



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Iztapalapa

**"Análisis químico parcial de un exudado de
Prosopis laevigata y su producción por cultivo de
tejidos vegetales"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

JUAN OROZCO VILLAFUERTE

COMITE TUTORIAL:

**Dr. Francisco Cruz Sosa
Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter
Dra. Edith Ponce Alquicira
M. en C. Ruth Pedroza Islas**

INDICE

RESUMEN

1

INTRODUCCION

Cultivo de tejidos vegetales
Interacción planta-microorganismo
Gomas vegetales

ANTECEDENTES

Prosopis laevigata
Localización geográfica
El mezquite como recurso natural
Gomas vegetales
Cultivo de tejidos vegetales en plantas del género *Prosopis*
Estudios bioquímicos empleando cultivo de tejidos vegetales
Factores de inducción de producción de compuestos
antimicrobianos *in vitro*

OBJETIVOS E HIPOTESIS

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Selección y desinfestación de explantes
Tratamientos y medios de cultivo
Análisis químico
 Contenido de azúcares y proteínas
 Pruebas de identidad para gomas vegetales
 Contenido de taninos

Fraccionamiento cromatografico

RESULTADOS Y DISCUSION

Cocultivos con microorganismos vivos

Incisiones *in vitro*

Cocultivos con microorganismos inactivos

Cultivos en agar nutritivo

Pruebas de identificación

Azúcares y proteínas totales

Patrón de fraccionamiento cromatografico

Taninos

CONCLUSIONES

LITERATURA CITADA

RESUMEN

El género *Prosopis* contempla todas las plantas conocidas como mezquite o algarrobo en Sudamérica. Así mismo, cuando se habla de goma de mezquite, se entiende que esta goma puede provenir de cualquiera de las especies de mezquite hasta ahora estudiadas en este sentido. La mayoría de los trabajos se enfocan en conocer la composición química de la goma y solo algunos en el estudio del proceso bioquímico y fisiológico de la gomosis o bien del comportamiento fisicoquímico o reológico de la goma. Este último aspecto es de suma importancia, ya que la aplicabilidad y uso comercial de estas gomas descansa precisamente en estas características. Las gomas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para controlar las propiedades reológicas de muchos productos. Dentro de este contexto a nivel nacional los árboles de mezquite juegan un papel importante como un recurso de las extensas zonas áridas del país. Dichos árboles producen un exudado conocido como goma de mezquite. Los estudios realizados a esta goma indican que tiene una composición semejante y un comportamiento reológico similares a la goma arábica, de ahí que sea susceptible su utilización en la industria alimenticia como una alternativa más económica. La finalidad del presente trabajo es la de apoyar y sustentar la iniciativa de sustituir el uso de goma arábica por el de goma de mezquite. Se establecieron las condiciones para la producción de goma de mezquite en cultivos *in vitro*, utilizando microorganismos (*Aspergillus nidulans* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*), condiciones de incubación drásticas (temperaturas por arriba de los 35°C, ausencia de iluminación), e incisiones aplicadas a los explantes, como factores estresante e inductores de la gomosis. Resultando factible implementar las metodologías utilizadas para promover la síntesis de fitoalexinas, en el estudio y la producción de una goma vegetal *in vitro*. También se realizaron algunas pruebas con el fin de identificar de manera indirecta la goma producida. Al encontrar concentraciones de azúcares y de proteínas muy similares a las registradas por la goma de mezquite y siendo positivos los resultados obtenidos en los ensayos de identidad para la goma producida *in vitro*, además de presentar un perfil cromatográfico muy similar al de las gomas de mezquite y arábica. Se

puede afirmar, aunque no de manera concluyente, que la identidad química del exudado producido es la de una goma vegetal.

INTRODUCCION

Cultivo de tejidos vegetales

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera es única en plantas, no puede encontrarse un fenómeno similar en animales superiores. El cultivo de tejidos se define como un conjunto de técnicas con las cuales se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (Abdelnour y Vincent, 1994). El cultivo de tejidos vegetales se utiliza a menudo como un sistema “modelo” para el estudio de aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales de las plantas. Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales son también un campo que ofrece grandes perspectivas a los países en desarrollo, gracias a su gran potencial como un medio de propagación de cultivos económicamente importantes o de cultivos con un potencial a futuro sobre bases o fines económicos. Lo anterior deriva, de las diversas ventajas que ofrecen tales técnicas, entre las cuales destacan en primer término, el gran número de plántulas que pueden ser obtenidas a partir de un solo explante, por otro lado también es posible mediante el empleo de estas técnicas

obtener o generar plantas resistentes a enfermedades, plagas, herbicidas, y en general a diferentes condiciones de estrés medioambientales, así como plantas con un incremento en su productividad, otra ventaja es el hecho de poder trabajar en la micropropagación durante todo el año, independientemente de las condiciones ambientales, si se cuenta con un adecuado número de plantas madre. Por último una alternativa que cada día cobra mayor relevancia, la conservación de germoplasma empleando técnicas contempladas en la biotecnología vegetal (Evans y Flick, 1981; Gautheret, 1985; Robert y Loyola, 1985; Ochoa, 1985; Torres, 1989; Abdelnour y Vincent, 1994).

El éxito del cultivo de tejidos vegetales está fuertemente influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados, y otros factores ambientales. En general, los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes: 1) sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes), 2) vitaminas, 3) reguladores de crecimiento vegetal, 4) aminoácidos, 5) carbohidratos, 6) agua, 7) agentes solidificantes y 8) suplementos no definidos (López, 1985).

De acuerdo al material vegetal usado, suele dividirse la técnica de cultivo de tejidos en cinco clases: 1) cultivo de callos, 2) cultivo de células en suspensión, 3) cultivo de órganos, 4) cultivo de meristemos y morfogénesis para el propósito de propagación y 5) cultivo de protoplastos (Gamborg y Shyluk, 1981, citado en Moya, 1992).

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen tres principios básicos: 1) la parte vegetal o explante debe ser aislada del resto del cuerpo de la planta, 2) el explante debe ser colocado en un medio ambiente apropiado a través de medios

de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuados y 3) debe mantenerse en condiciones de asepsia (Moya, 1992).

Interacción planta-microorganismo

Las plantas superiores están expuestas al ataque de un gran número de microorganismos (virus, bacterias y hongos) potencialmente patógenos; sin embargo, la mayoría son incapaces de atacar con éxito a las plantas debido a los mecanismos de defensa que poseen éstas. También las plantas presentan diversas respuestas de defensa a factores de estrés, por ejemplo, síntesis de moléculas fotoprotectoras por niveles altos de radiación solar o luz UV; formación de barreras protectoras externas con polímeros como lignina y gomas ante el ataque de depredadores; síntesis de compuestos fenólicos por bajos niveles de nitrógeno, fósforo o hierro en el suelo o como respuesta alelopática entre plantas y síntesis de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas ante el ataque de hongos y bacterias (figura 1). Los compuestos provenientes de las plantas se han clasificado para su estudio, en metabolitos primarios y secundarios; los primeros son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de la planta; los segundos son aquellos compuestos no esenciales para la sobre vivencia de las plantas, pero que frecuentemente tienen una función ecológica importante, muchos de ellos constituyen mecanismos de defensa contra infecciones vírales, bacterianas y fúngicas; además son atrayentes de polinizadores y algunos de ellos son de gran utilidad en taxonomía vegetal (Azcon y Talon, 1993; Dixon y Paiva, 1995; Salisbury y Ross, 1994).

