



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

“Establecimiento de cultivos *in vitro* de
Magnolia grandiflora”

T E S I S

que presenta

DONAJÍ ARIADNA RAMÍREZ LÓPEZ

Matrícula: 207381441

para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

Director de Tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa

Jurado

Presidente: Dr. José Ramón Verde Calvo

Secretario: Dr. Juan Orozco Villafuerte

Vocal: Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Vocal: Dra. Leticia Buendía González

Iztapalapa, Ciudad de México, noviembre 2013

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el Número de registro 0471-O”

México D.F. a 15 de Marzo del 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Establecimiento de cultivos in vitro de Magnolia grandiflora

que presentó

Donají Ariadna Ramírez López

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dr. Juan Orozco Villafuerte

Asesor: Dra. Leticia Buendía González

Jurado:

Presidente: José Ramón Verde Calvo

Secretario: Juan Orozco Villafuerte

Vocal: Leticia Buendía González

Vocal: Ma. Elena Estrada Zúñiga

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Silvia y Ernesto, quienes han sido durante toda mi vida un ejemplo de rectitud, honestidad y cariño; y de quienes aprendí que los sueños e ideales se deben defender con entereza y valentía. A ustedes debo todo lo que soy.

Mi gratitud eterna para ustedes.

A mi hijo, Gabriel Ehécatl, porque desde que crecías dentro de mí, un rayito de luz ha iluminado hasta los momentos más oscuros de mis días.

Ahora comprendo que por tí, nada en el mundo es imposible.

Al Ing. Isaías Gil Vázquez y al Dr. Germán Gutiérrez, gracias por la amistad, la honestidad y los consejos. Sin ustedes yo podría haber seguido a la deriva.

Muchas gracias.

A Angel, porque siempre estuviste ahí cuando necesite un consejo, una palabra de aliento, un minuto de descanso, o un abrazo. Por toda la comprensión, ayuda, paciencia y amor...gracias infinitas, mi amor.

Gracias por ser el pilar de nuestra familia.

A mi hermano, que siempre será mi ejemplo a seguir...por tu sabiduría y cariño, gracias hermanito.

Con gratitud al Dr. Francisco Cruz Sosa, por permitirme la libertad de enfrentar un reto, a pesar de lo difícil que puede ser salir triunfante.

A usted y todos los integrantes de su equipo...gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
I. ANTECEDENTES.....	13
Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> en el género <i>Magnolia</i>	13
II. INTRODUCCIÓN.....	15
1. Botánica del género <i>Magnolia</i>	16
1.1 Clasificación botánica del género <i>Magnolia</i>	16
1.1.1 Botánica de las Magnolias perennes	17
1.1.2 Botánica de <i>Magnolia grandiflora</i>	17
2. Propagación del género <i>Magnolia</i>	19
2.1 Propagación por semillas	19
2.1.1 Propagación de <i>Magnolia grandiflora</i> a través de semillas.....	19
2.2 Propagación vegetativa	21
2.2.1 Cultivo de tejidos	22
2.2.1.1 Totipotencialidad	22
2.2.1.2 Organogénesis	23
2.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de especies leñosas	23
2.2.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de explantes del género <i>Magnolia</i>	24
2.2.2.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Magnolia grandiflora</i>	25

3. Importancia de <i>Magnolia grandiflora</i>	25
3.1 Usos etnomedicinales y propiedades farmacológicas de <i>Magnolia grandiflora</i>	26
3.2 Aplicaciones agrícolas de los compuestos presentes en <i>Magnolia grandiflora</i>	26
4. Metabolismo de nutrientes	27
4.1 Metabolitos secundarios	27
4.2 Metabolitos secundarios de <i>Magnolia grandiflora</i>	28
4.2.1 Sesquiterpenoides	28
4.2.2 Ruta Catabólica de los Terpenoides	29
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. OBJETIVOS	34
4.1 GENERAL	34
4.2 ESPECÍFICOS	34
V. HIPÓTESIS	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Materiales	36
6.1.1 Recolección del Material Vegetal	36
6.2 Métodos	36
6.2.1 Desinfestación del material vegetal	36
6.2.1.1 Modificaciones realizadas al protocolo de desinfestación de explantes de <i>M. grandiflora</i>	37
6.2.2 Pruebas de viabilidad de semillas con cloruro de tetrazolio	38
6.2.3 Siembra y germinación de semillas de <i>M. grandiflora</i>	38
6.2.4 Condiciones de cultivo de explantes de <i>M. grandiflora</i>	39
6.2.5 Obtención de explantes de <i>M. grandiflora</i>	39

6.2.6 Inducción de regeneración de explantes de <i>M. grandiflora</i>	40
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
7.1 Establecimiento de un protocolo de desinfestación de explantes de <i>M. grandiflora</i>	43
7.1.1 Semillas maduras	43
7.1.2 Explantes foliares y nodales.....	44
7.1.3. Conos y semillas inmaduros.....	46
7.2 Germinación y viabilidad de semillas de <i>M. grandiflora</i>	47
7.3 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> a partir de explantes foliares de <i>M. grandiflora</i> ..	49
7.4 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> a partir de explantes nodales de <i>M. grandiflora</i> .	52
7.5 Cultivo <i>in vitro</i> de semillas inmaduras de <i>M. grandiflora</i>	61
VIII. CONCLUSIONES.....	63
IX. PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFIA.....	66
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Estudios referentes a la propagación <i>in vitro</i> de especies del género <i>Magnolia</i>	14
Figura 1. Flores de <i>Magnolia soulangeana</i> , y <i>Magnolia sieboldii</i> .	16
Figura 2. Flor de <i>Magnolia grandiflora</i>	18
Figura 3. Fruto maduro de <i>M. grandiflora</i>	19
Tabla 2. Germinación de semillas de <i>M. grandiflora</i> .	21
Figura 4. Estructura química de dos metabolitos secundarios de <i>M. grandiflora</i> .	29
Figura 5. Isomerización del IPP.	31
Figura 6. Síntesis de moléculas de prenilpírofosfato.	32
Tabla 3. Tratamientos para la inducción de morfogénesis a partir de explantes foliares	41
Tabla 4. Tratamientos para la inducción de morfogénesis a partir de explantes nodales.	42
Figura 7. Frascos con explantes foliares sometidos a diferentes concentraciones de la solución de hipoclorito de sodio.	45
Figura 8. Frascos con explantes foliares presentando oxidación.	45
Figura 9. Frasco con semillas inmaduras de <i>M. grandiflora</i> .	47
Figura 10. Plántula de <i>M. grandiflora</i> obtenida por germinación <i>in vitro</i> de semillas maduras.	48
Figura 11. Semillas de <i>Magnolia grandiflora</i> en proceso de germinación	49
Figura 12. Explantes foliares sembrados en medio de cultivo adicionado con antioxidantes	50
Figura 13. Explantes foliares tras 15 d de siembra	51

Figura 14. Explantes foliares en medio de cultivo con BAP, 1 mg L ⁻¹ y 2,4-D, 5 mg L ⁻¹	52
Tabla 5. Respuesta de los explantes nodales a los diferentes tratamientos con concentraciones diferentes de reguladores de crecimiento vegetal.	53
Figura 15. Respuesta de los explantes nodales a los tratamientos	54
Figura 16. Explantes nodales sometido a los tratamientos a) Control, b) 1, c) 4, y d) 5	54
Figura 17. Respuesta de un explantes nodales sometidos a los tratamientos a) 2 y b) 3	55
Figura 18. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 6	55
Figura 19. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 7	55
Figura 20. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 8	56
Figura 21. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 9	56
Tabla 6. Tratamientos ad. para la inducción de morfogénesis a partir de explantes nodales	57
Tabla 7. Respuesta de los explantes nodales a los tratamientos 10 y 11 (Tabla 7).	57
Figura 22. Explantes nodales sometidos al tratamiento (1.0 mg L ⁻¹ BAP, 0.5 mg L ⁻¹ ANA)	58
Figura 23. Explante nodal sometido al tratamiento (1.0 mg L ⁻¹ BAP, 0.1 mg L ⁻¹ ANA)	58
Figura 24. Respuesta organogénica de explantes nodales sometidos al tratamiento (0.1 mg L ⁻¹ BAP, 1.0 mg L ⁻¹ ANA)	59
Figura 25. Tejido calloso proveniente de un explante nodal sometido al tratamiento (0.1 mg L ⁻¹ BAP, 1.0 mg L ⁻¹ ANA),	60

Figura 26. Brotación de yemas de un explante nodal sometido al tratamiento (1.0 mg L⁻¹ ANA) 60

1

BAP, 1.0 mg L⁻¹ ANA)

Tabla8. Tratamientos para la inducción en semillas inmaduras de *M. grandiflora* 61

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ANA:	Ácido naftalenacético
BAP:	Bencilaminopurina
CIN:	Cinetina
d:	Días
DMAPP:	Dimetilalilpirofosfato
IBA:	Ácido indolbutírico
IPP:	Isopentenil difosfato
m:	Metros
MS:	Mediude cultivo Murashige y Skoog
PVP:	Polivinilpirrolidona
TDZ:	Tidiazuron
WP:	Medio de cultivo para plantas leñosas (Woody Plant)

RESUMEN

Magnolia grandiflora, es un árbol perenne que se encuentra ampliamente distribuido desde el Sureste de Estados Unidos hasta el Sur de Venezuela. Esta especie ha sido utilizada con múltiples finalidades, desde su uso como árbol ornamental, hasta el aprovechamiento como recurso maderable y fuente de compuestos con propiedades farmacológicas, por lo que se ha convertido en una especie amenazada en algunos sitios de su hábitat natural. Es precisamente dada esta condición, que se planteó este trabajo como alternativa para la obtención de un mayor número de especímenes derivados del establecimiento de cultivos *in vitro*.

Para tales fines, se llevó a cabo la experimentación con diversos explantes de *M. grandiflora*, lo que permitió obtener un protocolo de desinfestación que se ajustó a las características morfológicas del explante y brindó bajos porcentajes de contaminación de los explantes sometidos a cultivo. Tras establecer el protocolo de desinfestación, se desarrollaron experimentos para identificar las condiciones para la inducción de la germinación de semillas, sin embargo, el proceso puede ser interrumpido por varios factores, aún cuando éste ha iniciado.

En el caso de los explantes foliares, estos presentaron una respuesta de inducción a tejido calloso moderada, ya que los tratamientos indujeron la formación de callo únicamente en los extremos de los explantes. Tales callos presentaron la desventaja de ser altamente susceptibles a la oxidación de los tejidos debido a la producción de compuestos fenólicos en las células, por lo que no fueron aptos para la resiembra y proliferación.

Por su parte los explantes nodales mostraron una respuesta favorable a los tratamientos de inducción, presentando la formación de tejido calloso de características adecuadas para la resiembra; además de la activación de las yemas presentes en los explantes y el consiguiente desarrollo de estructuras foliares.

ABSTRACT

Magnolia grandiflora is an evergreen tree that is widely distributed from the southeastern United States to southern Venezuela. This species has been used for many purposes, from its use as an ornamental tree, to the exploitation as timber yielding and source of compounds with pharmacological properties, so it has become an endangered species in some sites in their natural habitat. It is precisely because of this condition that this work has arisen as an alternative to obtain a larger number of specimens from the establishment of *in vitro* cultures.

With this aim, the experimentation was carried out using various explants of *M. grandiflora*, which allowed obtaining of a disinfection protocol that was adjusted to morphological characteristics of the explant, which provided low rates of contamination of the explants under cultivation. Subsequent to the establishment of the disinfection protocol, experiments were performed to identify the conditions for seed germination induction, however, as seen through the results, the process can be interrupted by several factors, even when it has already begin.

In the case of foliar explants, they presented callus growing moderate response, because the treatments induced the callus response only in the edges of the explants. Such callus showed the disadvantage of being highly susceptible to oxidation due to the production of phenolic compounds into the cells, so they were not suitable for replanting and proliferation.

On the part of nodal explants, they showed favourable response to the induction treatments, presenting callus tissue formation with suitable conditions for replanting; moreover, the activation of the buds in the explant, and the consequent development of the foliar structures.

I. ANTECEDENTES

El género *Magnolia* comprende cerca de 80 especies de árboles y arbustos distribuidos desde el Este de Norteamérica hasta el Sureste de Asia e inclusive en Europa donde fueron introducidas a fines del siglo XVII y principios del XVIII (Callaway, 1994; Martínez y Chacalo, 1994).

