de *D. anisandra* de compuestos no polares. Con respecto a la base de datos NITS (2005) se seleccionaron los compuestos que presentaron un porcentaje de similitud mayor al 90% siendo los más representativos para la especie. Cabe señalar que, si bien solo cinco fueron los componentes que se lograron identificar de acuerdo con la base de datos del equipo, existen otros que no pudieron identificarse por su patrón de fragmentación másico. La presencia de plumbagina (5-hidroxy-2-metil-1,4-naftalendiona) se visualiza en el cromatograma que registraron picos en tiempo de retenciones entre 6.3 minutos como se muestra en la figura 4.3.1; esa naftoquinona tiene un peso molecular de 188 g/mol y su patrón de fragmentación corresponde a lo ya reportado anteriormente por trabajos realizados en el laboratorio de biotecnología de productos naturales dirigido por la Dra. Rocío Borges (figura 4.3.1). Otro metabolito identificado, que es común en hoja, fruto y tallo de manera silvestre (Juárez-Méndez et al., 2021), se presentó con un tiempo de retención ( $T_r$ ) alrededor de los 19.4 minutos, es la vitamina E. Por otro lado, el  $\beta$ -sitosterol se presentó con un de 19.1 minutos, este compuesto se ha identificado en hoja y raíz de manera silvestre, así mismo, para el estigmasterol el RT fue de 20.4 minutos y finalmente el taraxerol con un  $T_r$  de 21.6 minutos. Por último, se obtuvo un rendimiento de 8.96% de extracto crudo hexánico de compuestos no polares a partir de 0.126 g de material molido con nitrógeno líquido y sonicado por 30 min.

**Tabla 4.3 1.** Metabolitos secundarios identificados en el extracto hexánico de *in vitro* plantas de *D. anisandra*

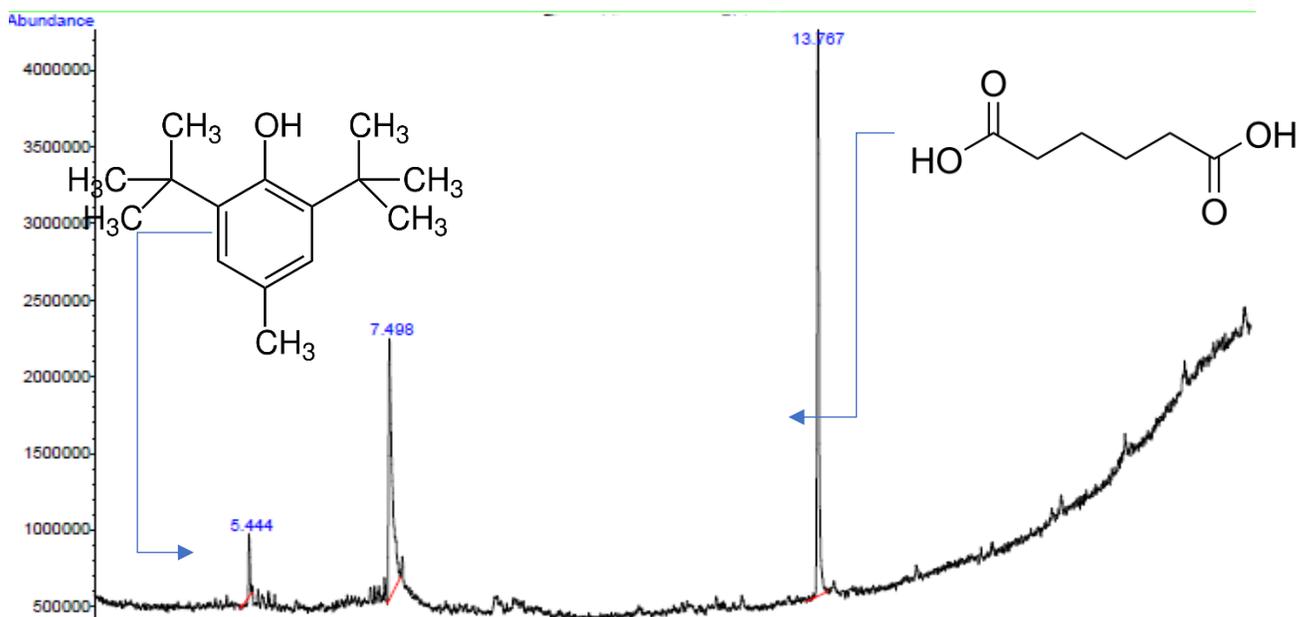
Parte de la planta	$T_r$ (min)	compuesto	% similitud
Planta completa	6.3	plumbagina	99
	19.1	$\beta$ -sitosterol	98
	19.4	Vitamina E	99
	20.4	estigmasterol	91
	21.6	taraxerol	90



**Figura 4.3 1.** perfil cromatográfico de el extracto n-hexánico de *in vitro* plantas de *D. anisandra*. La extracción se llevó mediante sonicación en hexano por 30 min. Los tiempos de retencio nos ayudan a identificar, 1 plumbagina, 2 vitamina E, 3 β-sitosterol, 4 estigmasterol, 5 taraxerol