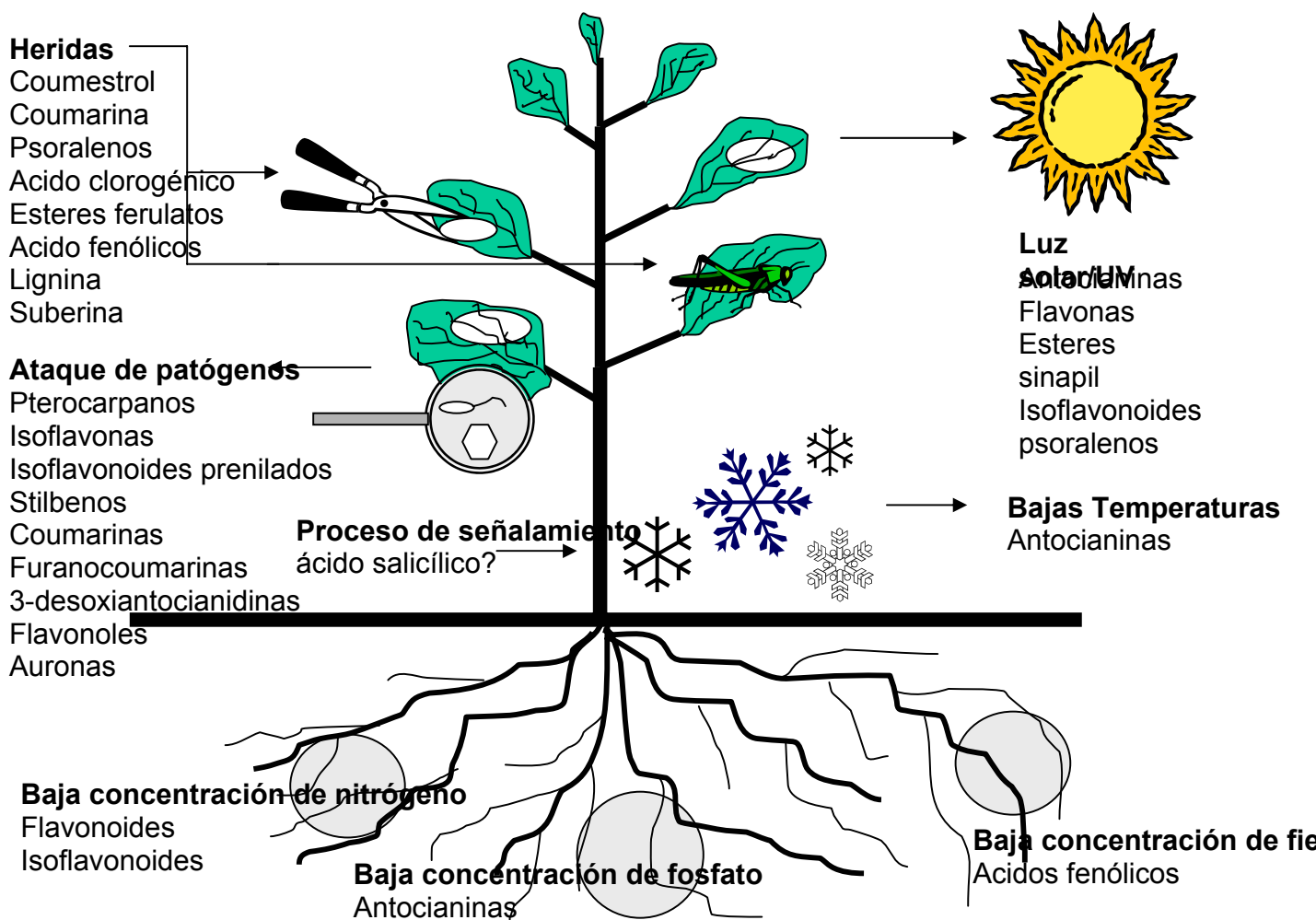


Figura 1. Resumen de los diferentes tipos de metabolitos secundarios inducidos en plantas por varios factores estresantes, tanto bióticos como abióticos.

La gomosis es un fenómeno poco difundido en el reino vegetal, mediante el cual las plantas responden a los diferentes tipos de estrés ambientales. Existen diferentes opiniones en lo que respecta al mecanismo fisiológico de la formación de las gomas. En algunos casos puede ser sencillamente la exudación y desecación por heridas producidas accidentalmente o deliberadamente, y con esta exudación la naturaleza protege esas heridas. Algunos investigadores sostienen que es un proceso patológico, ya que la gomosis, o sea el proceso de

degeneración de la célula es mas rápida en las superficies heridas que están expuestas a la infección por bacterias, hongos y parásitos. Otros trabajos sugieren que las gomas se almacenan en depósitos colocados en las raíces y tallos de algunas plantas, y cuando se acumulan en gran cantidad, rompen los tejidos y salen al exterior (Braverman, 1980; Hill, F.A., 1965; Koslowski y Kramer, 1979; Ruiz, *et al.*, 1950).

Gomas vegetales

Las gomas verdaderas se forman como resultado de la desintegración de tejidos internos, en especial de la descomposición de la celulosa por un proceso conocido con el nombre de gomosis. Las gomas contienen una gran cantidad de carbohidratos y están íntimamente relacionados con las pectinas. Son de naturaleza coloidal y solubles en el agua, ya sea disolviéndose completamente o hinchándose, pero no se disuelven en alcohol ni en éter. Son exudadas por los tallos, de modo natural o bien artificialmente a través de incisiones practicadas en ellos. Las gomas comerciales se expenden en el mercado en forma de polvo. Son frecuentes en las plantas de las regiones secas. Las tres gomas comerciales más importantes son: la goma arábica, la goma tragacanto y la goma karaya (Belits y Grosch, 1985; Braverman, 1980; Hill, F.A., 1965).

La goma arábica es un producto de exudación de la *Acacia senegal* y otras especies afines, pequeños árboles indígenas de las regiones áridas del Norte de Africa. La goma fluye lentamente en forma de un líquido viscoso que se reúne en una gota y luego se endurece formando gotas o lágrimas. Las gotas tienen un

tamaño promedio de 2 a 7 cm de diámetro. El rendimiento por árbol y año se encuentra como promedio entre 900 y 2000 g. El mayor productor es Sudán, con 50-60000 ton/año, seguido de algunos otros países africanos. La goma arábiga era conocida ya en el antiguo Egipto como “Kami”, y se utilizaba como adhesivo para colorantes (Belitz y Grosch, 1985; Charalambous y Doxastakis, 1989).

El término gomas se ha usado para referirse a un grupo muy vasto de polisacáridos que tienen propiedades gelificantes y espesantes. Originalmente las gomas eran consideradas como los productos de exudación de plantas; sin embargo, actualmente dentro de este grupo se incluyen muchos polímeros, aun sintéticos. La mayoría de las gomas naturales son polisacáridos muy complejos que pueden ser aniónicos o neutros. Existen varias gomas cuya estructura aún no es muy conocida debido a que son homopolisacáridos con múltiples ramificaciones compuestas de diferentes monosacáridos. La goma arábiga es una mezcla de diversos polisacáridos emparentados próximamente, con pesos moleculares comprendidos en el intervalo 260,000-1160,000 Da. Sus monómeros son L-arabinosa, L-ramnosa, D-galactosa y ácido D-glucorónico. Estudios recientes sobre la composición química de la goma arábiga han puesto de manifiesto la ocurrencia de una fracción proteínica, así como de los aminoácidos que componen a dicha fracción. Se ha encontrado que esta fracción proteínica es sin duda la que le confiere a la goma su poder emulsificante en un gran porcentaje. Se han propuesto esquemas sobre el posible arreglo espacial de los polisacáridos y las proteínas formando una especie de glicoproteína (Badui, 1993; Belitz y Grosch, 1985; Islam, *et al.*, 1997; Randall, *et al.*, 1989).

ANTECEDENTES

Prosopis laevigata

Prosopis laevigata (H. & B.) Johnston. Es un árbol, a veces hasta de 12 m de altura, aunque generalmente menor; tronco hasta de 1 m de diámetro, por lo general de 30 a 60 cm; corteza gruesa, de color café-negruzco, algo fisurada; copa más ancha que alta; ramas glabras o pilosas, armadas de espinas estipulares de 1 a 4 cm de largo; hojas pecioladas con 1 a 3 pares de pinnas, cada una con 10 a 20 pares de folíolos sésiles; flores dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo; flores blanco-amarillentas; legumbre linear, algo falcada, de 7 a 20 cm de largo por 8 a 15 mm de ancho, de color café-amarillento, a veces rojizo, algo constreñida entre las semillas; éstas oblongas, comprimidas de 8 a 10 mm de largo, de color blanco-amarillento.

A *P. laevigata* se le conoce con el nombre común de “mezquite”. Esta planta fue conocida como *P. juliflora* (Swartz) D.C., nombre que, según Johnston debe ser asignado a la especie que se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde Sinaloa a Centroamérica, Colombia y Venezuela, así como en las Antillas (Rzedowski, 1979).

- De acuerdo al sistema de clasificación de Cronquist, *Prosopis laevigata* tiene el siguiente lugar dentro de la sistemática vegetal:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledoneas)
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Genero	<i>Prosopis</i>

Jones y Luchsinger, 1986.

El polimorfismo presente en el género *Prosopis* se origina por las variadas condiciones ambientales en que se desarrolla y por su misma plasticidad genética, lo que ha dado lugar a cruzamientos naturales, dificultando la determinación de la taxonomía del mezquite.