Las Magnolias se han clasificado por algunos botánicos, como una de las angiospermas más antiguas en la historia evolutiva, ya que se han encontrado evidencias fósiles que ubican al ancestro de las Magnolias actuales, nombrado *Archaeanthus* (primera flor), en la faz de la Tierra desde hace 100 millones de años (Callaway, 1994).

Dada la antigüedad y distribución de las Magnolias estas han sido utilizadas por el hombre con múltiples finalidades, desde su uso como árboles ornamentales en los templos budistas de China (650 A.C.) y Europa; la utilización de sus flores en el México prehispánico como adorno de uso exclusivo de los jefes aztecas, como madera para la construcción de utensilios, muebles y acabados habitacionales interiores en Japón y Norteamérica; hasta el aprovechamiento de sus flores y corteza para la preparación de tónicos de uso en la medicina tradicional china y mexicana (Callaway, 1994; Martínez y Chacalo, 1994).

Debido al extendido uso de las Magnolias como fuente de compuestos con propiedades farmacológicas y como árboles maderables, su presencia en su hábitat natural se ha visto disminuida. De hecho, muchas de las especies que constituyen este género, se encuentran actualmente clasificadas como especies en peligro de extinción a nivel internacional como en la FFI-Magnolia Red List (Cicuzza *et al.*, 2007), o bien como especies amenazadas a nivel nacional como en la NOM-059-ECOL-2001.

Antecedentes del cultivo in vitro en el género *Magnolia*

Existen muy pocos estudios científicos acerca de la propagación de especies pertenecientes al género *Magnolia*. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han enfocado a utilizar el cultivo de tejidos como base para la propagación *in vitro* de especies cuyos usos y componentes con propiedades farmacológicas se encuentran más difundidos.

Los principales artículos referentes a la propagación *in vitro* de especies del género *Magnolia* se resumen en la tabla 1, en la cual se enlista tanto la especie, como el explante y los reguladores de crecimiento vegetal utilizados para obtener una respuesta específica.

Cabe mencionar, que, a pesar de que en la tabla 1, no se presenta ningún estudio referente a la propagación o establecimiento de cultivos *in vitro* de *Magnolia grandiflora*, éstas publicaciones han servido como base para este trabajo, siendo referencias útiles para el establecimiento de cultivos *in vitro* de *M. grandiflora*, una especie que no ha sido estudiada en el ámbito de la propagación *in vitro*, pero de la cual se ha comprobado que posee compuestos de alto valor farmacológico e industrial.

Tabla 1. Estudios referentes a la propagación *in vitro* de especies del género *Magnolia*

Especie	Respuesta	Regulador de Crecimiento Vegetal	Explante	Cita bibliográfica
<i>M. dealbata</i>	Organogénesis directa Embriogénesis Somática.	BAP, 2,4-D	Embriones zigóticos	Mata-Rosas <i>et al.</i> , 2006.
<i>M. obovata</i>	Org. indirecta Emb. Somática	2,4-D, TDZ	Semillas inmaduras	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>M. soulangeana</i>	Enraizamiento (ex vitro)	IBA	Microestacas	Kamenicka, 1996.
<i>M. dealbata</i>	Org. Indirecta	2,4-D, Cin.	Hoja y tallo	Dominguez, 2008.
<i>M. soulangeana</i>	Org. Directa	BAP, ANA	Exp. Nodales	Kamenicka <i>et al.</i> , 1996.
<i>M. macrophylla</i>	Emb. Somática	2,4-D, BAP	Semillas inmaduras	Merkle <i>et al.</i> , 1993.

II. INTRODUCCIÓN

El género *Magnolia* comprende más de 80 especies de las cuales alrededor de 30, además de numerosas variedades e híbridos son cultivados hoy en día a nivel mundial.

El género fue nombrado por Carlos Lineo en 1737, en honor al botánico francés Pierre Magnol, es el más grande de la familia *Magnoliaceae* que contiene otros nueve géneros. Las especies pertenecientes a este género se clasifican en 3 tipos: 1) Magnolias de hoja perenne y flores grandes; 2) Magnolias caducas que florecen en verano y 3) Magnolias caducas que florecen antes de la formación de las hojas (Flores, 2006).

Dentro de la clasificación de “Magnolias de hoja perenne y flores grandes”, se encuentra *Magnolia grandiflora*, nativa del Sur de Estados Unidos y Norte de México. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida desde el Sureste de Estados Unidos hasta el Sur de Venezuela.

El vocablo grandiflora se refiere al tamaño de las flores (grand, grande; y flora, flor). Entre los nombres comunes de *M. grandiflora* se encuentran: “Southern Magnolia”, “Bull Bay”, “Great Laurel Magnolia”, “Magnolia gigante”, “Laurel tulipán”, “Anonilla” y “Palo de cacique” entre otros (Callaway, 1994; Flores, 2006).

Esta especie es de importancia debido a su valor dentro de la biodiversidad vegetal del país, ya que se encuentra clasificada como especie amenazada dentro del territorio mexicano de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001, la cual define como especies amenazadas a: “Aquellas especies, o poblaciones de las mismas, que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazos, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones”¹.

¹ Anónimo, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.

Además de la importancia ecológica de *M. grandiflora* es necesario mencionar que es una especie de importancia científica y ornamental, por los diversos compuestos naturales con propiedades farmacológicas que se han extraído de sus hojas y corteza; su amplio uso como árbol para reforestación en las ciudades dada su alta resistencia a los contaminantes atmosféricos así como por la belleza y aroma de sus flores (Callaway, 1994; Martínez y Chacalo, 1994).

1. Botánica del género *Magnolia*

Algunas de las características de las Magnolias son la presencia de floración en colores que pueden variar desde púrpura, rosa y amarillo hasta blanco; arbustos que pueden alcanzar alturas de 2.4 m y árboles de hasta 30 m de altura; frutos rojo o naranja brillante que contienen semillas con alto contenido de grasas (cerca del 40%) lo cual las hace altamente atractivas para los pájaros como fuente de energía. La mayor parte de las variedades de *Magnolia* poseen la capacidad de presentar flores de gran tamaño antes de la aparición de hojas nuevas en primavera (Callaway, 1994).



a)



b)

Figura 1. Flores de *Magnolia soulangeana*, a), y *Magnolia sieboldii*, b). (www.ubcbotanicalgarden.org)

1.1 Clasificación botánica del género *Magnolia*

REINO:	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE:	Magnoliopsida
ORDEN:	Magnoliales
FAMILIA:	Magnoliaceae
SUBFAMILIA:	Magnolioideae
GENERO:	<i>Magnolia</i>

1.1.1 Botánica de las Magnolias perennes

Las Magnolias de hojas perennes son árboles con ramas y hojas de glabras a densamente tomentosas, y estipula libre. Las flores son color crema y fragantes con 9-12 tépalos. El gineceo carece de tallo, y el número de cromosomas varía entre especies (Callaway, 1994).

1.1.2 Botánica de *Magnolia grandiflora*

Es un árbol de hojas perennes cuya máxima altura se encuentra entre los 25 y 30 m de altura. Posee una copa cónica o piramidal, tronco recto que puede llegar a medir hasta 1 m de diámetro y corteza de color café claro a gris. Las ramas y ápices son de color amarillo verdoso a café y con pubescencias, cambiando a café oscuro y glabras conforme avanza la edad del árbol. Las hojas ovaladas u oblanceoladas miden de 7 a 12 cm de largo por 3 a 9 cm de ancho. Peciolos de 1-5 cm de largo, color café y pubescentes. Estipulas libres, lanceoladas y de 1.5 a 3 cm de largo. Flores blancas solitarias y fragantes de 15 a 30 cm de diámetro (Martínez y Chacalo, 1994).



Figura 2. Flor de *Magnolia grandiflora*. (www.themagnolias.co.uk)

Posee frutos ovoides u oblongos, frecuentemente llamados “conos”, de 10-12 cm de largo y contenido aproximado de 30 semillas por fruto. Las semillas de *M. grandiflora* se encuentran protegidas por una estructura del fruto conocida como folículo, el cual contiene a la semilla durante su desarrollo hasta su madurez, etapa en que el folículo se abre para permitir la salida de la semilla madura. Las semillas, por su parte, están constituidas por 2 cubiertas y una membrana interna. La primer cubierta suave y carnosa está constituida por tres capas, y está compuesta aproximadamente en un 57% por aceites y una amplia cantidad de azúcares reductores; ésta cubierta flexible, se torna roja tras la maduración, y recibe el nombre de arilo.

La membrana interna es considerada como un remanente del nucelo. El nucelo es una capa membranosa café, de fácil plasmólisis con múltiples reactivos de uso común en pruebas microquímicas. Por otra parte, la segunda cubierta es una capa lignificada, formada por filas radiales de células con una gruesa pared. El embrión es muy pequeño, teniendo un tamaño de 1 mm de longitud por 0.4 mm de diámetro (Evans, 1930).



Figura 3. Fruto maduro de *M. grandiflora* en el que se pueden ver las semillas maduras saliendo de los folículos, justo antes de desprenderse del fruto. (www.floridata.com)

2. Propagación del género *Magnolia*

Las Magnolias son usualmente propagadas de dos formas: sexual, a partir de semillas, y asexualmente, a partir de tejido vegetativo.

2.1 Propagación por semillas

La propagación por semillas es el método más fácil de propagación en masa de la mayor parte de las plantas incluyendo a las Magnolias. Las semillas se colectan a finales del verano y principios del otoño; poseen una cubierta de 3 capas que les brinda una barrera impermeable que previene la absorción de agua y por tanto la germinación prematura de la semilla.

2.1.1 Propagación de *Magnolia grandiflora* a través de semillas

Es precisamente dada la protección que poseen las semillas de *M. grandiflora*, que éstas exhiben dormancia (latencia) de embriones, sin embargo, ésta puede ser sobrellevada a través de un tratamiento previo a la siembra en condiciones de vivero (Dirr y Heuser. 2006).

Existe evidencia que sugiere que muchas especies de *Magnolia* son inmaduras, es decir, morfológicamente dormantes, y requieren un periodo de post-maduración en el cual los embriones alcanzan un tamaño adecuado para la germinación (Le Page-Devigry, 1970). A pesar de que la mayor parte de las especies de *Magnolia* pueden ser propagadas a partir de semilla, las plantas obtenidas poseen floración tardía y difieren de la planta madre (Dirr y Heuser. 2006).

En el caso de *M. grandiflora*, es recomendado un proceso de estratificación por frío, el cual se debe llevar a cabo después de la maduración natural del cono que contiene a las semillas. Esta técnica se realiza con la finalidad de vencer la dormancia inherente a la semilla (Dirr y Heuser. 2006).

Cabe mencionar que los procedimientos reportados por Dirr y Heuser en 2006, son tratamientos para semillas en condiciones de siembra en vivero, por lo que el proceso de desinfección, siembra y condiciones de cultivo son diferentes de los requerimientos del cultivo *in vitro*, por lo que estas técnicas, podrían servir como base para el establecimiento de cultivos *in vitro*

Por otra parte, tras el proceso de siembra de las semillas para su germinación se presentan las limitantes de tiempo y porcentaje de germinación. En este ámbito, los resultados obtenidos por Dirr y Heuser (Ver anexos Tabla 1-1), demuestran que al sembrar las semillas de *M. grandiflora* en condiciones de vivero y aplicando diferentes técnicas se puede obtener un máximo de 76% de germinación en un tiempo de 125 d.

Tabla 2. Germinación de semillas de *M. grandiflora*. (Tomada y traducida de la original: Dirr M. y Heuser C. The Reference Manual of Woody Plant Propagation, ver ANEXOS)

Tratamiento	Porcentaje de germinación	Días a la germinación después de la fecha de remojo
Arilo intacto	29	125
Arilo removido	73	125 (2 semillas presentaron germinación después de 60 d)
Arilo intacto, remojo en agua por 24 h	21	125 (1 semilla presentó germinación después de 60 d)
Arilo removido, remojo en agua por 24 h	76	125
Arilo intacto, 3 meses de estratificación por frío	Ninguna	-
Arilo removido, 3 meses de estratificación por frío	Germinación general	35

Como ya se ha mencionado, las semillas de *M. grandiflora* presentan una serie de inconvenientes entre los cuales figuran, la dormancia e inmadurez de la semilla, adecuadas condiciones de cultivo, así como el largo tiempo necesario para la germinación y el bajo porcentaje de la misma. Es debido precisamente a las dificultades asociadas a esta estrategia, que la propagación a través de semilla, en condiciones de cultivo en vivero, no es la más ampliamente utilizada, ni se considera tan exitosa como las técnicas de propagación asexual o vegetativa.