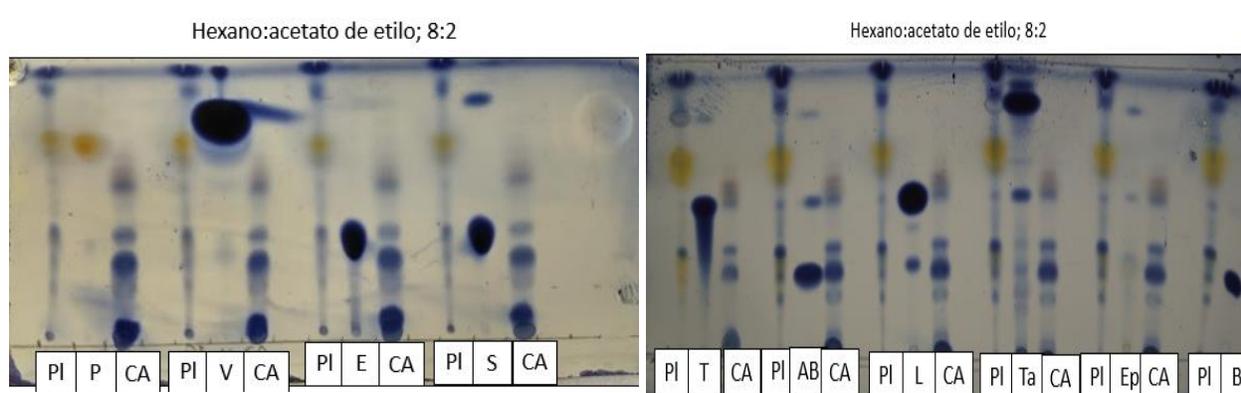
#### 4.3.2 Perfil químico de callos embriogénicos

Los compuestos identificados en los extractos n-hexánicos de callos provenientes de explantes de hoja desarrollados de manera *in vitro* de *D. anisandra* con respecto a la base de datos NITS (2005) con un porcentaje de similitud mayor al 90%. Fueron dos, de los tres mayoritarios que indica el perfil. Como muestra la figura 4.3.2 se logró mediante CG/SM identificar dos componentes presentes, como el fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) con un  $T_r$  de 5.4 minutos, este metabolito es interesante ya que se ha identificado en las raíces de aguacate tratadas con metil éster ácido salicílico producen fenol-2,4-bis(1,1-dimetiletil) con actividad antifúngica (Sánchez et al., 2013). Otro metabolito encontrado fue el ácido n-hexadecanoico que se identificó con un  $T_r$  de 13.6 minutos, algo semejante se identificó en hoja y raíz de plantas silvestres de *D. anisandra* (Juárez-Méndez et al., 2021). Estudios realizados muestran que el extracto etanólico de hojas del *Artocarpus altilis* de la familia *Moraceae* está asociada la actividad antimicrobiana junto con los metabolitos encontrado en esta especie tales como: ácido hexadecanoico, ácido hexanodioico, éster de dioctilo, triterpenos, sesquiterpenos, heptacosano, hidrocarburos alifáticos con actividades antimicrobianas (Medina, 2014).



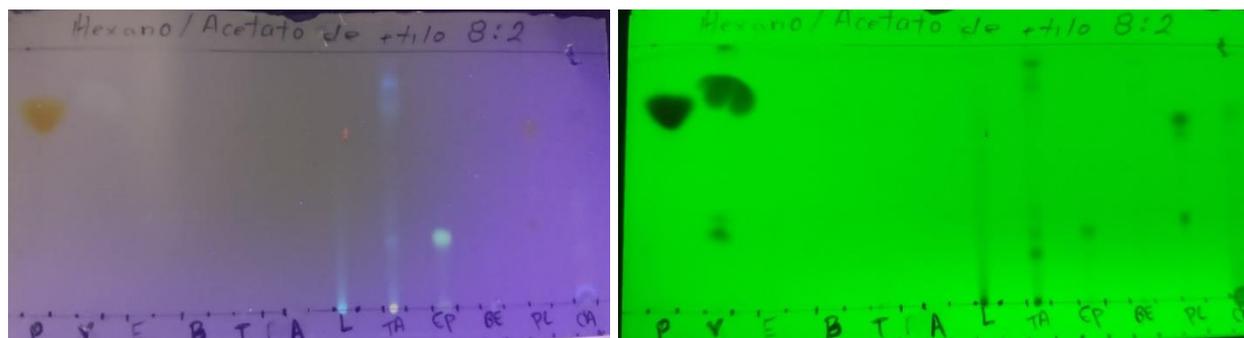
**Figura 4.3. 2.** Perfil cromatográfico de callos embriogénicos. La extracción se llevó mediante sonicación en hexano por 30 min. se logró identificar dos componentes presentes, como el fenol, 2,4-bis (1,1-dimetil) con un  $T_r$  de 5.4 minutos, Otro metabolito encontrado fue el metil éster ácido n-hexadecanoico que se identificó con un  $T_r$  de 13.7 minutos.