Localización geográfica

A nivel mundial, el género *Prosopis* tiene 44 especies, de las cuales 42 se encuentran en el Continente Americano en dos grandes centros: el norteamericano (México-Texano) y el sudamericano (Argentino-Paraguayo-Chileno).

En México los mezquites se distribuyen en una superficie aproximada de 3'555,500 hectáreas (SFF, 1980), comúnmente en lugares áridos y semiáridos (Mapa 1). Su distribución es amplia, exceptuando las montañas y las partes bajas del sureste del país.

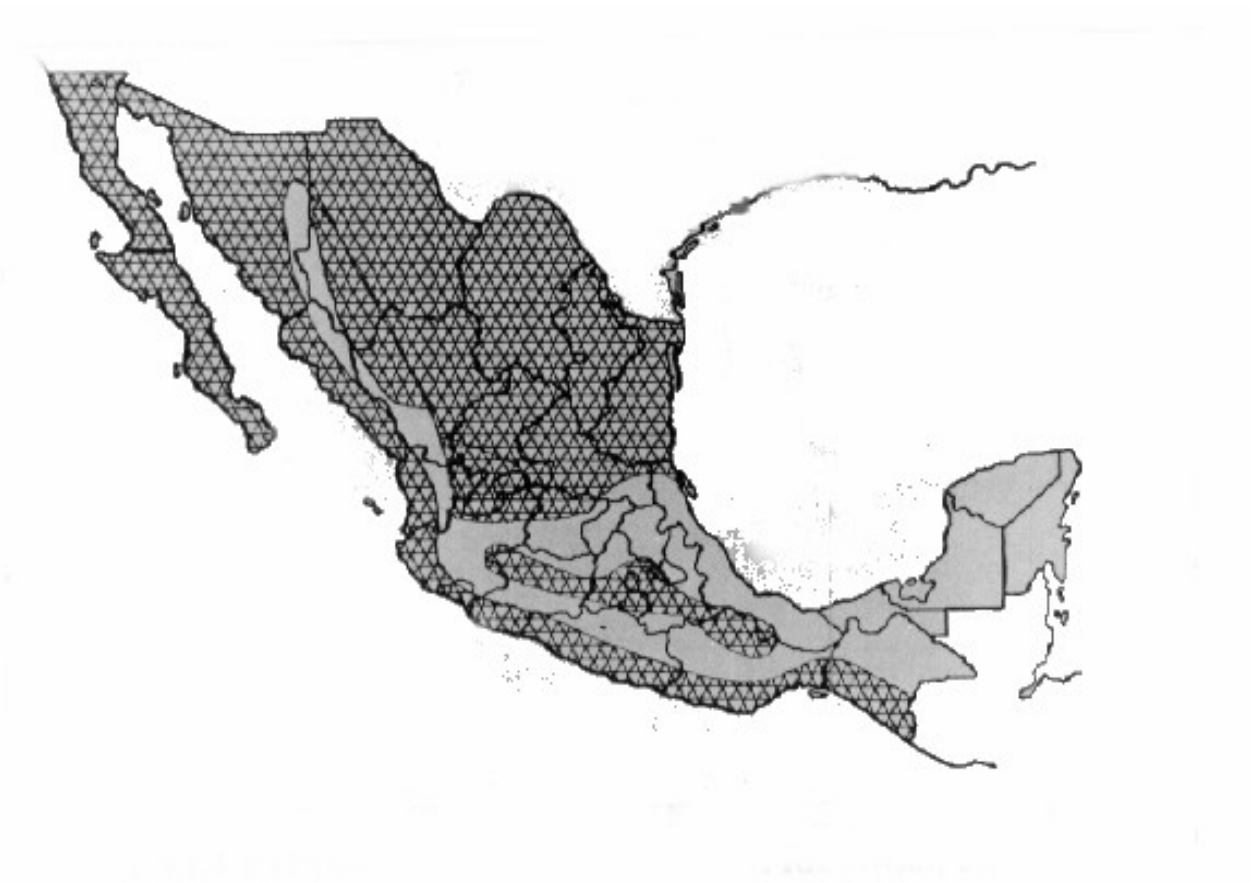
Donde el mezquite es la especie dominante, caracteriza a una comunidad vegetal denominada mezquital, la cual forma parte del bosque espinoso.

Los mezquites constituyen parte importante de la flora nacional, alcanzando inclusive carácter predominante en ciertas regiones; han estado ligados con la vida del campesino mexicano desde tiempos remotos (Villanueva, 1983).

El complejo mezquite se encuentra firmemente establecido en más de 3.5 millones de hectáreas del norte de México e incluye las siguientes especies autóctonas: *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P. velutina*, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. palmeri* y *P. laevigata*.

De acuerdo a Signoret (1970), las mayores concentraciones de mezquites se localizan en los estados del norte y centro del país, entre las que sobresalen Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro.

P. laevigata es el mezquite típico del Centro de México, es la especie dominante en San Luis Potosí así como en el centro y sur de Tamaulipas. Se distribuye en las isoyetas de 300 a 900 mm. y a altitudes hasta de 2300 msnm, principalmente entre los 1800 y 1900 msnm; se presenta en forma de árboles con alturas de 6 a 7 m, así como arbustiva de 2 a 3 m (CONAZA e INE, 1994).



Mapa 1. Distribución de los mezquites (*Prosopis spp.*) en la república Mexicana.
Fuente: Rzedowski, 1988

El mezquite como recurso natural

El mezquite es una planta originaria de México y elemento característico de las zonas áridas de Norte América, aunque su distribución se ha extendido hasta algunas regiones áridas y semiáridas de Centro y Sudamérica. En México es abundante en los Estados del norte y centro, así como en las planicies costeras en donde se establece en condiciones áridas y semiáridas. En muchos lugares de nuestro país esta planta ha sido considerada como maleza indeseable y es combatida en algunas regiones, debido a que se le atribuye una gran agresividad y competencia con especies forrajeras. El mezquite es una planta que desde la antigüedad constituyó una fuente de obtención de diversos productos para los pobladores de las zonas áridas de Norte América. En la actualidad se siguen obteniendo algunos beneficios pero en escala reducida. La madera se puede utilizar para fabricar postes, durmientes, mangos de herramientas, muebles, pisos de parquet, arados, carretas y en algunos lugares como en Texas, para el adoquinado de las calles. Es excelente combustible y fuente de carbón vegetal. En el Estado de Guanajuato se utiliza para la fabricación de hormas para calzado. La corteza ha sido utilizada para curtiduría regional. La corteza de la raíz se ha utilizado en cocción para curar heridas, como vomitivo y purgante; cuando es fermentada se obtiene una bebida sustituta del pulque. También se ha usado en cocimientos para curación de disentería o para algunas afecciones de los ojos. El jugo de las hojas, se dice curativo para algunas enfermedades oculares y de su cocción se obtiene bálsamo de mezquite, para este tipo de afecciones. Las flores del mezquite, son frecuentadas por gran cantidad de avispas y abejas que

producen miel de gran calidad. Se sabe que algunos indígenas de Norte América las consumían como alimento y en cocción, como vomitivo y purgante. La semilla constituye un alimento importante para la fauna local como la codorniz, el guajolote, ardillas, etc., y de su cocimiento se obtiene una melaza, debido al importante contenido de azúcares. El fruto tuvo un importante papel en la alimentación de algunos pueblos indígenas; los chichimecas hacían harina de los frutos secos con la que preparaban tortas o pasteles, conocidos ahora como “mezquitamales”; también hacían el “mezquiatole” (CONAZA e INE, 1994; Figueiredo, 1990; García y Galindo, 1986; INIREB, 1976; Romo, 1985; Rzedowski, 1988).

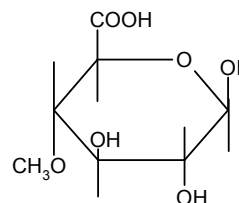
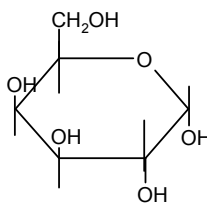
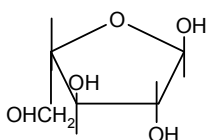
En la actualidad, en México los mezquites son considerados malezas únicamente en algunas regiones del norte del país donde la ganadería se practica intensamente. En el resto del país se aprecian sus cualidades por lo que se busca contribuir al mejor aprovechamiento de este recurso. Las semillas presentan un endocarpio duro que debe abrirse para permitir la germinación. Si las semillas al caer al suelo no son consumidas por animales permanecen en latencia hasta que el endocarpio sea abierto por un factor escarificativo (Vines, 1960).