2.2 Propagación vegetativa

La propagación vegetativa es más comúnmente usada en viveros de producción ya que se desea una descendencia uniforme, además de que las plantas producidas por el método vegetativo usualmente presentan floración en menor tiempo comparativamente con las producidas a través

de semilla. Las técnicas más comunes de propagación asexual utilizadas en *Magnolia* son: esquejes, aplicado a especies de las que se posee un esqueje joven previamente enraizado o de las cuales se poseen cortes jóvenes; e injerto que constituye la alternativa para las especies con problemas de enraizamiento o de transplante debido a la delicadeza de sus raíces (Dirr y Heuser., 2006) .

2.2.1 Cultivo de tejidos

Otro método de propagación vegetativo, es a través del cultivo de tejidos, que implica la formación de una nueva planta a partir de una parte de la planta completa, a lo que se denomina explante (Pérez Molphe Balch, *et al.* 1999). A través de este método se pueden obtener grandes cantidades de plantas con solo una parte de la planta madre. Sin embargo, así como con cualquier método de propagación, algunas especies y variedades son más difíciles de trabajar que otras.

Es precisamente a través del cultivo de tejidos, que la opción de obtener un gran número de plantas a partir de un explante se volvió una alternativa tangible; sin embargo, no es sino debido a la totipotencialidad de las células vegetales, que las diferentes técnicas de cultivo de tejidos han resultado exitosas.

2.2.1.1 Totipotencialidad

La totipotencialidad celular es, de acuerdo con Pierik, 1990: “La potencialidad de las células o tejidos para formar todo tipo de células y/o regenerar plantas”. De modo, que ésta peculiaridad de las células vegetales, permite la regeneración tanto órganos bien diferenciados, como células en un estadio no diferenciado, similar a las células meristemáticas, sin ser necesario que el explante de origen, sea del mismo tipo celular, o que se encuentre en el mismo estadio fisiológico.

La capacidad de regeneración de las células vegetales, es lo que permite que, al ser inducidas, nos brinden una respuesta asociada con la formación de nuevos órganos, éste fenómeno es conocido como organogénesis.

2.2.1.2 Organogénesis

El término organogénesis es utilizado en cultivo *in vitro* para referirse a la nueva formación de órganos vegetales a partir de tejidos o explantes completamente diferenciados, los cuales son sometidos a cultivo (Pérez Molphe Balch, *et al.* 1999)

La organogénesis *in vitro* puede llevar a la generación de órganos tales como: brotes adventicios o raíces, y puede ser clasificada en directa o indirecta de acuerdo con el proceso que se lleva a cabo para obtener estos órganos.

Se denomina organogénesis directa, cuando sucede en el explante original, es decir, que en el explante sometido a cultivo puede verse directamente la formación éstos órganos. La organogénesis indirecta, implica que antes de obtenerse los órganos se origina un callo o masa celular no diferenciada, y posteriormente a partir de ésta se generaran los órganos.

La respuesta de un explante *in vitro*, puede ser dirigida por medio de la adición de sustancias, como los reguladores de crecimiento vegetal, cuya función principal es estimular el crecimiento y división celular, para obtener una respuesta específica, la cual puede ir desde la formación de órganos en específico (organogénesis), o bien de tejido calloso (Pierik, 1990; Pérez Molphe Balch, *et al.* 1999).

2.2.2 Cultivo *in vitro* de especies leñosas

Como se ha mencionado previamente, el cultivo *in vitro* a partir de un explante, es una alternativa para la propagación o clonación de muchas especies vegetales, sin embargo, las

especies leñosas (llamadas así por su alto contenido en lignina), presentan una serie de inconvenientes comparativamente con la propagación de herbáceas, las cuales pueden ser determinantes en el exitoso establecimiento de los *cultivos in vitro* (Pierik, 1990). De acuerdo con Pierik, 1990, las diferencias más notables y que son motivo de la dificultad para clonar plantas leñosas son:

“1. Las especies leñosas tienen una capacidad regenerativa relativamente débil, si se comparan con las especies herbáceas...

... 3. La inducción del rejuvenecimiento es por lo general extremadamente difícil en las especies leñosas...

... 4. La velocidad de multiplicación es mucho más baja en las especies leñosas que en las herbáceas...

... 5. La dormancia juega un papel en el caso de árboles y arbustos, ya que las yemas pueden no abrirse y no tienen lugar el alargamiento de los tallos...

...7. Las especies leñosas son más propensas a ser afectadas por la excreción de sustancias tóxicas en los medios de cultivo...

...10. La variación genética en los árboles suele ser más grande que en los cultivos agrícolas, dando lugar a resultados variables...”

2.2.2.1 Cultivo *in vitro* de explantes del género *Magnolia*

Es precisamente debido a las diferencias antes mencionadas, que la propagación a través del cultivo *in vitro* de especies leñosas, como las pertenecientes al género *Magnolia*, ha resultado difícil; no sólo porque se ha observado que presentan un largo tiempo para la proliferación y

bajas tasas de multiplicación (Dirr y Heuser., 2006), sino por la gran cantidad de compuestos fenólicos que los tejidos excretan al medio de cultivo y que inhiben el crecimiento, además de la tendencia hacia la vitrificación del tejido en crecimiento y la saturación de agua en los brotes (Callaway, 1994).

2.2.2.1.1 Cultivo in vitro de *Magnolia grandiflora*

El cultivo de tejidos de *M. grandiflora*, presenta al igual que el resto de los miembros de su género, grandes limitantes con relación al tiempo y número de individuos que pueden ser obtenidos a través de esta técnica; esto aunado a la excreción de compuestos fenólicos que limitan la sobrevivencia de explantes, impiden la propagación exitosa de esta especie (Dirr y Heuser, 2006), y por lo tanto, han provocado que el cultivo *in vitro* de *M. grandiflora* no haya sido propiamente desarrollado.

Sin embargo, es debido a las recientes investigaciones, las cuales han permitido identificar los compuestos de alto valor farmacológico (Hong *et al.*, 2007; Abdelgaleil y Hashinaga, 2007; Schühly *et al.*, 2001) que pueden ser producidos de manera natural por esta especie, que resulta de gran importancia el establecimiento de protocolos y técnicas que permitan la exitosa proliferación de cultivos *in vitro* de *M. grandiflora*, los cuales constituirían una alternativa tanto para la investigación, como para el aislamiento e identificación de compuestos con potencial de uso en los ámbitos farmacológico y agrícola.

3. Importancia de *Magnolia grandiflora*

Como ya se ha mencionado previamente, dada la presencia del género *Magnolia* sobre la faz del planeta desde hace varios miles de años, muchas de las especies pertenecientes a éste género han sido utilizadas con muchas finalidades, éste es el caso de *M. grandiflora*, la cual ha sido utilizada para la elaboración de ungüentos e infusiones con propiedades medicinales, así como recurso maderable y árbol de ornato.

Sin embargo, dados los avances en la identificación de compuestos de interés producidos por especies vegetales, se ha comprobado que algunos de los compuestos producidos por *M. grandiflora*, pueden tener aplicaciones agrícolas en el control de plagas y hierbas que pueden afectar los cultivos (Hong *et al.*, 2007).

3.1 Usos etnomedicinales y propiedades farmacológicas de *Magnolia grandiflora*

Las infusiones y preparaciones a base de *M. grandiflora*, poseen un amplio rango de usos en la medicina tradicional no solo de México donde se utiliza como vermífuga, antirreumática y para el alivio de cólicos estomacales y dolor de pies (Flores, 2006); sino también en la medicina tradicional del pueblo Cherokee donde las infusiones de esta planta son utilizadas para el tratamiento de fiebre, diarrea, reumatismo y artritis (Schühly *et al.*, 2001).

Algunas de estas propiedades medicinales como el efecto anti-inflamatorio y anti-hiperalgésico de las infusiones, han sido comprobados a través de la investigación de los compuestos producidos por *M. grandiflora* y su posterior análisis en modelos como el de la inflamación a través de carragenina en ratas (Feltenstein *et al.*, 2004), entre otros.

3.2 Aplicaciones agrícolas de los compuestos presentes en *Magnolia grandiflora*

En lo que respecta a los usos industriales de *M. grandiflora*, la investigación desarrollada para identificar los compuestos producidos por la planta, llevaron al descubrimiento del efecto nematocida (Hong *et al.*, 2007) y el potencial alelopático de los extractos de *M. grandiflora* (Abdelgaleil y Hashinaga, 2007).

Estas propiedades medicinales, fueron más tarde atribuidos a los metabolitos secundarios producidos de manera natural por la planta y que cumplen funciones en la interacción planta-medio ambiente.

4. Metabolismo de nutrientes

El proceso de metabolización de nutrientes en una célula vegetal, constituye el proceso por el cual los compuestos son absorbidos y posteriormente degradados para la creación de moléculas básicas para el desarrollo de la célula, como son las proteínas, o bien, para cumplir otras funciones dentro de la célula o el organismo completo, como la defensa o las interacciones de la planta con su entorno (Buchanan *et al.*, 2000)

4.1 Metabolitos secundarios

El proceso de metabolización de los nutrientes por parte de la planta, involucra no solo la obtención de material para la síntesis de macromoléculas necesarias para el crecimiento y desarrollo de la planta. Existe una serie de rutas metabólicas dirigidas específicamente a la producción de compuestos cuya finalidad es la protección, la creación de condiciones más favorables para el crecimiento, la atracción de especies simbiotas, entre otros. (Buchanan *et al.*, 2000)

Estos compuestos son conocidos como metabolitos secundarios, ya que su síntesis en la planta no es constitutiva, sino que se encuentra sujeta al requerimiento de los mismos en ciertos tejidos, es decir, son producidos como respuesta a la detección de señales específicas que estimulan la producción del metabolito y cuya función varía desde compuestos para la defensa contra insectos o herbívoros depredadores, la protección contra compuestos producidos por otras especies vegetales parásitas, hasta los que funcionan como supresores del crecimiento de otras especies en la proximidad de la planta productora (Buchanan *et al.*, 2000).

Estos compuestos no son producidos por la totalidad de las especies, de modo que la variedad de estos compuestos es tan grande, como grande es la variedad de plantas existente. Muchos de estos compuestos se encuentran en mayores o menores cantidades dependiendo de la especie, la señal recibida por la planta, el tejido de la planta, el tiempo de respuesta de la especie, entre otras consideraciones.

La utilidad de estos compuestos radica no sólo en la facilidad que estos brindan para que la planta interactúe con su medio ambiente, sino en la utilidad práctica que puede dársele a estos compuestos, dada su naturaleza química y el efecto observado sobre otras especies vegetales o animales.

4.2 Metabolitos secundarios de *Magnolia grandiflora*

En *M. grandiflora* se han descrito una amplia gama de metabolitos secundarios como son: alcaloides, coumarinas, bifenilos, lignanos y terpenoides (Abdelgaleil y Hashinaga, 2007).

De estos metabolitos secundarios, algunos pueden funcionar como inhibidores y/o estimuladores de la germinación y crecimiento de otras plantas; como agentes nematocidas, o bien, como compuestos con actividad anti-inflamatoria, anti-fúngica, entre otros.

De los diferentes metabolitos secundarios identificados en *M. grandiflora*, los más notables, por su abundancia en la planta, son los sesquiterpenos, más específicamente el partenólido y costunólido.

4.2.1 Sesquiterpenoides

Los sesquiterpenos constituyen un grupo importante de metabolitos secundarios, ya que poseen un amplio rango de actividad biológica que incluyen como regulador del crecimiento, en la

protección contra insectos, antifúngico, antibacterial, antitubercular, antitumoral y con propiedades citotóxicas (Abdelgaleil y Hashinaga, 2007; Ganzera *et al.*, 2001).

Dentro de este grupo se encuentran las sesquiterpen-lactonas o germacranólidos. Múltiples sesquiterpenos y sesquiterpen-lactonas han sido aislados de diferentes partes de *Magnolia grandiflora* (Luo *et al.*, 2001). Los principales compuestos encontrados en ella son: partenólido, costunólido, eudesmanólido, magnolialido y la reynosina (Ganzera *et al.*, 2001).