El análisis de CCD de cada extracto también dio un perfil similar al de GC/MS de compuestos en el método de extracción hexánica por sonicación y demostró la presencia de ocho compuestos principales. Los factores de retención ( $R_f$ ) de las vitroplantas y callos coincidían con los estándares, en la imagen 4.3.3 se muestra una placa de Sílica gel, en un sistema 8:2 n-hexano, AcOEt, el cual fue revelado con ácido fosfomolibdico y mediante rayos UV como se muestra en la figura 4.3.4.



**Figura 4.3.3.** Placas de CCD reveladas con ácido fosfomolibdico. Se corrieron los estándares plumbagina (P), Estigmasterol (E),  $\beta$ -sitosterol (S), Vitamina E (V), Taraxerol (T), ácido betulinico (AB), Lupeol (L), taraxerona (Ta), Epóxido de zeylanona (Ep), Betulina (B), planta *invitro* (Pl), callo (CA) fueron similares con su Rf a los que se identificó en la GC/MS.

Como se observa en la figura 4.3.4. La plumbagina está presente en plantas in vitro, mas no en los callos, lo que confirma lo observado en los perfiles de CG/EM. La vitamina E (mezcla de tocoferoles) se aprecia también en las plantas in vitro al igual que el estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol. Con respecto al ácido betulinico/betulina, se sugiere su presencia en callos siendo ausente en las plantas in vitro, sin embargo, se requiere de mayor evidencia que confirme estos hallazgos. En cuanto al epóxido de zeylanona, esta molécula no se aprecia en el revelado con ácido fosfomolibdico más si en el momento de su observación a longitud de onda larga como una mancha fluorescente azul, la cual no está presente ni en la in vitro planta ni en los callos, lo que indica posiblemente su biosíntesis a etapas avanzadas de su desarrollo o bien bajo presencia de ciertos factores bióticos o abióticos.



**Imagen 4.3.4.** Placas reveladas en UV en onda corta y onda larga: plumbagina (P), Estigmasterol (E),  $\beta$ -sitosterol (S), Vitamina E (V), Taraxerol (T), ácido betulinico (AB), Lupeol (L), taraxerona (Ta), Epóxido de zeylanona (Ep), Betulina (B), planta *invitro* (Pl), callo (CA) fueron similares con su Rf a los que se identificó en la GC/MS. A) CCD en onda larga de 302 nm. B) CCD en onda corta 254 nm.

---

## CAPITULO V. DISCUSIONES GENERALES

El inicio de esta investigación representa una fase inicial del establecimiento de cultivo *in vitro* de *Diospyros anisandra*, se logró establecer una base sólida, para poder obtener un protocolo de propagación masiva, ya que hasta nuestro conocimiento no se han realizado investigaciones con relación al cultivo *in vitro* con *D. anisandra*.

### 5.1.1 Germinación de semilla

Existen pocos estudios con especies del mismo género, por ejemplo, Jeyavanan et al. en 2016 realizo tratamientos previos a la siembra en los que empleo diferentes concentraciones ácido sulfurico  $H_2SO_4$  y cloruro de potasio KCl, agua caliente y agua destilada, el porcentaje de germinación oscilo entre el 63%. En el presente trabajo se sometió la semilla madura a refrigeración de 4°C durante 21 días, para interrumpir la dormacia, esta etapa presento germinacion homogenia en menor tiempo en comparacion con los controles, donde no se aplico la estratificacion logrando una germinacion del 72%.

Por otro lado Sánchez et al. en 2002 secciono semillas por sus costados y por la parte superior al hipocótilo con tijeras de jardinería; fueron lavadas en agua jabonosa durante 20 minutos en agitación constante; después se pasaron por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) comercial de 10 volúmenes al 3% (v/v) otros 20 minutos; posteriormente se aplicó un baño con alcohol etílico al 70% (v/v) durante 1 minuto, y enseguida por hipoclorito de sodio comercial al 30% (v/v) durante 30 minutos, a los 35 días se obtuvo la germinación de 36%, con este tratamiento se presentó una contaminación del 23%, el resto de las semillas no germinaron. En el presente estudio se realizó la escarificación mecánica con tijeras estériles después de la descontaminación en la que se aplicó un baño con alcohol al 70% durante 5 minutos y fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio, agua estéril y tween 80 en una relación 30:70:100 $\mu$ L respectivamente, se obtuvo un porcentaje de contaminación del 10% y más del 70% de germinación a los 40 días, por lo cual se obtuvo una germinación mucho más alta que Sánchez et al. (2002).