La utilización de esta planta es amplia, su madera es dura y resistente, se utiliza como leña y para fabricar muebles (Meyer y Felker, 1989). La corteza por su alto contenido de taninos ha sido utilizada en curtiduría. De las hojas *P. juliflora* se han aislado los alcaloides juliflorina, julifloricina y julifloridina que poseen actividad antimicrobiana, (Aqueel *et al.*, 1989).

El mezquite forma parte del equilibrio ecológico de los desiertos mexicanos, ya que cuenta con un sistema de raíces profundas, que participan en la conservación

del suelo y del agua. Además por ser una leguminosa contribuye a nitrogenar el suelo.

El mezquite exuda de su tronco una resina ambarina semejante a la goma arábica que se acumula en las rugosidades de la corteza. Los análisis químicos realizados a la goma establecen que es una sal neutra de un polisacárido ácido (tabla 1), altamente ramificado y constituido por residuos de L-arabinosa, D-galactosa, ácido 4-O-metil-D-glucurónico y L-ramnosa en una relación molar 2:4:1:1 (Aspinall y Whitehead, 1970). Tabla1.



L-arabinosa¹	D-galactosa¹	Acido 4-O-metil-D-glucurónico²
50.7%	18.7%	13%

Humedad¹	11%
Ceniza¹	2.13%
Proteína¹	4.37%
Total	99.9%

Tabla 1. Componentes de la goma de mezquite

¹ Anderson and Sands, 1926. *J.Amer. Chem. Soc.* **48**: 3172.

² Anderson and Otis, 1930. *J.Amer. Chem. Soc.* **52**: 4461.

Gomas vegetales

Las gomas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para controlar las propiedades reológicas de muchos productos, en concentraciones que varían desde 0.05 % hasta 5.0 %. La goma arábiga se utiliza sobre todo como espesante, emulsificante y estabilizador, por ejemplo en productos de panadería. En dulces previene la cristalización del azúcar y la separación de las grasas, en helados la formación de grandes cristales de hielo, y en bebidas puede actuar como estabilizador de espuma y emulsiones. Esta goma posibilita también la preparación de microencapsulados de aroma, sabor y pigmentos en forma de polvo (Belitz y Grosch, 1985).

Estos hidrocoloides no contribuyen al valor nutritivo del alimento ya que el humano no los metaboliza y además no imparten olor o sabor a los productos finales en los que se emplean. Otra aplicación muy importante de las gomas es como adhesivos, drogas y se emplean también en el estampado y acabado de tejidos, para encolar papel, etc. (Charley, 1997).

Dentro de este contexto a nivel nacional los árboles de mezquite juegan un papel importante como un recurso de las extensas zonas áridas del país. Dichos árboles producen un exudado conocido como goma de mezquite. Los estudios químicos realizados a esta goma indican que tiene una composición semejante y un comportamiento reológico similares a la goma arábiga, que es un producto de importación, de ahí que sea susceptible su utilización en la industria alimenticia como una alternativa más económica (Aspinall y Whitehead, 1970; Beristáin y Vernon-Carter, 1995).

Cultivo de tejidos vegetales en plantas del género *Prosopis*

A pesar de la importancia del mezquite, se ha incrementado la tala indiscriminada de los bosques para su utilización como carbón o para el uso agrícola del suelo, por lo que es necesario desarrollar un plan de reforestación basado en métodos tradicionales de cultivo y en el desarrollo de biotecnologías para la propagación de individuos sobreproductores de goma o de rápido crecimiento. Diversas técnicas de micropropagación se han empleado con éxito en plantas leñosas (micropropagación por explantes nodales, cultivo de callos embriogénicos, etc.), obteniendo la propagación masiva de plantas en condiciones controladas, libres de patógenos y con las características genéticas deseadas (Woods, 1985; García y Galindo, 1986).

Existen actualmente en la literatura trabajos sobre micropropagación de especies del género *Prosopis*, siendo la técnica mas socorrida la del cultivo de segmentos nodales, en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) como medio de establecimiento y multiplicación; así como la utilización de AIB (ácido indolbutírico) para la inducción de raíces adventicias.

En 1989, Batchelor y sus colaboradores a partir de explantes nodales micropropagaron plantas de *P. cineraria*, *P. tamarugo*, *P. chilensis*, *P. alba* y *P. juliflora*.

Balboa y Arce (1991) utilizando segmentos nodales como explantes y medio MS suplementado con 5.0 mg/L y 10.0 mg/L de cisteína, lograron micropropagar *P. chilensis*.

Estudios bioquímicos empleando cultivo de tejidos vegetales

Las aportaciones del cultivo de tejidos vegetales en estudios bioquímicos para elucidar las incógnitas de las ciencias vegetales, son extremadamente numerosas (Tabla), (Cadmó y Villalobos, 1985). De ahí que el cultivo de tejidos vegetales se utilice a menudo como un sistema "modelo" para el estudio de aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales de las plantas.

Tabla. Ejemplos de estudios bioquímicos usando cultivo de tejidos vegetales.

Estudio bioquímico	Ejemplo de cultivos empleados	Referencias (Citadas en: Cadmó y Villalobos, 1985).
A. Eventos bioquímicos asociados con la regeneración de plantas o micropropagación <i>in vitro</i> . 1. Organogénesis <i>de novo</i> . 2. Embriogénesis somática	Callos de tabaco Callos de <i>Papaver orientalis</i>	Leung y Thorpe (1985) Hara <i>et al.</i> (1985)
B. Metabolismo primario en relación a: 1. Crecimiento en cultivo de células vegetales 2. Estudio y producción de mutantes deficientes de metabolitos	Callos de tabaco Protoplastos de mesófilo de petunia	Obata-Sasamoto <i>et al.</i> (1984) Steffen y Schieder (1984)
C. Metabolismo secundario 1. Regulación 2. Biotransformación de productos útiles por cultivo de tejidos	Cultivo en suspensión de <i>Mucuna puriens</i> Callos de crisantemo y folíolos de cineraria	Winchers <i>et al.</i> (1985) Kuch <i>et al.</i> (1985)
D. Metabolismo de reguladores de crecimiento	Células en suspensión de pera	Balanque y Pech (1985)
E. Enzimología 1. Mecanismo molecular de inducción de enzimas y represión en células vegetales 2. Localización subcelular en enzimas	Células en suspensión de perejil Protoplastos de tomate	Kuhn <i>et al.</i> (1984) Waternack <i>et al.</i> (1985)
F. Bioquímica de la pared celular	Suspensiones sincronizadas de <i>Catharanthus roseus</i>	Amino <i>et al.</i> (1985)
G. Retención y transporte de sustancias orgánicas e inorgánicas	Protoplastos aislados de cotiledones de soja	Lin (1985)
H. Ingeniería genética de plantas	Protoplastos de tabaco	Frioozabady y Galbraith (1984)
I. Estudio en líneas de células variantes: Mecanismos bioquímicos para resistencia a salinidad, toxinas, etc.	Células en suspensión de <i>Datura innoxia</i>	Jackson <i>et al.</i> (1984)

Tomado de Cadmó y Villalobos, 1985.

Factores de inducción de producción de compuestos antimicrobianos *in vitro*

Se considera a las fitoalexinas como compuestos de bajo peso molecular que son sintetizados y acumulados en las plantas después de una infección por microorganismos, o por el ataque de depredadores, o por estrés ambiental. Se han determinado para las fitoalexinas las características generales siguientes: a) se encuentran en cantidades no detectables en la planta, antes de la infección microbiana o fúngica, b) se biosintetizan en horas una vez que ha ocurrido infección, c) sus sitios de biosíntesis están restringidos a regiones específicas alrededor del sitio de infección y d) son tóxicas para un amplio espectro de bacterias y hongos que atacan a una determinada especie vegetal. Estas respuestas se han estudiado en cultivos de células vegetales en suspensión por adición de un agente patógeno o por efecto de un factor de estrés que induce la producción de una fitoalexina en los cultivos. A estos factores de inducción se les ha identificado como elicitores (Whitehead y Threfall, 1992).

Por su naturaleza química los elicitores se han clasificado como bióticos y abióticos. Entre los elicitores bióticos se incluyen polisacáridos, glucoproteínas, péptidos y ácidos grasos de origen biológico provenientes de componentes estructurales de microorganismos y fragmentos de pared celular vegetal. Los elicitores abióticos incluyen metales pesados como CdCl_2 , CuSO_4 y HgCl_2 , cambios en el pH y luz UV entre otros factores (Eilert, 1987).