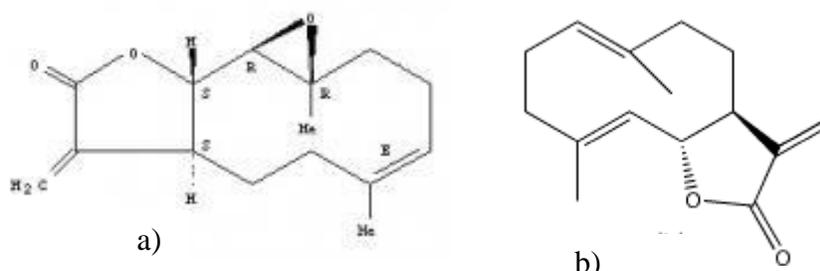


Figura 4. Estructura química de dos metabolitos secundarios de *M. grandiflora*, a) partenólido, y b) costunólido

4.2.2 Ruta Catabólica de los Terpenoides

De acuerdo a Buchanan *et al.*, 2000; la biosíntesis de todos los terpenoides, desde los más simples hasta los más complejos, puede dividirse en 4 etapas generales:

- 1) La síntesis del precursor fundamental Isopentenil Difosfato (IPP).
- 2) Adiciones repetitivas de IPP para formar una serie de homólogos del prenil difosfato, que sirven como precursores inmediatos de las diferentes clases de terpenoides.
- 3) La elaboración de prenil difosfatos alílicos por sintetasas terpenoides específicas para producir “esqueletos” terpenoidicos.
- 4) Modificaciones enzimáticas secundarias a los “esqueletos” a través de una larga serie de reacciones de oxido-reducción, para dar lugar a las propiedades funcionales y gran diversidad química de los terpenoides.

De acuerdo con este esquema básico para la síntesis de terpenoides en vegetales, se presenta en la figura 5, la serie de procesos bioquímicos que se llevan a cabo para la formación del precursor IPP. Considerando, que para tal finalidad se han descrito 2 rutas biosintéticas que pueden llevarse a cabo en diferentes tejidos especializados.

En el caso de los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos, es probable que la producción del IPP se lleve a cabo en el citosol o en los compartimientos del retículo endoplásmico; mientras que para los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos, el IPP es generado en el plastidio. Además, la formación del IPP varía en estos compartimientos, en el citosol y retículo endoplásmico, se lleva a cabo la ruta del acetato/mevalonato; mientras que la ruta alterna o del gliceraldehído fosfato/piruvato opera en el plastidio.

Cabe mencionar que la regulación de estas rutas resulta difícil, dado que el plastidio puede proveer IPP al citosol para el uso en la biosíntesis, y viceversa.

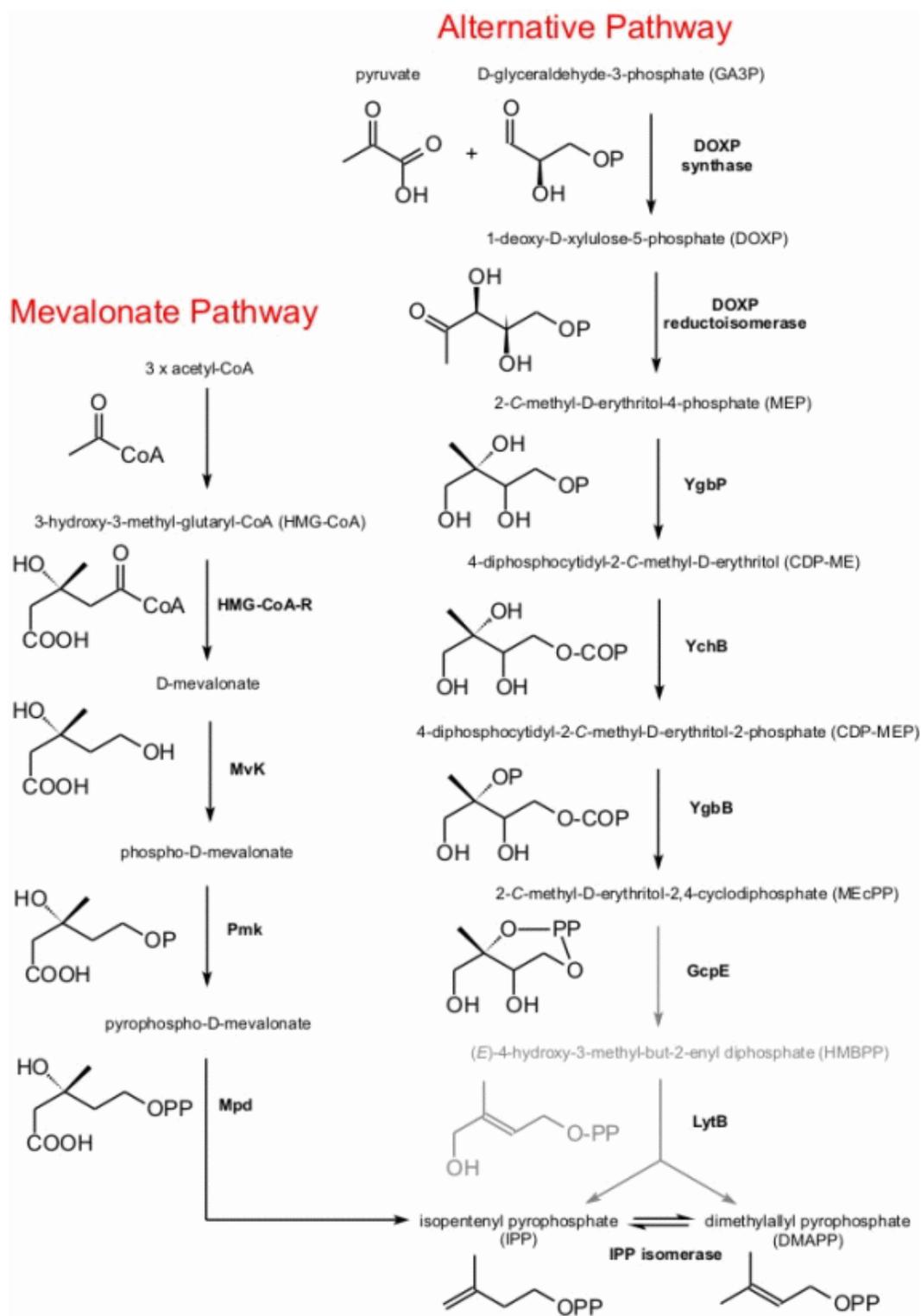


Figura 5. Isomerización del IPP a dimetilalilpirofosfato (DMAPP), adición repetitiva de IPP y DMAPP. (Fuente: www.ugr.es/~quiored/pnatu/fig/formaisopentenil.gif).

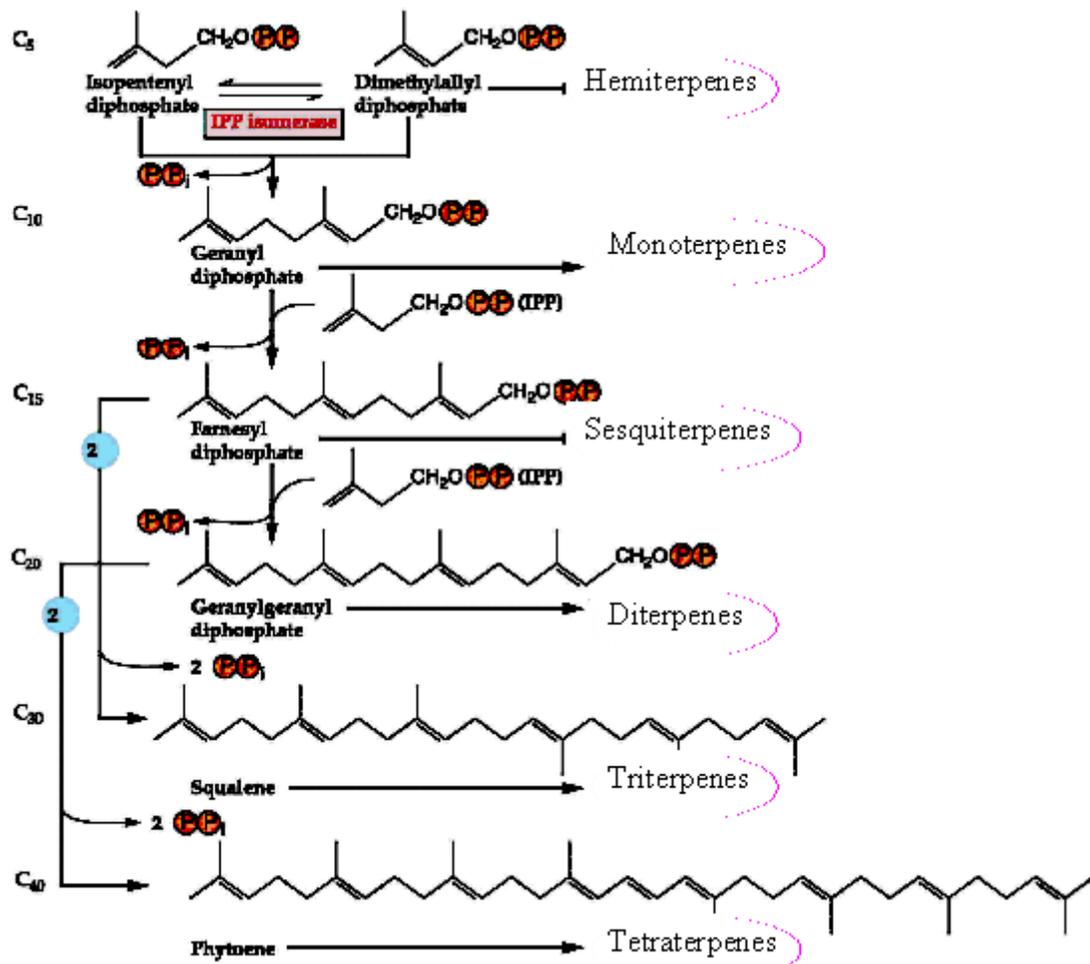


Figura 6. Síntesis de moléculas de prenilpirofosfato. (Tomada de Buchanan *et al.*, 2000)

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la clasificación de *Magnolia grandiflora* como especie amenazada (NOM-059-ECOL-2001), se plantea el cultivo de tejidos como método para la obtención de un mayor número de plantas que nos permitan vencer al máximo la limitante de tiempo de crecimiento y desarrollo de la planta, y con ello tener más especímenes que pueden ser utilizados tanto en investigación como en la reforestación de parques y jardines metropolitanos, así como contribuir en la protección de la especie.

Además, es importante establecer parámetros para el cultivo *in vitro* de *M. grandiflora*, como base para estudios posteriores enfocados al aprovechamiento de los compuestos sesquiterpénicos producidos por la planta, dada la importancia de sus propiedades farmacológicas y sus aplicaciones agrícolas.

IV. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

1. Establecer las condiciones de cultivo e inducción para cultivos *in vitro* primarios de *M. grandiflora*.

4.2 ESPECÍFICOS

1. Establecer un protocolo de desinfestación de explantes (nodales, foliares y semillas) de *M. grandiflora*.
2. Identificar las condiciones necesarias para la germinación *in vitro* de semillas de *M. grandiflora*.
3. Evaluar el efecto del medio de cultivo sobre la inducción de explantes de *M. grandiflora*.
4. Evaluar el efecto de la adición de BAP, 2,4-D y ANA en la inducción de explantes de *M. grandiflora*.
5. Evaluar la respuesta de acuerdo al tipo de explante sometido a cultivo *in vitro* de *M. grandiflora*.

V. HIPÓTESIS

El establecimiento de cultivos *in vitro* de *M. grandiflora*, será posible si se implanta una metodología que incluya, tanto el desarrollo de un protocolo de desinfestación, así como la identificación de las condiciones necesarias para la regeneración de la planta en condiciones *in vitro*; con la finalidad de colaborar en la protección y el estudio de *M. grandiflora*, a través de la propagación de la especie por técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Recolección del Material Vegetal

Las semillas de *Magnolia grandiflora* fueron recolectadas en noviembre de 2007 y 2008, del ejemplar identificado, perteneciente a la colección del Museo de Agricultura en el Departamento de Agronomía, de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

Los especímenes de *M. grandiflora*, a partir de los cuales se obtuvieron los explantes foliares y nodales, fueron adquiridos en el Mercado de Flores y Plantas de Cuemanco, ubicado en la Delegación Tlalpan de la Ciudad de México.