Ramalho & Braga, en 2021 se evaluo la germinación de semillas de *Diospyros hispida* bajo el efecto del ácido giberélico y aplicaciones bioestimulantes. Los tratamientos fueron: T1 - agua destilada, T2, T3 y T4 - soluciones GA 3 a 100, 150 y 200 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, T5 - Inmersión durante 24 horas en agua destilada con aireación, T6, T7 y T8 -Inmersión durante 24 horas en soluciones aireadas de GA3 a 100, 150 y 200 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, T9, T10 y T11 -Aplicación de bioestimulante (que contiene auxina, giberelina y citoquinina) a 3, 5 y 7 ml kg<sup>-1</sup> de semillas. Las semillas de *Diospyros hispida* aireadas durante 24 horas o sin inmersión en agua

o ácido giberélico mostraron un alta germinación 80% y formación de plántulas normales de 74% (Ramalho & Braga, 2021). En nuestro estudio se utilizó medio MS enriquecido suplementado con 2, 5, 10, 20, 30 mg/L de GA3 en semillas escarificadas, los resultados de germinación se presentaron a los 5 días con la salida de la radícula, al pasar 40 días se tenía 70% de vitroplantas con hojas verdaderas y vigorosas del tallo y raíz. En contraste con los resultados obtenidos con Ramalho & Braga, (2021) la adición de concentraciones altas de hormonas vegetales causa variabilidad genética.

### 5.1.2 Cultivo de tejido

En torno al cultivo de tejidos Sánchez et al, en 2002 obtuvo la formación de brotes vía organogénesis directa se presentó en las tres secciones de radícula (basal, media y apical), tanto en el área del corte como a lo largo del explante, no pudiendo establecer diferencia significativa entre los tratamientos, pero con base al promedio de brotes por explante, el tratamiento con 3 mg·L<sup>-1</sup> de BA fue donde se obtuvo el promedio más alto de brotes (Sánchez et al, 2002). Por otra parte, Choi et al, en 2001 se desarrolló un sistema de regeneración de plantas mediante organogénesis a partir de segmentos de hoja de *Diospyros kaki* Thunb. La capacidad de regeneración estuvo influenciada por los recipientes de cultivo, los agentes gelificantes, los reguladores del crecimiento de las plantas y las condiciones de luz. Los explantes de hojas tomados de brotes *in vitro* se cultivaron en un medio Murashige y Skoog modificado (MS1/2N) durante 16 semanas sin transferencia a medio fresco. Los brotes adventicios aparecieron después de 4 y 8 semanas. El cultivo de explantes de hojas en matraces Erlenmeyer con medio que contenía 4 g/L de agar mejoró la formación de brotes en comparación con los medios con concentraciones de agar aumentadas. La regeneración óptima de los brotes se obtuvo con 5 mg/L de zeatina y 0,1 mg/L de ácido indol-3-butírico (IBA) y 10 mg/L de zeatina y 0,1 mg/L de ácido indol-3-butírico (IBA). Las frecuencias de regeneración de brotes en ambos cultivares fueron del 100% y el número de brotes por explante alcanzó hasta 9.2 en las medias. La incubación en la oscuridad durante las primeras 4 ± 5 semanas fue la condición más efectiva para influir con éxito en la regeneración de los brotes en ambos cultivares. Si bien la incubación en la oscuridad era esencial para la formación de brotes adventicios. Más del 80% de los brotes regenerados enraizaron en 4 semanas en medio MS 1/2N sin hormonas después de haber sido sumergidos durante 30 segundos en 250 mg/L de solución de IBA (Choi et al., 2001). En contraste a lo anterior los estudios preliminares en esta investigación indicaron el desarrollo de embriogénesis somática y no organogénesis, esto debido a la presencia de 2,4-D que causó una

eliminación de la polaridad celular y promovió una reorganización del material genético asociado con cambios en la expresión genética (Suárez et al., 2004; Polanco, 2017). En cuanto a los porcentajes de formación de callo embriogénico se obtuvo diferencias estadísticas significativas para el tratamiento D10B10 con 250 mg/L de PVPP como agente antioxidante, con un porcentaje de regeneración de más del 85% en respuesta al número de explantes sembrados.