Considerando estos antecedentes, las fitoalexinas y las gomas vegetales tienen varias características en común. Esto conduce a la siguiente pregunta. ¿Si la

adición o exposición de un elicitador a cultivos de células en suspensión, se ha utilizado como una estrategia para incrementar la producción de una fitoalexina, entonces, sería factible utilizar esta misma estrategia metodológica para promover la gomosis en cultivos *in vitro* de mezquite?

OBJETIVO GENERAL

Caracterización parcial de la composición química de un exudado producido por cultivos *in vitro* de segmentos nodales de *P. laevigata* sujetos a estrés.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la respuesta de cultivos *in vitro* de *P. laevigata* a temperaturas extremas y daño físico.
- Contribuir al conocimiento de la interacción microorganismo-planta.
- Producción *in vitro* de un exudado de *P. laevigata*.
- Análisis químico parcial del exudado producido por *P. laevigata* bajo las condiciones de experimentación.

HIPOTESIS

Los diferentes estrés a los cuales fueron sometidos los cultivos de *P. laevigata*, promoverán la producción de un exudado, tratándose posiblemente de una goma vegetal.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Selección y desinfestación de explantes

Se tomaron como explantes segmentos nodales de *P. laevigata* provenientes de plantas cultivadas en invernadero con una edad promedio de 2 años. Los explantes contaron con dos nudos cada uno, se lavaron con detergente y agua corriente, posteriormente se sumergieron en una solución de etanol al 70% por 1 min. Una vez drenado el etanol, los explantes se volvieron a desinfestar en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 100%, durante 10 min. Después se procedió a enjuagar los explantes con agua destilada esterilizada por 5 ocasiones.

Tratamientos y medios de cultivo

Terminada la desinfestación, se cortaron los extremos de los explantes para eliminar el tejido dañado por la solución de hipoclorito de sodio. Posteriormente se colocaron en una solución antioxidante durante 15 min. Esta solución estuvo compuesta de 50 mg/L de ácido ascórbico + 100 mg/L de ácido cítrico (Batchelor *et al.*, 1989).

Dichos explantes se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (Sigma M-5519) suplementado con sacarosa (3.0 %), L-glutamina (1.6 g/L), ácido ascórbico (50.0 mg/L), ácido cítrico (100.0 mg/L), ácido naftalenacético (1.0 mg/L), bencilaminopurina (5.0 mg/L) y 2.0 g/L de phytigel (Orozco, 1996).

El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.7-5.8, esterilizándose a 121°C durante 15 min.

Los cultivos fueron sometidos a tres tipos de estrés tales como:

- a) Diferentes temperaturas de incubación (25, 35 y 40 °C).
- b) Se realizaron cocultivos con dos diferentes microorganismos, es decir, se cultivaron en un mismo recipiente y medio de cultivo tallos de mezquite con un hongo inferior como lo es *Aspergillus nidulans* y una bacteria (mezquite vs hongo y mezquite vs bacteria) (tablas 2 y 3).
- c) Un estrés mecánico el cual consistió en hacer incisiones o lesiones en los explantes al momento de su siembra *in vitro*.

La bacteria utilizada fue aislada de un cultivo *in vitro* de mezquite, dicho cultivo presentaba una formación importante de un exudado, la bacteria aislada esta siendo tipificada y por el momento se sabe que es un bacilo alargado Gram + y que responde positivamente a la prueba de las enzimas oxidasa y catalasa.

Además de probar de manera individual los diferentes estrés, se llevó a cabo un diseño experimental con todas las posibles combinaciones de los mismos (tablas 2 y 3). Todos los cultivos, independientemente del estrés al cual hayan sido sometidos, fueron incubados en oscuridad total durante 21 días. Sé realizó un lote testigo, al cual no se le aplicó ningún tipo de estrés, salvo que en este caso la incubación fue a temperatura ambiente (25 °C promedio) con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Parte de los tratamientos anteriores consistió en utilizar microorganismos vivos, de tal manera que se decidió probar a estos mismos pero inactivos, es decir, muertos.

Para tal efecto se llevó a cabo la siguiente metodología. Los microorganismos descritos anteriormente fueron cultivados de manera individual en medio de cultivo líquido MS. En cuanto el crecimiento alcanzó la fase estacionaria el micelio y la biomasa bacteriana fueron recuperadas por filtración respectivamente. Tanto el micelio como la biomasa bacteriana se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos y fueron secados a 60 °C durante 36 horas. Cantidades de 10, 20 y 30 mg de micelio y bacteria secos se transfirieron a viales Eppendorf, y a cada vial se adicionó 1 mL de agua desionizada para esterilizarse bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, y se almacenaron en congelación a –30 °C (Rojas, 1998). Se realizaron cocultivos de mezquite y los microorganismos inactivos, probándose tres diferentes concentraciones de micelio y biomasa microbiana, 10, 20 y 30 mg respectivamente (tabla 4). Las condiciones de experimentación, así como el medio de cultivo, exceptuando las incisiones en los explantes, fueron los mismos que se implementaron para los cocultivos con microorganismos vivos.

Finalmente se realizaron cocultivos de mezquite y la bacteria viva, siendo la diferencia con los anteriores tratamientos el medio de cultivo utilizado, en este caso se utilizó agar nutritivo únicamente, además de que los explantes no se sumergieron en la solución antioxidante anteriormente descrita. Se tuvo un lote testigo, el cual consistió en cultivos asépticos de mezquite, la incubación fue a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Los diferentes tratamientos constaron de 20 unidades experimentales (se consideró una unidad experimental a cada uno de los explantes).

Tabla 2. Estrés aplicados para la inducción de gomosis en cultivos *in vitro* de *P. laevigata*.

	25 °C	35 °C	40 °C	Incisión	Bacteria	Incisión-Bacteria	Testigo
25 °C	♣			♣	♣	♣	♣
35 °C		♣		♣	♣	♣	
40 °C			♣	♣	♣	♣	

Tabla 3. Estrés aplicados para la inducción de gomosis en cultivos *in vitro* de *P. laevigata*.

	25 °C	35 °C	40 °C	Incisión	Hongo	Incisión-Hongo	Testigo
25 °C	♣			♣	♣	♣	♣
35 °C		♣		♣	♣	♣	
40 °C			♣	♣	♣	♣	

Tabla 4. Estrés aplicados para la inducción de gomosis en cultivos *in vitro* de *P. laevigata*.

	10 mg	20 mg	30 mg
Bacteria	♣	♣	♣
Hongo	♣	♣	♣

Nota: Ambos microorganismos se inocularon inactivos

Análisis químico

Se espera que como respuesta a los diferentes estrés aplicados, los cultivos, específicamente los segmentos nodales de mezquite produzcan un exudado. Una

vez analizados los resultados arrojados por cada tratamiento, se determinó cual de ellos fue el que produjo un mayor volumen y proporción de dicho exudado (número de explantes formadores de exudado), para posteriormente realizar varios duplicados de este experimento hasta obtener una cantidad de exudado que permitiera realizar un análisis químico preliminar.

El análisis comprendió las determinaciones de los contenidos de proteínas por el método de Lowry y de azúcares totales por Fenol-sulfúrico, así como dos diferentes pruebas de identidad para gomas vegetales, realizadas paralelamente a muestras de goma arábica y de mezquite.

También se llevo acabo una cromatografía de baja presión, utilizando una columna de interacción hidrofóbica (Phenyl-Sepharose CL-4B). La columna se empaco con el gel antes mencionado, utilizando como solución equilibrante NaCl 4.2 molar. Un volumen de 5 mL de una solución 1:5 de exudado y NaCl 4.2 molar fue dializada y filtrada a través de membranas millipore de 0.22 μm . La solución se inyectó en la columna a un flujo de 0.3 mL/min. El eluyente fue monitoreado en un espectrofotómetro UV a una absorbancia de 280 nm. Se utilizaron tres diferentes eluyentes, NaCl 4.2 y 2.0 molar, y agua desionizada, en este mismo orden. Los eluyentes fueron colectados y almacenados para un posterior análisis. Esta cromatografía se utilizó para el fraccionamiento del exudado. Se utilizaron como elementos de comparación los perfiles de elución de soluciones de goma arábica y mezquite, las cuales fueron trabajadas en condiciones idénticas al exudado.

Finalmente se realizó una prueba para la identificación de taninos, ya que la presencia de estos en una goma vegetal es una limitante importante para su uso en la industria alimenticia.

RESULTADOS Y DISCUSION

El uso de lesiones mecánicas, altas temperaturas y el ataque de microorganismos como factores estresantes, promovió la formación de un exudado en los cultivos *in vitro* de mezquite, cuyo aspecto físico es semejante al de una goma vegetal (color ámbar, translucido, viscoso, etc.).