6.2 Métodos

6.2.1 Desinfestación del material vegetal

La desinfestación del material vegetal se realizó utilizando como base los protocolos descritos para otras especies como *M. dealbata* y *M. obovata* (Mata-Rosas *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007), a partir de los cuales, se desarrolló un protocolo diseñado específicamente para *M. grandiflora*.

Pasos generales para la desinfestación de explantes de *M. grandiflora*

1. Lavado con solución jabonosa (detergente comercial) por 15 min.
2. Enjuague con agua corriente.
3. Lavado con solución de etanol 70% por 1-5 min.
4. Lavado con solución de hipoclorito de sodio (6% de cloro libre) por 30 min.

5. Lavado con solución fungicida (fungicida comercial Bravo 720) por 30-120 min.
6. Tres a cuatro enjuagues con agua destilada estéril en condiciones de asepsia en campana de flujo laminar.

6.2.1.1 Modificaciones realizadas al protocolo de desinfestación de explantes de *M. grandiflora*

Las modificaciones al protocolo de desinfestación para *M. grandiflora*, se describen a continuación de forma específica para cada tipo de explante, dependiendo de sus características y a la necesidad de etapas secundarias para la adecuada desinfestación.

a) Para semillas maduras:

- 4a. Remoción mecánica de la cubierta suave o arilo.

b) Para conos inmaduros:

- 5a. Aplicación de etanol 100% y “flameo” en campana de flujo laminar.

c) Para explantes nodales y foliares:

5. Lavado con solución fungicida (fungicida comercial TECTO 60) por 60 minutos.
7. Enjuague con solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico (5ml L^{-1}).
8. Siembra en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), o WP (Woody Plant), conteniendo ácido cítrico (100 mg L^{-1}), ácido ascórbico (150 mg L^{-1}) y polivinilpirrolidona (PVP) (500 mg L^{-1}), como agentes antioxidantes.

Dentro de las modificaciones realizadas al protocolo de desinfestación de explantes foliares y nodales, se cambió el fungicida comercial que sirve como base para la solución de lavado, del fungicida Bravo 720 (tetracloroisofalónitrilo 72%), al fungicida Tecto 60 (tiabendazol 60%). Así como la concentración de la solución fungicida, a base del fungicida Tecto 60, de 1.5 g/L a

4 g/L. Además se modificó el tiempo de exposición a la solución, aumentando el tiempo de 15 a 30 min.

6.2.2 Pruebas de viabilidad de semillas con cloruro de tetrazolio

Para determinar la viabilidad de las semillas utilizadas para los experimentos de germinación, se procedió a la tinción de los embriones a través del contacto con una solución de cloruro de tetrazolio al 4 %, durante 15-30 min. Las muestras consistieron en 20 semillas seleccionadas al azar de tres lotes diferentes: semillas estratificadas sin siembra previa, semillas estratificadas con previa siembra y semillas frescas.

Para la evaluación de la viabilidad de las semillas, se emplea la sal de tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5, - trifenil-tetrazolio) basándose en el principio bioquímico de la reducción de la sal por efecto de la actividad de las enzimas deshidrogenasas del ácido málico, dónde los iones de H liberados de la actividad respiratoria mitocondrial son transferidos a la sal de tetrazolio. Lo que permitió identificar la viabilidad de las semillas a través de la formación de un compuesto rojo conocido como formazán (trifenilformazán) apreciable en tejidos viables a diferencia de los tejidos no viables que no reaccionan con la solución conservando su color natural.

6.2.3 Siembra y germinación de semillas de *M. grandiflora*

La germinación de las semillas, previa desinfestación, se realizó utilizando como sustrato un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) al 50% adicionado con 10 g/L de sacarosa y sin reguladores de crecimiento vegetal. La siembra se realizó en grupos de 3 o 4 semillas (dependiendo del lote de experimentación) por frasco con medio de cultivo estéril.

El procedimiento se llevó a cabo en condiciones de asepsia en campana de flujo laminar.

6.2.4 Condiciones de cultivo de explantes de *M. grandiflora*

Las condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad lumínica fueron ajustadas para *M. grandiflora*, basándose en protocolos de *M. dealbata* (Mata-Rosas *et al.*, 2006), *M. soulangeana* (Kamenicka *et al.*, 1996), y otras especies cultivadas fuera del laboratorio (Dirr y Heuser., 2006); donde se recomienda una temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, con una intensidad lumínica entre $35-50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Con la finalidad de determinar las condiciones de fotoperiodo adecuadas para la germinación, la mitad del segundo lote de experimentación fue sometido a condiciones de fotoperiodo con lámparas de luz fluorescente, tal y como se experimentó para *M. dealbata* (Mata-Rosas *et al.*, 2006), mientras que el resto fueron sometidas a condiciones de oscuridad. Ambos experimentos se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2 °C, temperatura comúnmente utilizada para el cultivo de tejidos vegetales.

Para los explantes foliares y nodales, se utilizaron condiciones de fotoperiodo de 16 h, intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y temperatura similar a la manejada para la germinación de las semillas maduras.

6.2.5 Obtención de explantes de *M. grandiflora*

Los explantes de *M. grandiflora* (nodales, foliares, semillas) requeridos para el inicio de los cultivos se obtuvieron a partir de los especímenes adquiridos y el material recolectado en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

En el caso de las semillas, se procedió a la separación de la semilla del folículo abierto, previa maduración del fruto que las contiene. Para la separación del arilo, se procedió a remojar durante 24 h las semillas, para promover la ruptura del arilo, y la liberación y rehidratación parcial de la semilla.

Para la obtención de explantes nodales se procedió a la selección de brotes de los especímenes de *M. grandiflora*, tomando en cuenta el diámetro de la rama, ya que, se debe hacer uso de ramas que no sobrepasen 1 cm de diámetro, de otra forma el proceso de segmentación para la separación de los nudos, durante la siembra en condiciones de asepsia, resulta demasiado complicado debido al tallo leñoso de la planta. Además debe considerarse el estado fisiológico de la yema, de modo que la medición de la respuesta observada *in vitro* no se vea influenciada por la diferencia en el desarrollo de la yema.

En el caso de los explantes foliares, se procedió a seleccionar hojas considerando la edad e integridad de las mismas, a fin de utilizar únicamente hojas no dañadas por enfermedades o insectos, y en etapa juvenil para obtener una respuesta adecuada por parte del explante. Tras la selección y desinfestación de las hojas, se procedió al corte, eliminando tejidos con evidencia de daños por efecto de las soluciones de hipoclorito o etanol, o bien por daño mecánico ejercido por la agitación del protocolo de desinfestación. Tras la eliminación de tejido dañado se procedió a cortar las hojas en explantes de aproximadamente 1 cm², retirando la nervadura principal y los bordes de la hoja.

Debido a que durante la recolección de material vegetal para los experimentos, se lograron recolectar conos inmaduros conteniendo semillas en el mismo estadio fisiológico de inmadurez, se procedió a la desinfestación de los conos inmaduros; tras lo cual se abrieron cada uno de los folículos del fruto, haciendo uso de pinzas y bisturí, para tener acceso a la semilla en estado inmaduro, a la que posteriormente se le retiró la cubierta suave o arilo, antes de colocarla en medio de cultivo estéril.

6.2.6 Inducción de regeneración de explantes de *M. grandiflora*

La respuesta morfogénica en los explantes de *M. grandiflora*, fue dirigida a través de la variación de concentración y tipo de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), tomando como

base protocolos de inducción de organogénesis para especies como *M. dealbata*, *M. soulangeana* y *M. obovata*. ((Mata-Rosas *et al.*, 2006; Kamenicka *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2007)

Para inducir la respuesta de los explantes foliares y nodales de *M. grandiflora*, se utilizaron como base los medios MS y WP al 100%, adicionados con sacarosa 30 g/L, y diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA) como reguladores de crecimiento vegetal. En las tablas 3 y 4, se detallan los tratamientos utilizados durante los experimentos con explantes foliares y nodales, respectivamente.

Tabla 3. Tratamientos para la inducción de morfogénesis a partir de explantes foliares.

TRATAMIENTO	BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)
1	0	0
2	0	0.5
3	0	1.0
4	0	3.0
5	0.1	0
6	0.1	0.5
7	0.1	1.0
8	0.1	3.0
9	0.5	0
10	0.5	0.5
11	0.5	1.0
12	0.5	3.0
13	1.0	0
14	1.0	0.5
15	1.0	1.0
16	1.0	3.0

Tabla 4. Tratamientos para la inducción de morfogénesis a partir de explantes nodales.

TRATAMIENTO	BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)
Control	0	0
1	0.1	0.1
2	0.1	0.5
3	0.1	1.0
4	0.5	0.1
5	0.5	0.5
6	0.5	1.0
7	1.0	0.1
8	1.0	0.5
9	1.0	1.0

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Establecimiento de un protocolo de desinfestación de explantes de *M. grandiflora*.

Como se ha mencionado previamente, se estableció un protocolo base para la desinfestación de explantes de *M. grandiflora*, sin embargo, éste fue modificado para adaptarse a las diferentes características y condiciones del tejido o explante utilizado, y a los requerimientos de asepsia necesarios para el cultivo *in vitro*.

7.1.1 Semillas maduras

El primer experimento de desinfestación de semillas maduras presentó un 100% de contaminación por hongos y bacterias. Por lo que se procedió a la modificación del protocolo inicial de desinfestación de semillas, adicionando el lavado de las semillas con solución fungicida Bravo 720 por un periodo de 120 min, y la remoción del arilo, con lo que se disminuyó el porcentaje general de contaminación de las semillas de un 100% a un 30%, del primer al segundo lote de experimentación.

Con respecto al 30% de contaminación observada en los frascos con semillas maduras, ésta, no está aparentemente ligada a hongos, por lo que puede decirse que la contaminación de los explantes debida a hongos disminuyó de un 100 a 0%. Por su parte, la contaminación debida a bacterias se ha mantenido constante durante los ensayos de cultivo, de modo que, el porcentaje total de la contaminación observada en los frascos del experimento es debida a bacterias. De modo que, tras las modificaciones al protocolo inicial de desinfestación, se observó una disminución del porcentaje de contaminación debida a bacteria del 100% al 30%.

Es precisamente debido a la contaminación constante por las bacterias en los cultivos, por lo que se decidió realizar un análisis de la cepa. Para lo cual se solicitó la colaboración de la QBP. Martha Morales Martínez de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-IPN), para la realización de las pruebas bioquímicas, morfológicas y de sensibilidad a antibióticos que permitan la identificación de la(s) bacteria(s) contaminantes, con lo cual se podrá plantear un adecuado tratamiento que permita la eliminación de la contaminación en los cultivos *in vitro* de *M. grandiflora*.

Tras los análisis preliminares se llegó a la conclusión de que se trata de un bacilo Gram negativo que suele agruparse en cadenas, perteneciente probablemente al género *Pseudomonas* o *Xanthomonas*.

Se planeó realizar la siembra de otros lotes de semillas maduras, realizando modificaciones al protocolo de desinfestación, de modo que, se adicionaran lavados con una solución de antibióticos estéril, usando como base los datos de sensibilidad a antibióticos observados durante el proceso de identificación de los microorganismos. Sin embargo, no pudo llevarse a cabo, ya que las semillas cosechadas durante el proceso de obtención de explantes (conos maduros), no resultaron suficientes para llevar a cabo los estudios. Además, debido a los ciclos estacionales de la planta, no se pudo obtener semillas en otra temporada del año, por lo que, los recursos biológicos limitados, no permitieron llevar a cabo la siembra de otros lotes de semillas que permitieran obtener más datos acerca de la disminución de la contaminación debida a bacterias en este tipo de explantes.

7.1.2 Explantes foliares y nodales

Para el caso de la desinfestación de explantes foliares de *M. grandiflora*, los primeros experimentos realizados para determinar la efectividad del protocolo de desinfestación, arrojaron resultados negativos, siendo que presentaron un 100 % de contaminación de los

explantes sometidos a las pruebas. Debido a esto, se procedió a realizar pruebas que permitieran disminuir la contaminación de los explantes sometidos a cultivo.