### 5.1.1 Perfil químico.

La presencia de plumbagina, vitamina E,  $\beta$ -sitosterol y taraxerol en las plantas *in vitro* completas, podrían sugerir la importancia de las rutas biosintéticas del acetato (quinonas), mevalonato y deoxixilulosa fosfato (terpenos) en esta especie. Esto se ve reflejado en la cantidad de compuestos de tipo quinona y terpeno reportados en el género, y en particular en *D. anisandra*. En cuanto a los compuestos identificados en los extractos n-hexánicos en vitroplantas completas y callos embriogénicos *D. anisandra*, ya han sido reportados de plantas silvestre; la corteza de tallo, hoja, raíz y fruto por el grupo de investigación del área de biotecnología de productos naturales dirigido por la Dra. Roció Borges (Uc et al., 2013; Juárez et al., 2021). La plumbagina se ha identificado en abundancia en especies del género *Plumbago* entre las que se destaca *Plumbago zeylanica* y también se ha aislado en especies del género *Diospyros* como *D. elliptifolia*, *D. gracilipes*, *D. hebecarpa*, *D. hoyleana*, *D. kaki*, *D. marítima*, *D. mespiliformis* entre otras; (Roy & Bharadvaja, 2017; Cao et al., 2018). Puede funcionar en la defensa química de la planta contra patógenos. Durante el desarrollo floral, la planta puede ser más susceptible al ataque de microorganismos, una vez que su metabolismo puede estar involucrado en la transición del ápice caulinar vegetativo a un ápice reproductivo. Además, las raíces siempre están expuestas a diferentes microorganismos del suelo, lo que puede explicar la acumulación de compuestos de defensa como la plumbagina (Paiva-Selma et al., 2011). Otro metabolito identificado por CG/EM fue la vitamina E, presente en todas las partes vegetales con excepción de la raíz, la vitamina E tiene un papel importante en plantas, ya que protegen contra el estrés oxidativo limitando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), participando en procesos de señalización ante factores abióticos y bióticos para mejorar la tolerancia al estrés en plantas resistentes a la sequía se ha reportado que se produce un aumento neto de los niveles de este, mientras que en plantas sensibles se produce un aumento inicial seguido de una pérdida neta (Hasanuzzaman et al., 2014). Entre los triterpenos se encuentran esteroides y esteroles derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C de la que derivan todos los

triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esterol. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C 22 y C 23 (Ávalos-García et al., 2009). Estos dos terpenos, junto con el taraxerol están presentes tanto en *in vitro* plantas como en plantas adultas de *D. anisandra*. La principal función de los esterol en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad. Quizás la presencia de estos esterol es de importancia para el desarrollo hasta planta adulta, en la estabilidad de tejidos y membranas (Ávalos-García et al., 2009).

Las naftoquinonas son pigmentos naturales, que tienen como característica estructural poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 ó 1,3 en el anillo del naftaleno, de donde deriva su nombre común. En la naturaleza se presentan con grupos hidroxilo y/o metilo como sustituyentes, además de encontrarse en forma libre o condensada con diversos monosacáridos 1,2. La distribución de las naftoquinonas es amplia, ya que se han aislado de plantas, hongos, bacterias, e inclusive de animales. Sin embargo, se encuentran en mayor proporción en plantas superiores de determinadas familias de Angiospermas como: Ebenaceae, Droseraceae, Bignoniaceae, Verbenaceae, Plumbaginaceae, Juglandaceae, Boraginaceae, etc.

Por otra parte, el perfil obtenido de los embriones somáticos de *D. anisandra*, muestran 3 componentes principales, siendo menos complejo que los extractos obtenidos de las *in vitro* plantas. De nuevo, la presencia de un derivado fenólico, el fenol-2,4-bis(1,1-dimetiletil), a un tiempo de retención de 5.44 min es interesante, lo que indica la importancia de la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos en esta especie. Otro componente identificado fue el éster metílico del ácido hexadecanoico (ácido palmítico), el cual es el segundo ácido graso que se produce durante la lipogénesis y a partir de él se pueden formar otros ácidos grasos de cadena más larga o con dobles enlaces (insaturaciones). Su abundancia y presencia en tejidos primarios de desarrollo vegetal podría sugerir los requerimientos de la planta para la biosíntesis de ácidos grasos esenciales para las membranas celulares (Azcon-Vieto, 2013).

## CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### CONCLUSIONES

Para los tratamientos de descontaminación de semilla y explantes quedaron establecidos por medio de la técnica de tetrazolio, la cual indica la capacidad potencial de germinación y viabilidad.

Se estableció cultivos *in vitro* exitosos a partir de semillas, la escarificación y el GA3 en combinación con medio MS y agar demostró mayor respuesta en la germinación.

Se estableció cultivos exitosos a partir de segmentos de hoja, utilizando 2,4-D en combinación con BAP y agar, los explantes tienen mayor desdiferenciación celular en 4 semanas.

Los segmentos de hojas más juveniles son las que poseen mayor regeneración lo cual de mostro una relación en la edad ontogénica de la planta.

En cuanto el PVPP se reconoce como el antioxidante más adecuado para emplear en el cultivo de tejidos de *D. anisandra*.

Se logro identificar el perfil químico de plantas cultivadas *in vitro* y se demostró que en etapas temprana de crecimiento produce compuestos de interés farmacéutico. Con un rendimiento del 8.2% de extracto hexánico crudo a partir de 0.646 g de material vegetal seco y molido de compuestos no polares.

Los resultados obtenidos son una evidencia muy importante, para la micropropagación masiva de la especie, esto permite manipular volúmenes elevados del material vegetal *in vitro* en periodos cortos de tiempo y la inducción de tejidos (raíz, hipocótilo, cotiledones) juveniles y esterilizados, esto reduce la contaminación de cualquier microorganismo e incrementa los rendimientos de cultivo, así mismo se baja la probabilidad de la variabilidad genética que puede darse con semilla.