Cocultivos con microorganismos vivos

De 20 unidades experimentales que comprendió cada tratamiento, los segmentos nodales de mezquite cocultivados con la bacteria e incubados a 35 °C, produjeron exudado en el 100 % de los cultivos; mientras que esta producción disminuyó cuando estos mismos cocultivos se incubaron a 25 y 40 °C, asimismo, el volumen de exudado producido por tratamiento es considerablemente menor a los 0.25 mL producidos por los cocultivos incubados a 35 °C (tablas 5 y 6). Al probar de manera individual los diferentes tipos de estrés se pudo observar que la formación de exudado es poco satisfactoria, no así cuando se emplean conjuntamente, por lo que aparentemente existe una interacción de variables experimentales, sobresaliendo la referida a la bacteria utilizada y a la temperatura de incubación de 35 °C. No obstante, debe considerarse la posibilidad de que dicho microorganismo a 35 °C tiene un desarrollo óptimo y que temperaturas mayores o inferiores a ésta disminuyan su actividad metabólica, consecuentemente también su capacidad patógena. Por lo que sería recomendable experimentar con microorganismos cuyos rangos óptimos de temperatura de incubación sean más amplios y de esta

forma contar con más datos acerca del verdadero papel que juegan ambas variables, ya sea de manera individual o conjunta.

Incisiones *in vitro*

La implementación de lesiones mecánicas en la superficie de los explantes se realizó con la finalidad de simular en el laboratorio la forma en que en el campo se hieren las cortezas de los árboles de mezquite o de *Acacia senegal* para provocar la gomosis; observándose que por si solo un corte en el tallo al momento de su siembra *in vitro* no favorece de manera importante la formación de exudado; sin embargo, en combinación con otras variables la producción de dicho exudado aumenta considerablemente (tablas 5 y 6).

Tabla 5. Respuesta de cultivos *in vitro* de *P. laevigata* a diferentes estrés.

	25 °C	35 °C	40 °C	Bacteria	Incisión	Bacteria- Incisión	Testigo
25 °C	5.0 %			25.0 %	0.0 %	55.0 %	0.0 %
	<0.025 mL			<0.025 mL	0.0 mL	<0.05 mL	0.0 mL
35 °C		55.0 %		100.0 %	50.0 %	100.0 %	
		<0.05 mL		0.25 mL	≤0.1 mL	≤0.25 mL	
40 °C			35.0 %	80.0 %	45.0 %	60.0 %	
			<0.05 mL	<0.05 mL	<0.025 mL	0.075 mL	

%= porcentaje de explantes con formación de exudado; mL= mililitros de exudado producido, por tratamiento.

Tabla 6. Respuesta de cultivos *in vitro* de *P. laevigata* a diferentes estrés.

	25 °C	35 °C	40 °C	Hongo	Incisión	Hongo- Incisión	Testigo
25 °C	5.0 %			10.0 %	0.0 %	15.0 %	0.0 %
	<0.025 mL			<0.025 mL	0.0 mL	<0.025 mL	0.0 mL
35 °C		55.0 %		85.0 %	50.0 %	25.0 %	
		<0.05 mL		≤0.1 mL	≤0.1 mL	<0.05 mL	
40 °C			35.0 %	25.0 %	45.0 %	80.0 %	
			<0.05 mL	<0.025 mL	<0.025 mL	<0.05 mL	

%= porcentaje de explantes con formación de exudado; mL= mililitros de exudado producido, por tratamiento.

Cocultivos con microorganismos inactivos

La adición de elicitores a los medios de cultivo promovió la formación de exudado. La cantidad de exudado producido fue la misma para todos los tratamientos (≤0.25 mL; tabla 7). Esto quiere decir que la sola presencia de algún componente celular microbiano es suficiente para causar un estrés en la planta y como consecuencia esta última produzca un exudado. De esta manera no es necesario una infección directa por parte del microorganismo. Por lo tanto, en los cultivos realizados no hay una infección como tal, lo que sucede es que al realizar cortes en los tallos, una parte del tejido interno de la planta queda en contacto con el microorganismos inactivo, de tal manera que la planta reconoce alguna señal emitida por un compuesto en particular y la respuesta a dicha señal es presumiblemente la

síntesis de un exudado, tal y como ocurre con los factores que promueven la producción de fitoalexinas.

Tabla 7. Estrés aplicados para la inducción de gomosis en cultivos *in vitro* de *P. laevigata*.

	10 mg	20 mg	30 mg
Bacteria	100.0 %	100.0 %	100.0 %
	≤0.25 mL	≤0.25 mL	≤0.25 mL
Hongo	100.0 %	100.0 %	100.0 %
	≤0.25 mL	≤0.25 mL	≤0.25 mL

%= porcentaje de explantes con formación de exudado; mL= mililitros de exudado producido, por tratamiento.

Cultivos en agar nutritivo

Para este experimento se decidió probar un medio de cultivo alternativo al medio MS, el cual es utilizado de manera rutinaria en cultivo de tejidos vegetales. Los cultivos se realizaron en agar nutritivo, de este modo se pretendió favorecer el crecimiento de la bacteria y no el de la planta, además al tener un lote testigo (sin la bacteria), se probaron dos diferentes tipos de estrés: el medio de cultivo y el microorganismo. Los resultados obtenidos indican que el cambio de un medio de cultivo rico en sales a uno pobre no fomenta de manera importante la producción de exudado (≤0.05 mL), este valor es muy bajo comparado con el registro mas alto (≤0.25 mL; tabla 7). Sin embargo al realizar los cocultivos con la bacteria los mililitros de exudado formado aumentan de manera considerable (≤0.25 mL). Por

lo que podemos mencionar que la presencia del microorganismo es determinante en este fenómeno.

Pruebas de identificación

Se realizaron dos diferentes ensayos de identidad, uno específico para goma arábica (Food Chemical Codex, 1981) y otro para gomas solubles (Farmacopea Mexicana, 1988). En ambos ensayos el exudado y la goma de mezquite dieron pruebas positivas (tabla 8).

Tabla 8.- Pruebas de identidad para gomas vegetales

Arábiga	+
Mezquite	“+”
Exudado	“+”
Food Chemical Codex	

	Paso 1	Paso 2
Arábiga	-	-
Mezquite	“+”	-
Exudado	“+”	-

Farmacopea Mexicana	
----------------------------	--

Azúcares y proteínas totales

Las pruebas químicas realizadas al exudado producido indican que tiene una composición química similar a la de la goma arábica y a la de la goma de mezquite, en lo que se refiere a las concentraciones de proteínas y azúcares, siendo mayores los valores encontrados para el exudado que para las gomas antes mencionadas (tabla 9). La presencia y la concentración de azúcares y proteínas contenidas en el exudado, así como los ensayos de identidad, pueden tomarse como un indicativo inicial de que se trata de una goma vegetal, de ser así, el 11.02 % de proteína contenido en esta goma, le conferiría un poder emulsificante mayor que el de la goma arábica (6.01 %) y que el de la goma de mezquite (7.29 %). En este sentido cabe mencionar que la adición de pequeñas cantidades de concentrados proteicos incrementa la capacidad emulsificante de soluciones de goma arábica (Dziezak, 1991).

Tabla 9. Concentración de proteínas y azúcares totales de las muestras analizadas

	Proteínas %	Azúcares %
Arábica	6.01	92.3
Mezquite	7.29	87.39
Exudado	11.02	90.47

Nota: Los resultados están expresados en base seca

Taninos

Evaluar la presencia de taninos resulta de suma importancia, debido a su sabor astringente indeseable en varios alimentos. Los resultados muestran que la goma arábica y el exudado no presentan taninos. No así la goma de mezquite, aunque la presencia de estos que es muy baja, obedece a que la goma que se utilizó para la prueba no estaba del todo libre de restos de corteza, la cual es rica en estos compuestos.