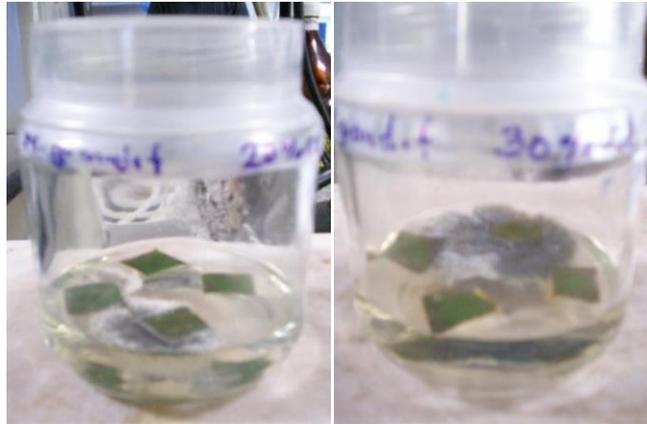


Figura 7. Frascos con explantes foliares sometidos a diferentes concentraciones de la solución de hipoclorito de sodio, y en los cuales se observa contaminación debida a hongos.

Tras las modificaciones realizadas al protocolo de desinfección, se observó que en los experimentos siguientes, el porcentaje de contaminación disminuyó en poco más del 50% para el caso de explantes foliares, sin embargo, se detectó que el principal problema que impide el mantenimiento de los explantes en condiciones adecuadas para la respuesta organogénica, es la oxidación de los explantes, debida probablemente a la gran cantidad de compuestos fenólicos que éstos mismos excretan hacia el medio de cultivo (Callaway, 1994).

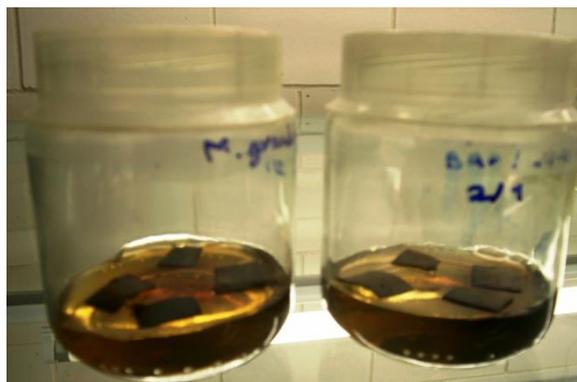


Figura 8. Frascos con explantes foliares presentando oxidación debida a la formación de compuestos fenólicos en el tejido.

En el caso de los explantes nodales, éstos fueron sometidos a un protocolo de desinfestación base al cual se le modificaron los mismos parámetros modificados para explantes foliares, pero en el caso del tiempo de exposición a la solución fungicida, se realizó por un periodo de 60 min, lo que permitió disminuir la contaminación de un 100% a un 25%.

Cabe mencionar, que el protocolo de desinfestación fue aplicado a los explantes nodales una vez que se habían realizado las modificaciones al protocolo de desinfestación para explantes foliares, de modo que la experimentación previa, permitió corregir parámetros de importancia que permitieron que el porcentaje de contaminación, en el caso de explantes nodales sea más bajo que los porcentajes previamente descritos para explantes foliares.

Los resultados obtenidos con el establecimiento de un protocolo de desinfestación aplicable a diferentes explantes de *M. grandiflora* contribuyen a resolver la problemática de la dificultad para desinfestar tejidos provenientes de especies del género *Magnolia*, previo a su colocación en un medio de cultivo estéril, tal y como lo reporta Tubesing (1998). Lo que incluso permitió eliminar la contaminación de las semillas maduras como causal principal de la inhibición de la germinación (Evans, 1930).

7.1.3. Conos y semillas inmaduros

Como se ha mencionado previamente, dada la oportunidad de trabajar con conos inmaduros como fuente de explantes para el cultivo *in vitro*, se ajustó el protocolo de desinfestación básico, tras lo cual se obtuvo una alta efectividad, reflejada en la nula contaminación de los explantes (semillas inmaduras) sometidos a la experimentación, sin embargo, fue notable que durante el proceso, quedaron sobre la semilla, una gran cantidad de remanentes de la cubierta suave (arilo), lo que generó una alta tasa de oxidación no sólo del tejido adherido a la semilla, sino del propio endospermo de la semilla.

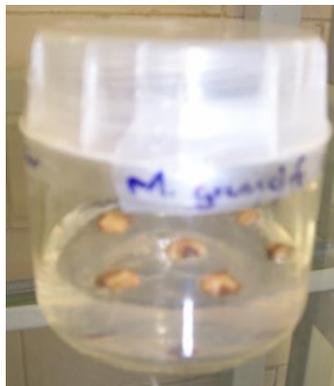


Figura 9. Frasco con semillas inmaduras de *M. grandiflora*, en el cual se observa la oxidación del tejido remanente.

7.2 Germinación y viabilidad de semillas de *M. grandiflora*

Utilizando como base las experiencias, descritas por Dirr y Heuser, con especies del género *Magnolia*, se aplicó un proceso de estratificación por frío entre 4-6°C, para vencer la dormancia inherente a las semillas de *M. grandiflora*. (Dirr y Heuser, 2006).

Debido a la nula respuesta de las semillas tras 45 d de la siembra, se procedió a realizar pruebas de viabilidad a las semillas, con una solución de cloruro de tetrazolio al 4%; con la finalidad de determinar si el proceso de estratificación no afectaba la viabilidad de la semilla. Para lo cual se desarrollaron pruebas a muestras de los lotes de semillas estratificadas y frescas.

El 100% de las semillas estratificadas sometidas a la prueba de viabilidad presentaron nula coloración de los tejidos, aún incluso después de 30 min. Mientras que las semillas frescas, presentaron tinción incluso desde los primeros minutos del contacto con la solución, resultado que se mantuvo constante a los 15 y 30 min después del inicio de la prueba. Esta incapacidad de los embriones para teñirse por efecto del cloruro de tetrazolio, podría estar asociada a la desecación de la semilla, o bien a otros mecanismos que convendría continuar analizando en investigaciones futuras.

Fue debido a la respuesta al cloruro de tetrazolio, observada en las semillas frescas, por lo que fueron escogidas para realizar las pruebas de germinación, de modo que tras la desinfección, se colocaron en frascos con medio MS estéril para la germinación. Tras la siembra se procedió a la división de la mitad del lote de experimentación para la prueba de las condiciones de luz u oscuridad necesarias para la germinación de las semillas.

A 35 d de la siembra, no se observó el desarrollo de plántulas, sin embargo, se observó que la cubierta lignificada o testa se había roto debido a la salida de tejido en crecimiento. Este fenómeno se ha observado en ambos experimentos, luz y oscuridad, aunque se observa en mayor cantidad en los frascos sometidos a oscuridad (2:1). Después de 60 d de la siembra, los frascos con semillas sometidos a dos regímenes diferentes de iluminación para la germinación, se cambiaron a condiciones de fotoperiodo, dado a que se comenzó a observar mayor desarrollo por parte de las semillas colocadas previamente bajo esta condición.

Tras 97 d después de la siembra, se observó la salida de la radícula de una semilla, la cual presentó germinación total a los 110 d de la siembra.



Figura 10. Plántula de *M. grandiflora* obtenida por germinación *in vitro* de semillas maduras. Puede verse que la testa no puede ser eliminada por la propia plántula, por lo que es necesario removerla mecánicamente para evitar problemas en el desarrollo de la planta.

A 155 d de la siembra se observó un 38.23% de semillas en proceso de germinación, evidenciado por la salida de la radícula, o bien por el rompimiento de testa y expansión del tejido interno de la semilla.

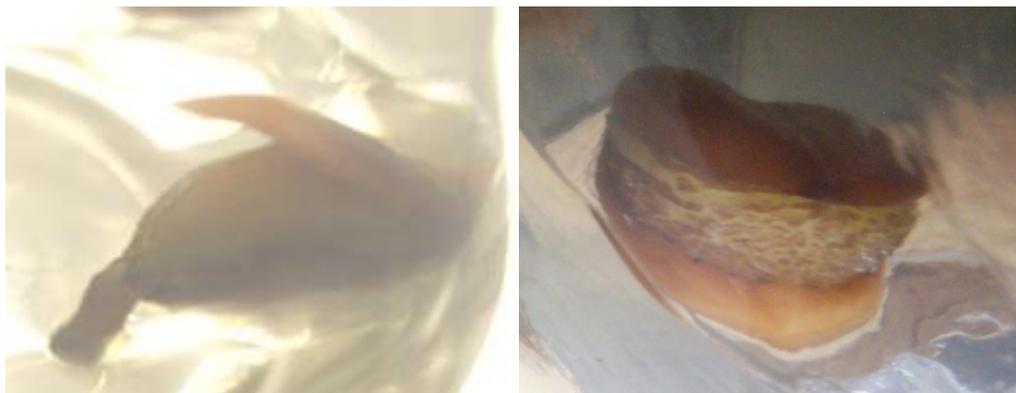


Figura 11. Semillas de *Magnolia grandiflora* en proceso de germinación.

Al finalizar el tiempo determinado para la experimentación, no se presentó la germinación de otras semillas de *M. grandiflora*, esto puede ser atribuido a la oxidación del endospermo que quedó al descubierto tras la ruptura de la testa, e incluso pudo deberse a la latencia mecánica asociada a la semilla, de modo que la dureza de la testa aprisiona los cotiledones impidiendo la germinación, tal y como lo reportan Saldaña, *et al.* (2001), para *M. iltisiana*.

7.3 Establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de explantes foliares de *M. grandiflora*

Una vez que los explantes foliares se sometieron al protocolo de desinfección, se procedió a la siembra en medio de cultivo MS, adicionado con BAP y 2,4-D a diferentes concentraciones previamente mencionadas (Tabla 3).

Durante los primeros experimentos, los explantes foliares presentaron un alto porcentaje de contaminación, de modo que resultó difícil analizar el efecto del medio de cultivo sobre los

mismos, sin embargo, tras las modificaciones realizadas al protocolo de desinfestación, se logró disminuir la contaminación al 50%.

Esta disminución en el porcentaje de contaminación, permitió observar el efecto de los compuestos fenólicos liberados por el explante hacia el medio de cultivo, los cuales llevan a la oxidación del explante y por tanto a la muerte del tejido lo que impide observar si existe efecto del uso de los reguladores de crecimiento vegetal sobre la respuesta del explante (Callaway, 1994; Pérez Molphe Balch, *et al.* 1999).

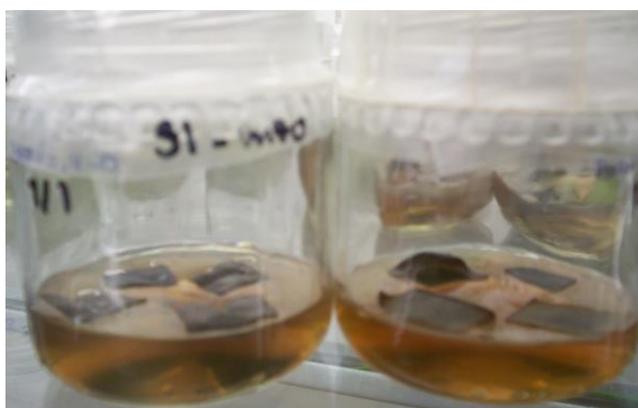


Figura 12. Explantes foliares sembrados en medio de cultivo adicionado con antioxidantes.

Para contrarrestar el efecto de los compuestos fenólicos sobre el medio de cultivo y los explantes, se procedió a adicionar ácido cítrico (100 mg L^{-1}), ácido ascórbico (150 mg L^{-1}) y polivinilpirrolidona (PVP) (500 mg L^{-1}) como agentes antioxidantes. En experimentos más recientes se observó que, tras 15 d de cultivo, que la combinación de estos agentes en el medio de cultivo no ha modificado el efecto de los compuestos fenólicos sobre la oxidación de los tejidos (Figura 12).

El último experimento que se realizó utilizando explantes foliares procedentes de hojas jóvenes de *M. grandiflora* (7- 14 d de edad aproximadamente) para la inducción de la respuesta morfogénica, presentó nula contaminación de los explantes foliares, así como una oxidación baja de los tejidos.

A 15 d de la siembra se observó que los explantes comenzaron a plegarse sobre sí mismos, presentaron ligera oxidación, sin contaminación y se observó crecimiento de algunas células sobre el explante (callo).



Figura 13. Explantes foliares tras 15 d de siembra, se observa el plegamiento sobre sí mismos y ligera oxidación.