## **PERSPECTIVAS**

La embriogénesis indirecta que se presentó en los tejidos de hoja, necesita proliferación de los embriones en medios libres de hormonas y de suspensión. También probar otros antioxidantes como el carbón activado y el ácido ascórbico, para los exudados de los explantes. Por último, destacar que los embriones son más manipulables, para la transformación genética y la exposición de vitroplantas con factores bióticos y abióticos con una incidencia y grado de exposición desregularizada con el fin de generar un tipo de estrés, que provoque la producción de metabolitos secundarios ya que se identificó la presencia de compuestos de importancia biotecnológica.

**BIBLIOGRAFÍAS**

- Ankli et al., A. H. (2002). Yucatec Mayan medicinal plant: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1): 43–52.
- Arnold, F. E. (1996). Manual de vivero forestal: Elaborado para algunas especies forestales nativas de la zona templada del Sur de Chile. *Documento Técnico CONAF-DED.*, 123.
- Ávalos-García et al., A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3): 119-145.
- Azcon-Vieto, J. (2013). *fundamentos de Fisiología vegetal*. Barcelona, España: McGRAW-HILL.
- Baskin, C., & Baskin, J. (2001). Seeds. Ecología, biogeografía y evolución de la latencia y la germinación. *Nordic Journal of Botany*, 20: 598-598.
- Batti et al., J. S. (2020). In vitro growth response on three provenances of Jabon Merah based on auxin and cytokinin combinations. *Earth and Environmental Science*, 486.
- Berling, G. P. (1976). *Botanical microtechnique and cytochemistry*. State University Press, Ames, Iowa, USA.: 3rd ed. Iowa.
- Borges-Argáez et al, R. (2013). A SELECTIVE CHEMICAL METHOD FOR THE SEPARATION OF QUINONES FROM THE STEM. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 13-17.
- Borges-Argáez et al., R. (2007). Antimicrobial activity of Diospyros Anisandra. *fitoterapia*, 370-372.
- Bray et al., E. B.-S. (2000). Responses to abiotic stresses. En B. Buchanan, W. Gruissem, & R. e. Jones, *Biochemistry and molecular biology of plants*. (págs. 1158-1203.). Maryland, US: American Society of Plant Physiologists.
- Cao et al., Y. Y. (2018). Plumbagin inhibits the proliferation and survival of esophageal cancer cells by blocking STAT3 -PLK1-AKT signaling article. *Cell Death Dis.*
- Cassells, A., & Curry, R. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Culture 64: 145-157.
- Cetina Montejo et al., L. (2019). Zeylanone epoxide isolated from Diospyros anisandra stem bark inhibits influenza virus in vitro. *Springer-Verlag GmbH Austria*.
- Choi et al., J. Y. (2001). EFFICIENT AND SIMPLE PLANT REGENERATION VIA ORGANOGENESIS FROM LEAF SEGMENT CULTURES OF PERSIMMON (DIOSPYROS KAKI THUNB.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant* 3, 7:274-279.
- Concepción et al., L. N. (2005). EFECTO DE TRES ANTIOXIDANTES EN EL CULTIVO In Vitro

- DE ÁPICES DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.). RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN DEL EXPLANTE Y EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS. *Cultivos tropicales*, vol. 26, no. 1, p. 33-39.
- Cromwell et al. (1996). Germoplasma para árboles de usos múltiple: acceso y utilidad en comunidades de pequeñas explotaciones agrícolas. *Ed. Overseas Development Institute.*, 107.
- Dalauleng et al., G. F. (2020). The optimization of in vitro sterilization on Ebony (*Diospyros celebica* Bakh) using shoot explants. *Earth and Environmental Science*, volumen 575.
- Dayamba et al., .. S. (2005). Seed germination of herbaceous and woody species of the Sudaniansavanna-woodland in response to heat shock and smoke. *Ecol Manag*, 256:462–470.
- Dayamba et al., S. S. (2010). Effects of aqueous smoke solutions and heat on seed germination of herbaceous species of the Sudanian savanna-woodland in Burkina Faso. *Flora*, 205:319-325.
- Dias, L. d., & Barros., M. a. (1995). *Avaliação da qualidade de sementes de milho*. Londrina Parana, Brasil: Instituto Agronómico de Paraná.
- Donoso, C. (1979). Variación y tipos de diferenciación en poblaciones de roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.). *Bosque* 3, 1-14.
- Duran & Mendez, R. M. (1997). DIAGNÓSTICO DEL CONOCIMIENTO ETNOBOTÁNICO ACTUAL. . *Boletín de la Sociedad Botánica de México.*, 15-24.
- Fay, M. F. (1994). Michael F. Fay (1994). ¿En qué situaciones el cultivo in vitro es apropiado para la conservación de plantas?. *Biodiversity and Conservation*, vol. 3., 176-183.
- Flota-Burgos et al., G. R.-A.-V.-A.-d.-M.-A. (2020). Anthelmintic activity of extracts and active compounds from *Diospyros anisandra* on *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus placei* and *Cyathostomins*. *Frontiers in Veterinary Science* 7:565103.
- George, E. (1996). Plant propagation by tissue culture; part 2. *In Practice. 2 ed. Exegetics Limited.* , 1361.
- González, K. M., & Orejuela, A. A. (2016). *Análisis de la Diospyros Digyna (Zapote negro) como materia prima en la elaboración de un producto en el área de la repostería*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Guevara et al., Y. S. (2012). Inducción y proliferación in vitro de tejidos celulares de bata (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) en medio con 2,4-D. *Temas agrarios* , 9-17.
- Hamalton et al., R. J. (2020). In vitro culture establishment and seed studies of *Diospyros buxifolia* (Blume) hiern: A slow growing timber species of Western Ghats. *European*