Tabla 10.- Pruebas de detección para taninos

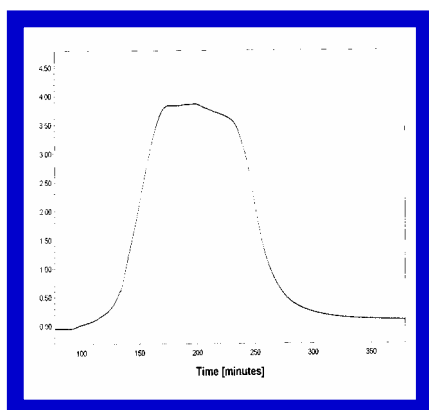
Arábica	-
Mezquite	"+"
Exudado	-

+ = prueba positiva, - = prueba negativa

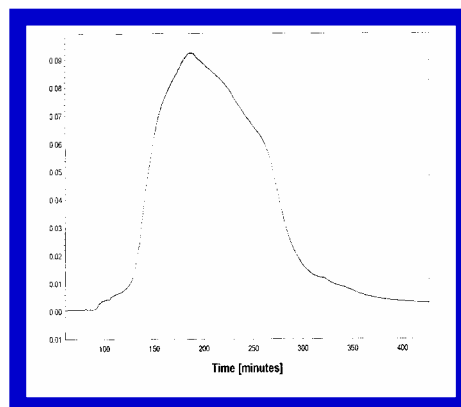
Fraccionamiento cromatográfico

Los cromatogramas obtenidos para el exudado y la goma de mezquite se muestran en las figuras 2, 3 y 4. En ellos podemos observar que los perfiles de elusión son muy parecidos. En ambos casos se obtuvieron tres fracciones, dos de ellas muy bien definidas. El tiempo de elusión para cada una de las fracciones es prácticamente igual en las dos muestras. Esto quiere decir que las muestras contienen grupos terminales muy similares, ya que muestran una afinidad muy parecida por la columna y a su vez una solubilidad semejante para con los distintos eluyentes utilizados. Por consiguiente tenemos una evidencia más sobre el parecido químico de las gomas y el exudado.

Figura 2. Perfiles de elusión, Fracción 1, eluyente 4.2 M NaCl.

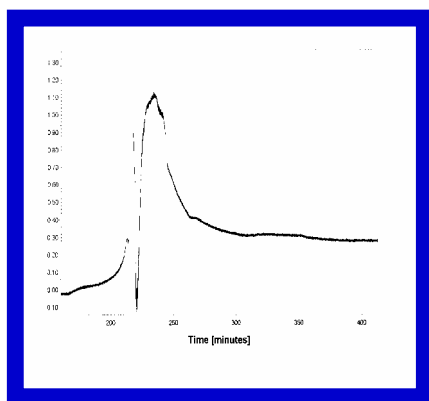


Mezquite *in situ*

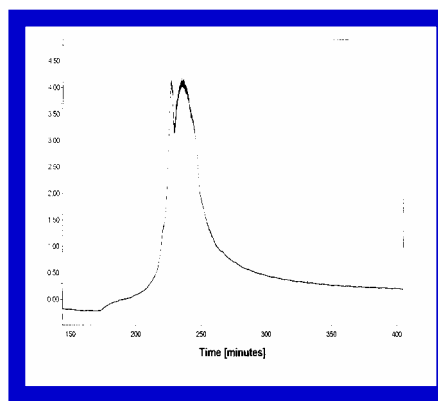


Exudado *in vitro*

Figura 3. Perfiles de elusión, Fracción 2a y 2b, eluyente 2.0 M NaCl.

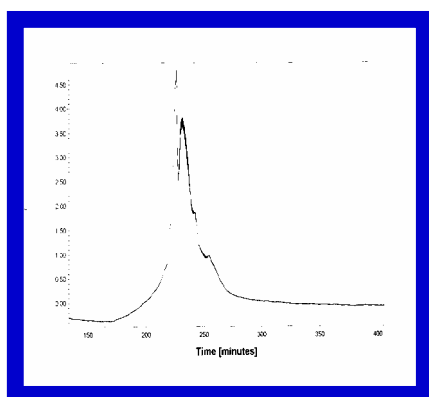


Mezquite *in situ*

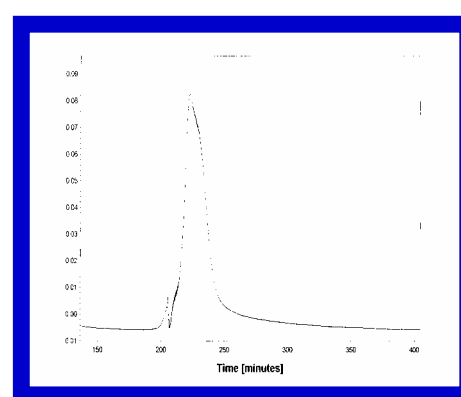


Exudado *in vitro*

Figura 4. Perfiles de elusión, Fracción 3a y 3b, eluyente agua desionizada.



Mezquite *in situ*



Exudado *in vitro*

CONCLUSIONES

- El uso de diferentes tipos de estrés promueve la formación de un exudado en cultivos *in vitro* de *P. laevigata*. Siendo el cocultivo con un microorganismo y una temperatura de incubación de 35°C, la combinación de tratamientos más favorable. De la misma forma se propone la posibilidad de que exista una interacción entre dos diferentes formas de estrés (microorganismo-temperatura) que esté favoreciendo la formación de exudado en los cultivos.
- Resulta factible implementar las diferentes estrategias metodológicas utilizadas para promover la síntesis de fitoalexinas, en el estudio y la producción de una goma vegetal *in vitro*.
- Al encontrar concentraciones de azúcares y de proteínas muy similares a las registradas por la goma de mezquite y siendo positivos los resultados obtenidos en los ensayos de identidad para el exudado, además de presentar un perfil cromatográfico muy similar al de las gomas de mezquite y arábica; Se puede afirmar, aunque no de manera definitiva, que la identidad química del exudado es la de una goma vegetal.

LITERATURA CITADA

- Azcon, J. Y Talon, M., 1993. **Fisiología y Bioquímica Vegetal**. McGraw-Hill. España.
- Abdelnour, E.A. y E.J. Vincent, 1994. **Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Alcocer, G.V., 1903. **El mezquite**. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo V, pag. 99. México. verificar esta cita
- Ammirato, P.V., 1985. Patterns of development in tissue culture. In: **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. Henke, H. and Constantin, H. (Eds.). Plenum Press.
- Aqueel A., Khursheed K., Vigaroddin A. and Sabiha Q., 1989. Antimicrobial Activity of fulifloricine isolated from *Prosopis juliflora* . *Arzneim Forsch / Druz Res.* **39**(1).
- Arya, H.C. y Shekhawat, N.S., 1986. Clonal Multiplication of Tree Species in the Thar Desert Through Tissue Culture. *Forest Ecology and Management.* **16**: 201-208.
- Aspinall, G.O. y Whitehead, C.C., 1970. Mesquite gum. The 4-0-methyl glucorone galactan core. *Can. J. Chem.* **48**: 3840-3849.
- Badui, D.S., 1993. **Química de los alimentos**. 3^{ra} edición. Pearson. México.
- Balboa, O. y Arce, P., 1991. Seasonality in Rooting of *Prosopis chilensis* cuttings and *in vitro* Micropropagation. *Forest Ecology and Management.* **40**:163-173.
- Barba, A.A., 1987. Reguladores del crecimiento vegetal. En: **Cultivo de Tejidos Vegetales**. Hurtado, M.D. y Merino, M.M. (Eds.). Trillas, México.
- Batchelor, C.A., Yao, D., Kochler, M.J. y Harris, P.J. 1989. *In vitro* propagation of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*). *Ann. Sci. For.* **46** suppl., 110s-112s.
- Belitz, H.D. y Grosh, W., 1985. **Química de los Alimentos**. 2^a edición. Acribia. España.
- Beristaín, C. I. y Vernon-Carter, E.J., 1995. Studies of the interaction of arabic (*Acacia senegal*) and mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsion stabilizing agents for spray-dried encapsulated orange peel-oil, *Drying Technol.*, **13** (1,2), 455-461.

- Bidwell, R.G., 1979. **Fisiología Vegetal**. AGT. México.
- Braverman, J.B.S., 1980. **Introducción a la Bioquímica de los Alimentos**. Manual Moderno. México.
- Bukart, A. 1976. A monograph of genus *Prosopis* (leguminosaea Subfam. Mimosoideae). *Journ. Arnold Arbor*. **57**:217-249; 450-485.
- Cadmo, H.R. y Villalobos, V.M., 1985. **Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. FAO. México.
- CONAZA e INE, 1994. **Mezquite *Prosopis spp***, Editorial de la Comisión Nacional de las Zonas Áridas, Instituto Nacional de Ecología México.
- Charalambous, G. y Doxastakis, G., 1989 (Eds). **Food Emulsifiers, Chemistry, Technology, Functional and Applications**. Elsevier. Holanda.
- Charley, H., 1997. **Tecnología de Alimentos**. LIMUSA. México.
- Debergh, P.C. y Zimmerman, R.H., 1991 (Eds). **Micropropagation: Technology and Applications**. Kluwer Academic Pub. The Netherlands.
- Dixon, R.A., 1985. **Plant Cell Culture a Practical Approach**, IRL Press.
- Dixon, R.A. y Paiva, N.L., 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant cell*. **7**: 1085-1097.
- Dollard J.W. y Walker, M. J., 1990, **Plant Cell and Tissue Culture**, Humana Press.
- Dodds, J.H. y Loring W.R., 1982, **Experiments in Plant Tissue Culture**, Cambridge University Press.
- Dziezak, D. J. Ed. 1991. A focus on gum, special report. *Food Technology*. March, 116-132.
- Eilert, U., 1987. Elicitation: Methodology and aspects of application. In: Constabel F. y Vasil I.K. (eds). **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. Vol. 4. Academic Press.
- Evans, D.A. y Flick, C.E., 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: **Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture**. Thorpe, A.T. (Ed.). Academic Press, U.S.A
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**. 1988. 5^{ta} edición.

Figueiredo, A.A., 1990. Mesquite : History, Composition, and Food Uses. *Food Technology*. November. 118-128.

Food Chemical Codex. 1981. 3^{ra} edición.

García, M.E. y Galindo A.S., 1986. The Uses of Mesquite (*Prosopis* spp.) in the Higlands of San Luis Potosi, Mexico. *Forest Ecology and Management*. **16**: 49-56.

Gautheret, R.J., 1985. History of plant tissue and cell culture: A personal account. In: **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. Vol. **2**. Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation and Cryopreservation. Vasil, I.K. Academic Press. U.S.A.

Goyal Y. and Arya M.C. 1984. Tissue culture of desert trees: I Clonal multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. *J. Plant Physiology* **115**:185-189.

Haissig, B.E., 1989. Status of forest tree vegetative regeneration for biotechnology. *BIO/TECHNOLOGY* **7**:48-51.

Hill, F.A., 1965. **Botánica Económica “plantas útiles y productos vegetales”**. OMEGA. España.

Hudson T.H., 1986, **Propagación de Plantas**: Principios y Prácticas, 3^a ed., CECSA, México.

INIREB, 1976, **El mezquite**, Comunicado No. 6, Instituto Nacional de Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz, México.

Jordan M. and Balbao O. 1985. *In vitro* regeneration of *Prosopis tamaragu*. Phil and *Prosopis chilensis* (Mol). Stuntz from nodal sections. *Gartenbavwissenschaft*. **50**:138-144.

Kavanagh, k., Drew, A.P. y Maynard, C., 1991. The effect of the culture vessel on micropropagation. En: **Biotechnology in Agriculture and Forestry 17. High Tech. and Micropropagation I**. Bajaj, Y.P.S., Ed. Springer Verlag, Germany.

Koslowski, T.T. y Kramer, J.P., 1979. **Physiology of Woody Plants**. Academic Press. E.U.

López, P.C., 1985. Medios de cultivo. En: **Fundamentos Teóricos-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. Cadmo, H. R. y Villalobos, V.M. (Eds.). FAO. México.

Loyola Vargas V.M., **Obtención de metabolitos Secundarios a partir de Tejidos Vegetales y sus Perspectivas Biotecnológicas**, CICY.

- Maldonado L.J. 1990. *Prosopis* in Mexico. In the current state of knowledge on *Prosopis juliflora*. INIFAP. Dircapo. 12:17
- Mantell S.H. and H. Smith, 1983, **Plant Biotechnology**, Cambridge University Press.
- Martinez M., 1990, **Las Plantas Medicinales de México**, 6ª ed., Ediciones Botas.
- Meyer J.M. and Felker P. 1989. Pruning mesquite (*Prosopis grandulosa* Var. *grandulosa* suplings for lumber productions and ornamental use. Forest ecology and Manegment. **36**:301-306.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco cultures. Physiology plant. **15**:473.
- Murashige. T. 1974. Plant propagation throgh tissue cultures. Ann Rev. Plant Physiol. **20**:135-166.
- Ochoa, A.N., 1985. Establecimiento de cultivos *in vitro*. En: **Fundamentos Teóricos-Practicos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. Cadmo, H. R. y Villalobos, V.M. (Eds.). FAO. México.
- Orozco, V.J., 1996. **Efecto de bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Prosopis laevigata* H. & B. (FABACEAE) a partir de explantes nodales**. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM Campus Iztacala. Los Reyes Iztacala, Edo. Mex.
- Pollard, J.W. y Walker, J.M., 1990. **Methods in Molecular Biology. 6 "Plant Cell and Tissue Culture"**. Humana Press. Clifton, New Jersey. U.S.A.
- Randall, R.C., Phillips, G.O. y Williams, P.A., 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. Food hydrocolloids. **3**:1,65-75.
- Robert, M.L. y Loyola, V.M., 1985. **El Cultivo de Tejidos Vegetales en México**. CICY, México.
- Rojas, A.M., 1998. **Biosíntesis y acumulación de sapogeninas esteroidales en cultivos de células de *Dioscorea* spp.** Tesis de Maestría. CINVESTAV-Zacatenco. México D.F.
- Romo, V.A., 1985. **Productos naturales de la flora mexicana**. Limusa, México.
- Ruiz, O.M., Nieto, R.D. y Larios, R.I., 1950. **Tratado Elemental de Botánica**. Porrua. México.

- Rzedowski, J., 1979. **Flora Fanerogámica del Valle de México**. Vol. I. Edit. Continental. México.
- Rzedowski, J., 1981. **Vegetación de México**. Limusa, México.
- Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*. **3**:7-19.
- Salisbury, B. y Ross, W., 1994. **Fisiología Vegetal**. Grupo Editorial Iberoamérica, México.
- Sánchez, J.E., 1985. El cultivo de tejidos vegetales en la investigación básica. En: **El Cultivo de Tejidos Vegetales en México**. Robert, M.L. y Loyola, V.M. (Comp.). CICY-CONACYT. México.
- Santos-Díaz, M.S. y Ochoa, A., 1992. Cultivo de tejidos vegetales y variación somaclonal. *Téc. Cienc. Agrop.*, **1**(1): 1-13.
- S.F.F. 1980. **Vademecum Forestal Mexicano**. SARH. México.
- SIGMA, 1991, Cell Culture Catalogue.
- Signoret, P.J. 1970. Datos sobre algunas características ecológicas del mezquite (*Prosopis laevigata*) y su aprovechamiento en el valle del mezquite. En: **Mezquites y Huizaches**. Ed. IMRNR- AC. P. 73-146.
- Street, H.E., 1977. Introduction. In: **Plant Tissue and Cell Culture**. Street, H.E. (Ed.). Botanical Monographs. vol. II, 2nd edn., Blackwell Scientific Pub. Great Britain.
- Tabone, T.J., Felker, P., Bingham, R.L., Reyes, I. y Loughrey, S., 1986. Techniques in the Shoot Multiplication of the Leguminous Tree *Prosopis alba* Clone B₂ V₅₀. *Forest Ecology and Management*. **16**: 191-200.
- Torres, C.K., 1989. **Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops**. AVI. USA.
- Vidalie, H., 1986. **Cultivo in vitro**. Científica. México.
- Villanueva, D.J. 1983. **Distribución actual y características ecológicas del mezquite (*Prosopis laevigata* H. & B. Johnst), en el estado de San Luis Potosí**. Boletín Divulgativo no. 74. Segunda edición. SARH-INIFAP-Div. For. México.
- Vines R.A. 1960. **Trees shrubs and woody vines of the southwest**. The University of Texas. Press Austin. pp 515-516.

Whitehead, I.M. y Threfall, D.R., 1992. Production of phytoalexins by plant tissue cultures. *Journal of Biotechnology*. **26**: 63-81.

Weissbach A. and Weissbach H., 1988, **Methods for Plant Molecular Biology**, Academic Press.

Wickens, G.E., Gooding, J.R. y Field, D.V. (Eds.). 1985. **Plants for Arid Lands**. Proceedings of the Kew International Conference on Economic Plants for Arid Lands. Royal Botanic Garden, Kew, England.

Woods, A., 1985. The potential for the *in vitro* propagation of a number of economically important plants for arid areas. En: **Plants for Arid Lands**. Wickens, G.E., Gooding, J.R. and Field, D.V. (Eds.). Proceedings of the Kew International Conference on Economic Plants for Arid Lands. Royal Botanic Garden, Kew, England. pp.333-342.

Yashpal, G. y Arya, C.H., 1984. Tissue Culture of Desert Tress: I. Clonal Multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. *J. Plant Physiol.* **115**: 183-189.