Después de más de 45 d de cultivo, y pese a que hubo plegamiento como primera señal de respuesta al tratamiento, no se presentó respuesta, por lo que se procedió a la experimentación con una nueva serie de combinaciones basadas en concentraciones diferentes de los reguladores de crecimiento vegetal, las cuales pudieran favorecer la respuesta de los explantes; una vez que éstos provienen de hojas jóvenes que pueden estar produciendo menores cantidades de compuestos fenólicos; los cuales son responsables de la alteración a la integridad del explante a través de la oxidación. De modo que al reducir la oxidación de los tejidos y la contaminación, se aumenta la probabilidad de que los explantes se encuentren en condiciones adecuadas para responder al estímulo a través de los reguladores de crecimiento

Los tratamientos probados en los experimentos con explantes foliares desarrollados posteriormente, consistieron en la combinación de BAP en concentraciones de 0, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹, y 2,4-D en concentraciones de 0, 1, 3 y 5 mg L⁻¹. A pesar de las modificaciones a los tratamientos, de los experimentos desarrollados, únicamente los tratamientos de (1 mg L⁻¹ de

BAP y 5 mg L^{-1} de 2,4-D) y (0 mg L^{-1} de BAP y 1 mg L^{-1} de 2,4-D) presentaron un efecto sobre los explantes sometidos, induciendo la formación de callos en los mismos.

Sin embargo, pese a la respuesta favorable de ambos tratamientos, y aún cuando se presentó la formación de callo, éste sólo se observó en las puntas de los explantes y no pudieron ser proliferados debido a que tras la separación del explante foliar oxidado, y la posterior siembra de los callos en medio de cultivo nuevo, éstos fueron objeto de oxidación, debida normalmente a compuestos fenólicos, los cuales fueron liberados al medio de cultivo y que afectaron la integridad y viabilidad del callo (Figura 14).



Figura 14. Explantes foliares en medio de cultivo con BAP, 1 mg L^{-1} y 2,4-D, 5 mg L^{-1} .

7.4 Establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de explantes nodales de *M. grandiflora*

Una vez concluido el proceso de desinfestación de los explantes nodales, se procedió a la siembra de los mismos en medio de cultivo WP suplementado con BAP y ANA. Los explantes fueron colocados en los diferentes tratamientos (Tabla 4), procurando mantener la polaridad del explante para evitar que la respuesta fuera inhibida por la incorrecta colocación del explante sobre el medio de cultivo.

La respuesta de los explantes nodales, varió dependiendo de las concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal, a las cuales fueron sometidos los mismos. En la tabla 6, se detallan los resultados obtenidos a 30 días de la siembra.

Tabla 5. Respuesta de los explantes nodales a los diferentes tratamientos con concentraciones diferentes de reguladores de crecimiento vegetal.

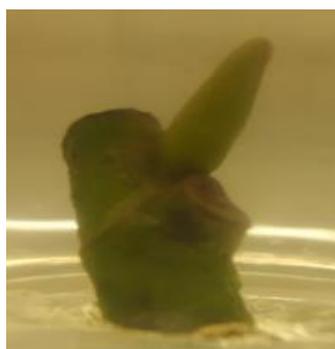
Tratamiento (BAP mg L ⁻¹ , ANA mg L ⁻¹)	Respuesta
Control (0, 0)	Nula.
1 (0.1, 0.1)	Nula.
2 (0.1, 0.5)	Ruptura de la estructura de protección y ligero crecimiento de la yema.
3 (0.1, 1.0)	Ruptura de la estructura de protección y crecimiento de la yema.
4 (0.5, 0.1)	Nula.
5 (0.5, 0.5)	Nula.
6 (0.5, 1.0)	Ruptura de la estructura de protección.
7 (1.0, 0.1)	Ligera formación de callo.
8 (1.0, 0.5)	Ruptura de la estructura de protección y crecimiento de la yema y formación de callo blanco en zonas de ruptura del tejido del explante.
9 (1.0, 1.0)	Ruptura de la estructura de protección y crecimiento de la yema y formación de callo blanco en zonas de ruptura del tejido del explante.



a)

b)

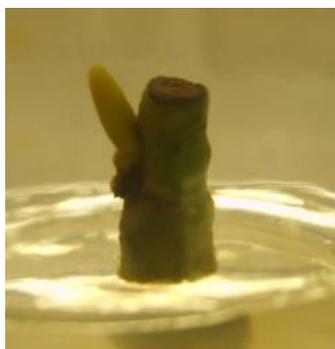
Figura 15. Respuesta de los explantes nodales a los tratamientos a) 2 (0.1 mg L^{-1} BAP, 0.5 mg L^{-1} ANA), y b) 9 (1.0 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), tras 30 d de la siembra.



a)



b)



c)



d)

Figura 16. Explantes nodales sometido a los tratamientos a) Control, b) 1, c) 4, y d) 5; a 37 d de la siembra. En ninguno de los tratamientos se presentó respuesta por parte de los explantes.



a)



b)

Figura 17. Respuesta de un explantes nodales sometidos a los tratamientos a) 2 y b) 3, a 37 d de la siembra, se presenta ruptura de la estructura de protección y elongación de la yema.

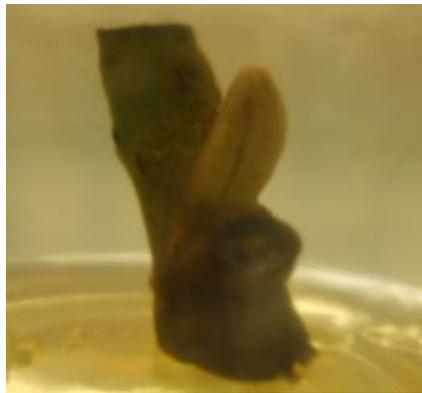


Figura 18. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 6 (0.5 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), a 37 d de la siembra, se observa la ruptura de la estructura de protección de la yema.



Figura 19. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 7 (1.0 mg L^{-1} BAP, 0.1 mg L^{-1} ANA), a 37 d de la siembra, se observa el desarrollo de callo de color verde.



Figura 20. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 8 (1.0 mg L^{-1} BAP, 0.5 mg L^{-1} ANA), a 37 d de la siembra, se observa la ruptura de la estructura de protección y elongación de la yema axilar, así como la formación de callo blanquecino y el ensanchamiento del explante.



Figura 21. Respuesta de un explante nodal sometido al tratamiento 9 (1.0 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), a 37 d de la siembra, se observa la ruptura de la estructura de protección y elongación de la yema, así como la formación de callo blanquecino y el ensanchamiento del explante.

Dada la respuesta de los explantes nodales a ciertos tratamientos, se planteó la resiembra en los medios de cultivo correspondientes a los tratamientos 3, 7, 8 y 9, en los cuales se observó una mayor respuesta por parte de los explantes.

Además, debido a la respuesta obtenida con los primeros tratamientos ensayados con explantes nodales, se plantea la experimentación con 2 tratamientos adicionales, dirigidos a la formación de brotes y de callo en los explantes nodales.

Tabla 6. Tratamientos adicionales para la inducción de morfogénesis a partir de explantes nodales.

Tratamiento	BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)
10	0.1	2
11	2	0.1

Después de 35 d de cultivo, y dada la nula respuesta de algunos explantes nodales sometidos a los tratamientos descritos en la tabla 4; se procedió a realizar la resiembra de los explantes nodales en medios de cultivo adicionales (Tabla 7), con la finalidad de inducir la respuesta por parte de los explantes, al aumentar las concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal. En la tabla 8 se detalla la respuesta de los explantes a 35 d de la siembra.

Tabla 7. Respuesta de los explantes nodales a los tratamientos 10 y 11 (Tabla 7).

Tratamiento (BAP mg L ⁻¹ , ANA mg L ⁻¹)	Respuesta
(0.1, 2.0)	Favorece la ruptura de la estructura de protección de la yema, y en algunos casos el brote de hojas.
(2.0, 0.1)	Oxidación de los tejidos, sin respuesta.

Paralelamente a la experimentación con los tratamientos 10 y 11 (Tabla 7), se continuó realizando siembras en los medios de cultivo correspondientes a los tratamientos 3, 7, 8 y 9 (Tabla 4); con lo que se observó la respuesta de los mismos sobre explantes nodales previamente sometidos a cultivo in vitro, y explantes nodales nuevos.



Figura 22. Explantes nodales sometidos al tratamiento (1.0 mg L^{-1} BAP, 0.5 mg L^{-1} ANA), a 70 d de la siembra, se observó la salida de hojas; además de un obscurecimiento del medio de cultivo.



Figura 23. Explante nodal sometido al tratamiento (1.0 mg L^{-1} BAP, 0.1 mg L^{-1} ANA), a 70 d de la siembra se observó la presencia de hojas de tipo lanceolado y el obscurecimiento del medio de cultivo.

A partir de los resultados observados durante la siembra y resiembra de explantes nodales en los medios de cultivo previamente mencionados, se obtuvieron resultados consistentes con respecto a la respuesta inducida por los tratamientos 3 y 9, correspondientes a (0.1 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), y (1.0 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA) respectivamente.

En el caso del tratamiento (0.1 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA) fue posible observar la proliferación de tejido calloso en los explantes nodales sometidos al tratamiento, presentando la formación de callos de coloración verde y alta friabilidad. Este tratamiento también ejerció un efecto de activación sobre las yemas presentes en los explantes nodales sometidos al tratamiento, aunque fue un resultado poco frecuente (1:4).

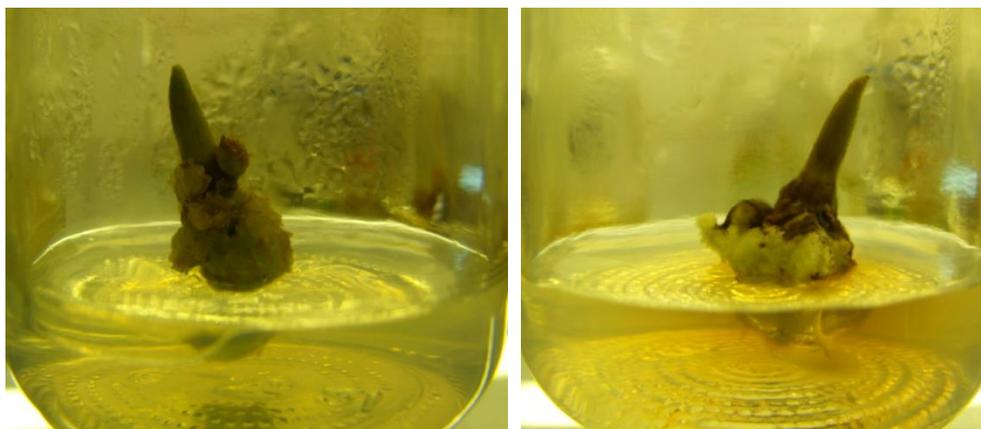


Figura 24. Respuesta organogénica de explantes nodales sometidos al tratamiento (0.1 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), a 63 d de la siembra. Se observó la formación de tejido calloso tanto en la base del explante, como en secciones del explante de donde fueron removidos hojas o brotes generados *ex vitro*.

El tejido calloso obtenido a través del cultivo de explantes nodales en el tratamiento (0.1 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), fue posteriormente aislado del explante original y sembrado en medio de cultivo con la misma combinación y concentración de reguladores de crecimiento vegetal utilizados para la inducción tras lo cual se observó una baja oxidación de los tejidos y una lenta proliferación del tejido calloso.



Figura 25. Tejido caloso proveniente de un explante nodal sometido al tratamiento (0.1 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), aislado y resembrado en medio de cultivo similar al utilizado para la inducción.

Por su parte, el tratamiento (1.0 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), demostró inducir a la brotación de hojas a partir de los explantes nodales sometidos al tratamiento.



Figura 26. Brote de yemas de un explante nodal sometido al tratamiento (1.0 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} ANA), a 63 d de la siembra.

Tras las observaciones realizadas durante el desarrollo del presente trabajo, acerca de la respuesta de los explantes de *M. grandiflora* a los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal propuestos; se concluyó que el ácido naftalenacético, ejerce un mayor efecto sobre los

explantes, ya que puede inducir la formación de callo, al igual que puede favorecer el crecimiento de las yemas presentes en explantes nodales, a diferencia del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ampliamente reportado como agente inductor de la formación de tejido calloso (Hurtado y Merino, 2001; Pierik, 1990); aún incluso cuando se planteó su uso basándose en reportes de cultivo *in vitro* de otras especies del género *Magnolia* (Mata-Rosas *et al.*, 2006; Kaménicka *et al.*, 2006 y Kim *et al.*, 2007).