- Journal of Biotechnology and Bioscience*, vol. 8, 15-20.
- Harborne, J. B. (1998). Phenolic compounds in Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis. *Chapman & Hall.*, 40-96.
- Hasanuzzaman et al., M. N. (2014). 2014. Chapter 12. Role of Tocopherol (Vitamin E) in Plants: Abiotic Stress Tolerance and Beyond, Second Edi. ed, Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. . *Elsevier Inc.* .
- Howarth, M., & Stanwood, P. (1993). *Tetrazolium staining viability test using color image processing*. 1937-1940: Transactions of the American Society of Agricultura Engineers.
- Ibanes et al., A. B. (2019). Phenology, Seed Germination, and Genetics Explains the Reproductive Strategies of *Diospyros lasiocalyx* (Mart.) B. Wall. *Tropical Plant Biology*, 1-13.
- INATEC. (2017). *manual del protagonista viveros y semilleros* . Nicaragua.
- Jara, N. L. (1996). Biología de semillas forestales . En N. L. Jara, *Fisiología del desarrollo de la semilla* (pág. 15). Costa Rica : Catie.
- Jeyavanan et al., S. S. (2016). Effect of Different Pre-Sowing Treatments on Seed Germination of *Diospyros ebenum* Koenig. *World Journal of Agricultural Sciences*, 384-392.
- Juárez-Méndez et al., M. T.-A.-T.-R.-E.-F. (2021). *Diospyros anisandra* phytochemical analysis and anti-hemagglutinin-neuraminidase activity on influenza AH1N1pdm09 virus. *Natural Product Research*, 1-6.
- Laukkanen et al., H. R. (2000). Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology*, 467-475.
- Liu et al., B. J. (2011). Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la germinación de semillas de 489 especies de pastizales de gran altitud del este del Tíbet Meseta y algunas implicaciones para el cambio climático. *Am J Bot*, 12-19.
- López, P. (1989). Micropropagación de pinos. *Memoria de la primera reunión nacional sobre avances de la micropropagación en México*, 75-83.
- Mallavadhani, U. P. (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry*, 901-951.
- Mata, R. (2000). "Morfogénesis en *Picea chihuahuana* Martínez, a partir del cultivo de tejidos de estructuras inmaduras". *tesis de doctorado, division de estudios de posgrado de la facultad de ciencias*, 123.
- Mathur, J., & Koncz, C. (1998). Callus Culture and Regeneration. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 82. 31-34.
- McManus et al., J. M. (1960). *Staining Methods. Histological and Histochemical*,. New York

: Harper & Row,.

Medina, M. M. (2014). Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *artocarpus altilis* (parkinson) fosberg. Pan de árbol de la provincia de zamora.

*Universidad tecnica particular Loja, Ecuador*, tesis.

Méndez et al, .. S. (2012). *Flora medicinal de los mayas peninsulares*. Merida, Yucatan, Mexico:

Juan Antonio Arenas de la Rosa, Ema Lucia Avila Aranda.

Morrone, J. J. (2005). Hacia una síntesis biogeográfica de México. . *Revista. Mexicana de Biodiversidad.*, 207-257.

Murkute, A., & Shanti-patil, M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate.

. *Agricultural Science Digest* 23, 29-31.

Niembro, R. A. (1988). Semillas de árboles y arbustos, ontogenia y estructura. Ed. *Limusa*, 285.

Nitsch, J. (1995). Physiology of flower and fruit development. En: Handbook

derPflanzenphysiologie. W. Ruhland 8ED). *Vol 15. Springer-Verlag, Berlin*, Vol 15.

Springer-Verlag, Berlin.

Novoa, e. a.-F. (2001). actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Brthamnion*

*triquetrum* (S.G. Gmelim) . *Brasileira de Ciências Farmacêuticas* , 37: 373-382.

Núñez, L. M., & Mariño, J. G. (2008). *Micropropagacion vegetal*. España, Galicia: Rebigo.

Paiva-Selma et al., R. (2011). Chemical composition fluctuations in roots of *Plumbago scandens*

L. in relation to floral development. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1165-

1170.

Patiño et al, F. (1983). *Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales*.

México D.F. : nstituto Nacional de Investigaciones Forestales. Subsecretaría Forestal.

Boletín Divulgativo N° 63.

Pick et al., K. A. (2007). Callus Induction from Leaf Explants of *Ficus deltoidea* Jack.

*International Journal of Agricultural Research*, vol. 2. 468-475.

Piven et al., N. M.–P.–A.–A.–M. (2001). Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*)

and its wild ancestor *Lgave angustifolia* (Agavaceae). *Gametophyte development. Amer.*

*J. Bot.*, 1966-1976.

Polanco, H. (2017). Inducción de embriones somáticos en la especie *Dioscorea rotundata* Poir.

*Cultivares alemán y Botón*, Tesis M. Sc. Biotecnología, Departamento de Química,

Montería.

Ramalho, A. B., & Braga, L. F. (2021). Plant growth regulators in the germination of *Diospyros*

*hispida* A. DC. *Research, Society and Development*, volumen 10.

Ramírez, M. C., & Salazar, E. G. (1998). Método de desinfección y efecto de citocininas en

- el cultivo in vitro de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron.*, vol. 15, p. 162-173.
- Roca, W. M., & Mronginski, I. A. (1993). *Cultivos de tejidos en la agricultura. fundamentos y aplicaciones*. Colombia: CIAT.
- Rodríguez et al, S. d. (2012). *ESPECIES, GERMINACIÓN Y MANEJO DE FORESTALES TROPICALES*. Veracruz, México: " CONAFOR-CONACYT.
- Rosado et al, .. A. (2008). ACTIVIDAD IXODICIDA DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Diospyros anisandra* CONTRA LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 8, 297-301.
- Roy, A., & Bharadvaja, N. (2017). A Review on Multi-Purpose Medicinal Plant *Plumbago zeylanica* and In-vitro Production of Plumbagin. 129-139.
- Ruiz, M. d. (2009). *El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas* . Argentina: E.E.A. INTA Anguil.
- Ruzin, S. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. . Oxford University Press, Oxford, 1-322.
- Sánchez et al, C. N. (2002). *INDUCCIÓN DE BROTAÇÃO MÚLTIPLE EN Diospyros riojae Gómez-Pompa POR MEDIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES*. Veracruz: Redalyc.
- Sánchez et al. (2013). Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), a compound with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology*, 1-10.
- Silva et al., C. R. (2010). Caracterização morfológica do fruto, semente e morfofunção de plântulas de sapoteira-preta (*Diospyros ebenaster* Retz.). *Comunicata Scientiae*, 9-14.
- Suárez et al., R. E. (2004). EMBRIOGENESIS SOMATICA EN TRES CULTIVARES DE AGUACATE (*Persea americana* Mill.). *Temas agrarios*, 32-41.
- Tao R, S. A. (1992). Micropropagation of Japanese persimmon ( *Diospyros kaki* L.). . *Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 18, High-tech and micropropagation 2*. Springer, New York,, 426-440.
- Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* , 552: 335-344.
- Uc et al., .. C. (2013). Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Elsevier Ltd.*, 1-7.
- Uc-cachon et al., A. (2013). A new dimeric naphthoquinone from *Diospyros*. *Natural Product Research*, Vol. 27, 1174-1178.

- Uc-Cachon et al., A. H. (2013). A SELECTIVE CHEMICAL METHOD FOR THE SEPARATION OF QUINONES FROM THE STEM BARK OF DIOSPYROS ANISANDRA. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 1-7.
- Vankus, V. (1997). The Tetrazolium Estimated Viability Test for Seeds of Native Plants. *Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station*., 57-62. Obtenido de In: Landis, T.D.; Thompson, J. R., tech. coords. National Proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-419. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station:: <http://www.fcnanet.org/proceedings/1997/vankus.pdf>
- Varela et al, S. A. (2010). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Varela, S. A. y Aparicio, A.*, 1-10.
- Vázquez et al, .. Y. (1997). La reproducción de las plantas: semillas y meristemas. *La ciencia para todos. Ed. Fondo de Cultura Económica.*, 167.
- Vera, K. B. (Mexico, 2004). Detección de actividad antimicobacteriana en: Evaluación biológica en plantas medicinales nativas de la Península de Yucatán. . *PhD Thesis. Centro de Investigación Científica de Yucatán. A.C. Mérida, Yucatán.*, Chapter 4, P. 145-158.
- Villalobos, A., & Thorpe, T. A. (1984). *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados*. Colombia: Mroginski, L.A.
- Wangdi, & Gurung, T. (2014). Seed Treatment to Enhance Germination in Persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Bhutan Journal of Natural Resources & Development*, 42-45.
- Yamada et al, K. (1987). Adventitious bud formation from hypocotyl segments in seed of Japanese persimmon. *J. Jap. Soc. Hort. Sci 64 (Suppl. 2)*, 154-155.
- Yokoyama, T. &. (1976). Organ and plantlet formation from callus in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). . *Phytomorphology*, 273-276.
- Zida D, T. M. (2005). Germination requirements of seeds of four woody species from the Sudanian savanna in Burkina Faso, West Africa. . *Seed Sci Technol*, 581-593.
- Zulkarnain, H. (2011). *ULTUR JARINGAN TANAMAN: SOLUSI PERBANYAKAN TANAMAN BUDI DAYA*. Cetekan: Bumi Aksara, Yakarta.

---

---