7.5 Cultivo *in vitro* de semillas inmaduras de *M. grandiflora*.

Como ya se ha mencionado, debido a que se contaba con material vegetal extra, como son los conos y semillas inmaduras, la desinfección de los conos inmaduros y la separación de las semillas resultaron exitosas, tras estos procesos, las semillas fueron sometidas a un medio de cultivo para inducir la organogénesis (Tabla 8), sin embargo, tras varios meses de cultivo no se observó respuesta de los explantes.

Tabla 8. Tratamientos para la inducción de organogénesis en semillas inmaduras de *M. grandiflora*

TRATAMIENTO	BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)
1	0.25	0.5
2	0.25	1.0
3	0.25	2.0
4	0.5	0.5
5	0.5	1.0
6	0.5	2.0

Se procedió a realizar otro experimento, en el que se cortaron las semillas para permitir que el embrión, entrara en contacto con el medio de cultivo y se pudiera presentar el crecimiento celular desdiferenciado (callo), o bien la germinación del embrión.

Tras 149 días de la siembra de las semillas inmaduras, no se observó respuesta morfogénica por parte de las mismas. La única observación acerca de las semillas sembradas en medios de cultivo suplementados con BAP y 2,4-D (Tabla 9), es la oxidación de los tejidos; tanto del tejido residual del arilo, como del endospermo en contacto con el medio de cultivo.

VIII. CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo de desinfección de para los diferentes explantes de *Magnolia grandiflora*, a través del cual se logró obtener bajos porcentajes de contaminación en los experimentos realizados.
-
- El proceso germinativo de las semillas maduras de *M. grandiflora*, puede verse interrumpido debido a factores como la oxidación del endospermo que queda al descubierto tras la ruptura de la testa, o la dureza de la testa que puede impedir el correcto desarrollo, aún a pesar de la salida de la radícula.
- En el caso de los explantes foliares de *M. grandiflora*, los tratamientos correspondientes a (1 mg L⁻¹ de BAP y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D) y (0 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D) indujeron la formación de tejido calloso, sin embargo, tras poco más de 30 días de cultivo, ésta se ve afectada por la producción de compuestos fenólicos por parte del explante
- En el caso de los explantes nodales de *M. grandiflora*, el tratamiento correspondiente a (0.1 mg L⁻¹ BAP, 1.0 mg L⁻¹ ANA), indujo la formación de tejido calloso en la parte basal, así como en los sitios donde previamente se removieron hojas y brotes desarrollados *ex vitro*.
- Los callos obtenidos a partir de la inducción en explantes nodales de *M. grandiflora*, presentaron alta friabilidad, así como una baja tasa de oxidación tras el aislamiento y resiembra en medio de cultivo con concentraciones iguales de BAP y ANA a las utilizadas para la inducción.
- El tratamiento (1.0 mg L⁻¹ BAP, 1.0 mg L⁻¹ ANA) aplicado a explantes nodales de *M. grandiflora*, promovió el desarrollo de las yemas presentes en el explante.
- La capacidad de producción de compuestos oxidantes por parte de las células de *M. grandiflora*, puede impedir la observación del efecto de los reguladores de crecimiento vegetal sobre los explantes debido a la liberación de éstos compuestos en el medio de

cultivo, lo que consecuentemente promueve la oxidación del explante, aún cuando se adicionan agentes antioxidantes como el ácido cítrico, ácido ascórbico y polivinilpirrolidona al medio de cultivo.

IX. PERSPECTIVAS

Debido a la escasez de información acerca del establecimiento de cultivos *in vitro* de *Magnolia grandiflora*, el presente trabajo constituye la base para experimentos posteriores que permitan no sólo el desarrollo de técnicas de micropropagación a través del establecimiento de protocolos encaminados al enraizamiento y aclimatación de los explantes nodales que mostraron respuesta morfogénica; así como la inducción de embriogénesis somática a partir de semillas o explantes foliares, lo que ayudaría superar la problemática de escasez de material vegetal.

Además, se podría analizar e inducir la producción de metabolitos secundarios como el partenólido y costunólido, sintetizados por *M. grandiflora* de manera natural, en cultivos *in vitro*, no sólo de tejido calloso, sino en cultivos de células en suspensión, al tomar como base los callos friables obtenidos a partir de la inducción de organogénesis en explantes nodales y foliares.

BIBLIOGRAFIA

Abdelgaleil, S. y Hashinaga F. Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35: 737-742 (2007).

Anónimo, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.

Buchanan, B.; Gruissem, W. y Jones, R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. 2000.

Callaway, Dorothy J. (1994) *The World of Magnolias*. Timber Press.

Cicuzza, D.; Newton, A.; Oldfield, S. *The Red List of Magnoliaceae*. 2007. Fauna & Flora International.

Dirr, M. y Heuser C. *The Reference Manual of Woody Plant Propagation: From Seed to Tissue Culture*. Varsity Press. 2006

Dong, J.; Li, G. y Zhang K. Screening and Isolation of Antinematodal Metabolites Against *Bursaphelenchus xylophilus* Produced by Fungi and Plant. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. 347-358 (2008)

Domínguez, F.; Chávez, M.; Garduño-Ramírez M.L.; Chávez-Ávila, V.M.; Mata, M. and Cruz-Sosa F. 2009. Production of Honokiol and Magnolol in suspension cultures of *Magnolia dealbata* Zucc. *Natural Product Communications* 4: 939-943

Evans, R. C. Germination behavior of *Magnolia grandiflora*. *Botanical Gazette*. 94:729-754 (1930).

Feltenstein, M. W.; Schuhly, W.; Warnick, J.E.; Fischer, N.H. y Sufka, K.J. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from *Magnolia* and Bear's foot. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 79: 299-302 (2004).

Flores, Adriana. F. (2006). Propagación por acodo aéreo de *Magnolia grandiflora*. Tesis de Licenciatura. UACH. Chapingo, Edo de México.

Ganzera, M.; Mair, M.; Stuppner, H.; Fischer, N.H. and Khan, I.A. Analysis of sesquiterpene lactones in *Magnolia grandiflora* L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Chromatographia*. 54 (9-10):665-668 (2001).

Hong, L.; Li, G.; Zhou, W.; Wang, X y Zhang, K. Screening and isolation of a nematocidal sesquiterpene from *Magnolia grandiflora* L. *Pest Management Science*. 63:301-305 (2007).

Hurtado M., Daniel y Merino M., Maria Eugenia. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. Mexico. 2001.

Ista. Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas. Ensayo topográfico al Tetrazolio. Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería. España. (1999)

Kim, Y.W.; Park, S.Y.; Park, I.S. y Moon, H.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Magnolia obovata* Thunberg. *Plant Biotechnology Reports*. 1:237-242 (2007).

Kamenická, A. y Valová M. The effects of cultura media on formation of axillary shoots of *Magnolia x soulangeana* Soul.- Bod. *in vitro*. *Annali di Botanica*. 52: 37-43 (1994).

Kamenická, A. Rooting of *Magnolia x soulangeana* microcuttings. *Biología*. 51:435-439 (1996)

Kamenická, A. y Lanakova, M. Effect of médium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of *Magnolia in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 22 (2): 129-134 (2000).

Le Page- Degivry, M. T. Dormance de graine associée a une immaturité de l'embryon: Etude en cultura *in vitro* chez *Magnolia soulangeana* Soul. Bod. Et *Magnolia grandiflora* L. *Planta*. 90: 267-271 (1970)

Luo, X-D.; Wu, S-H; Ma, Y-B; Wu, D-G y Zhou, J. Sesquiterpenoids from *Magnolia grandiflora*. *Planta Medica*. 67: 354-357 (2001).

Martínez G. y Chacalo H.A. Los árboles de la Ciudad de México. UAM-Azcapotzalco. pp. 231-233 (1994)

Mata-Rosas M. y Jiménez- Rodríguez, A. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), an Endangered, Endemic Mexican species. *Horticultural Science*. 41 (5): 1325-1329 (2006).

Pérez Molphe Balch, E. M.; Ramírez Malagón, R.; Nuñez Palenius, H. G. y Ochoa Alejo, N. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. (1999)

Pierik, R. M. L. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. España. 1990.

Saldaña Acosta, A., Zuloaga Aguilar, M.S.; Jardel Peláez, E. Germinación de *Acer skutchii* Rehder y *Magnolia iltisiana* Vázquez en la reserva de la biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco, México. Universidad Veracruzana. Xalapa, México. *Foresta Veracruzana*. 3(2):1-8. (2001)

Schühly, W.; Khan, I. y Fischer, N. The Ethnomedicinal uses of Magnoliaceae from the Southeastern United States as leads in drug discovery. *Pharmaceutical Biology*. 39:63-69 (2001).

Tubesing, C. H. E. Magnolias with a future: Propagation and nursery culture. In: Hunt D. (ed.) Magnolias and their allies. International Dendrology Society. Milborne Port. 193-200. (1998)

Wang, X; Wang, Y.; Geng, Y.; Li, F. y Zheng, C. Isolation and purification of honokiol and magnolol from cortex Magnoliae officinalis by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A* 1036: 171-175 (2004).

ANEXOS

Original de la tabla de germinación de semillas de *Magnolia grandiflora*

La imagen corresponde a la tabla 1-1 del libro *The Reference Manual of Woody Plant Propagation*, de los autores Michael Dirr y Charles Heuser, 2006. Original a partir de la cual se realizó la traducción correspondiente a la tabla 2 del presente trabajo.

Table 1-1 *Magnolia grandiflora* seed germination.

Treatment	Percent germination	Days to germination from sowing date
Aril intact	29*	125
Aril removed	73	125 (2 seeds up after 60 days)
Aril intact, 24 hour water soak	21	125 (1 seed up after 60 days)
Aril removed, 24 hour soak	76	125
Aril intact, 3 months cold stratification	None	—
Aril removed, 3 months cold stratification	General germination	35

*Germination percentages are based on 5 replicates of 20 seeds per replicate (100 seeds). The seeds not subjected to cold stratification were treated and sown on Nov. 11. The seeds subjected to cold stratification were sown Feb. 11.

Resultados de pruebas preliminares realizadas a la cepa proveniente de semillas de *Magnolia grandiflora*.

MORFOLOGÍA COLONIAL

Medio Agar nutritivo.

Característica	COLONIA 1
Tamaño	2mm
Forma	Circular
Color	blanca
Elevación	planas
Bordes	enteros
Aspecto	húmeda
Consistencia	suave
Luz transmitida	opaca
Luz reflejada	brillante
Pigmento	No hay

Medio EMB (eosina-azul de Metileno)

Característica	COLONIA 1
Tamaño	2mm
Forma	Circular
Color	Rosas
Elevación	convexas
Bordes	enteros
Aspecto	húmeda
Consistencia	suave
Luz transmitida	opaca
Luz reflejada	brillante
Pigmento	No hay

Medio PDA (papa dextrosa)

Característica	COLONIA 1
Tamaño	3-4mm
Forma	Circular
Color	blanca
Elevación	planas
Bordes	enteros
Aspecto	MUCOIDE y húmeda
Consistencia	suave
Luz transmitida	opaca
Luz reflejada	brillante
Pigmento	No hay

No se observa crecimiento en medio Sal-Manitol.

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA.

- Bacilos GRAM NEGATIVOS,
- Agrupación en cadenas.

Bacilos, delgados, largos, que se agrupan como filamentos.

Sensibilidad a los siguientes antibióticos:

- SXT: Trimetoprim sulfametoxazol
- CL: Cloranfenicol
- AK : Amikacina
- CTX: Ceftriaxona

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

- Fermentación lenta de la Glucosa
- H₂S: (-) NEGATIVO
- UREA: (-) NEGATIVO
- CITRATO: (+) POSITIVO
- MOVILIDAD: (-) NEGATIVO
- LIA (Descarboxilación de la Lisina): (+) POSITIVO
- INDOL: (-) NEGATIVO
- CATALASA: (-) NEGATIVA
- OXIDASA: (+) POSITIVA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00106

Maticula 207381441

"ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS
In vitro de Magnolia
grandiflora"

En México, D.F., se presentaron a las 15:00 horas del día 2 del mes de diciembre del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE RAMON VERDE CALVO
- DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA
- DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ
- DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE



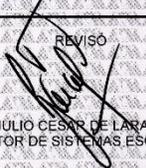

DONAJI ARIADNA RAMIREZ LOPEZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
DE: DONAJI ARIADNA RAMIREZ LOPEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

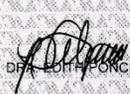
Aprobada



REVISÓ
LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. LUITPONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE



DR. JOSE RAMON VERDE CALVO

VOCAL



DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

VOCAL



DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ

SECRETARIO



DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE