



INFORMACIÓN LEGAL

ENCUENTRO PARTICIPACIÓN DE LA MUJER EN LA CIENCIA, es una publicación anual editada por el Centro de Investigaciones en Óptica A.C., calle Loma del Bosque No. 115, colonia Lomas del Campestre, León, Gto, C.P. 37150 Tel. (477) 4414200, www.cio.mx, csolano@cio.mx, Editor responsable Dra. Cristina Solano Sosa. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 04-2015-071610212700-203, ISSN 2448-5063, otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Departamento de Comunicación y Difusión de la Ciencia, Lic. Fco. Javier Omedes Alrich, calle Loma del Bosque No. 115, colonia Lomas del Campestre, León, Gto, C.P. 37150, fecha de última modificación 26 de mayo del 2015.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización del Centro de Investigaciones en Óptica A.C.



XII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia

ANIVERSARIO 50

13-15 MAYO 2015 León, Guanajuato

Otorga el presente *Reconocimiento* por su valiosa participación a:

de la Cruz Cruz Adanelly, Gutiérrez Mora A., Rodríguez Domínguez J. M., Castañeda Saucedo M. C. y Tapia Campos E.

Por el trabajo:
ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASEPTICOS PARA LA PROPAGACION in vitro DE ESPECIES SILVESTRES DEL GENERO Polianthes L. (ASPARAGACEAE)

[Signature]
Dra. Amalia Martínez García
Representante del Comité Organizador

[Signature]
Dr. Elder de la Rosa Cruz
Director General del CIO

Florence Nightingale
Enfermera británica



ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASEPTICOS PARA LA PROPAGACION *in vitro* DE ESPECIES SILVESTRES DEL GENERO *Polianthes* L. (ASPARAGACEAE)

^aAdanelly de la Cruz-Cruz, A. Gutiérrez-Mora^a, J. M. Rodríguez-Domínguez^a, M.C. Castañeda-Saucedo^b, E. Tapia-Campos^a

^aCentro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, nellypowerpuff@hotmail.com, agutierrez@ciatej.mx, mrodriguez@ciatej.mx, etapia@ciatej.mx

^bCentro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara (CUSUR-UDG). claudia.saucedo@cusur.udg.mx

RESUMEN

El género *Polianthes* comprende un grupo de especies de distribución restringida, sensible a perturbaciones de su hábitat natural y vulnerable a la extinción. Una estrategia para conservar estas especies es el cultivo de tejidos; sin embargo al tratarse de plantas bulbosas que conviven con patógenos del suelo en su hábitat natural el establecimiento de un cultivo aséptico (para su posterior propagación *in vitro*) es un punto problemático. Con el propósito de obtener cultivos asépticos de especies silvestres del género *Polianthes* se tomaron bulbos de *P. platyphylla*, *P. howardii*, *P. montana*, *P. pringleii*, y *P. geminifloravar. Pueblensis*; además de una especie comercial *P. tuberosa* var. Doble. Se probaron diferentes tratamientos de desinfección superficial de los bulbos: tratamiento fungicida-bactericida a base de Captan (.5, 1 y 2g·L⁻¹) y Bactrol (.5 1 y 2g·L⁻¹) durante 30 min, 1y 24 hrs, cefotaxima (300 y 600 mg· L⁻¹ y 1g·L⁻¹) durante 1 ó 24 hrs, Cl comercial al 3% (durante 3, 5 ó 7 min) y Alcohol al 90% (durante 10, 20,30 s ó 1 min) según la especie además tratamiento con cloruro de mercurio (HgCl₂) al 1% (durante 5, 7 ó 10 min) en algunas especies. La contaminación por hongos y bacterias fue una constante en la mayoría de los tratamientos, hasta el momento el mejor tratamiento para la desinfección eficiente de los explantes fue Captan (2g·L⁻¹) y Bactrol (2g·L⁻¹) durante 1 día, cefotaxima (1g·L⁻¹) durante 1 día , Cl comercial al 3% durante 5 min, alcohol al 90% por 1 min y cloruro de mercurio (HgCl₂) al 1% durante 10 min, que mostro una supresión de la contaminación para todas las especies mencionadas sugiriendo que este método es el más adecuado para el establecimiento *in vitro* para su posterior propagación masiva o conservación *in vitro*.

INTRODUCCION

México tiene una gran diversidad biológica debido a su posición geográfica y sus diferentes climas (Ramamoorthy *et al.*, 1998 y Toledo, 1988). A nivel mundial nuestro país es considerado entre las naciones con mayor riqueza biológica (Villaseñor, 1991), albergando entre el 8 y el 12% de las especies del planeta (Challenger, 1998). El género *Polianthes* es de distribución restringida, es sensible a las perturbaciones de su hábitat natural y en consecuencia es vulnerable a la extinción. La transformación del hábitat es uno de los principales factores que afectan a las poblaciones silvestres tales como: *P. platyphylla*, *P. howardii*, *P. montana*, *P. pringleii*, y *P. geminifloravar. Pueblensis* por lo que es necesario tomar medidas para la conservación de las mismas. Una de las estrategias que permite el rescate, la conservación y multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción es el empleo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, con la finalidad de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de estas especies se realizaron varios ensayos para lograr la desinfección del bulbo. Las especies silvestres de *Polianthes* se consideran perennes, el mayor crecimiento vegetativo se presenta durante primavera-verano, florecen durante verano-otoño y permanecen latentes en invierno. La propagación de esta especie puede ser vegetativa mediante el uso de los bulbos que están latentes en el suelo o generativa mediante el uso de las semillas, la desventaja principal de la propagación por semilla es el tiempo requerido



para obtener plantas adultas ya que es muy largo, sin embargo, esta puede ser una gran alternativa en el caso de mantener la diversidad genética y reproducir aquellas especies silvestres del género *Polianthes* que se encuentran en peligro de extinción.

El uso de herramientas biotecnológicas en plantas, en este caso el cultivo *in vitro*, puede ayudar a solucionar los problemas de propagación y conservación de especies vegetales amenazadas. El cultivo de tejidos vegetales puede utilizarse para diversos propósitos tales como: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma. La micropropagación presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se pueden citar: Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, reducción del tiempo de multiplicación, producción de grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable, mayor control sanitario del material que se propaga, posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos, etc. (Abdelnour-Esquivel y Vincent-Escalant, 1994).

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituye un serio problema a escala mundial. El establecimiento y propagación del nardo por medio de cultivo de tejidos ha tenido como objetivo principal el obtener material de siembra libre de virus, así como una multiplicación más rápida, su uso se ha extendido en programas de mejoramiento e investigación en esta especie. En cuanto a la micropropagación masiva Muralidhar y Mehta (1982) lograron la regeneración de hasta 800 plantas a partir de un solo bulbo. Krishnamurthy *et al.* (2001) obtuvieron la micropropagación de dos cultivares de nardo por medio de yemas axilares y secciones del tallo; por otra parte, Hutchinson *et al.* (2004) reportaron el uso de diferentes reguladores de crecimiento como TDZ (Thidiazuron), BA (Benciladenina) y ANA (Ácido Naftalén-1-acético), con el fin de disparar la generación de brotes; además Sangavai y Chellapandi (2008) consiguieron la propagación *in vitro* a partir de segmentos de bulbo.

No existen informes científicos sobre cultivo *in vitro* de *Polianthes* silvestres, por lo que será de gran importancia generar la información necesaria respecto a la micropropagación de estas especies para su conservación o reproducción masiva en el caso de que se necesite su reintroducción en los hábitats naturales, así como para el uso potencial de las mismas.

PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Como material inicial se utilizaron bulbos de plantas donantes de *P. tuberosa* var. Doble, *P. platyphylla*, *P. howardii*, *P. montana*, *P. pringleii*, y *P. geminiflora* var. Pueblensis (Figura 1).

Se realizó el lavado de los explantes con agua corriente, se retiró la tierra en su totalidad y las capas superficiales, se limpiaron los explantes exhaustiva y cuidadosamente con ayuda de bisturí y se realizaron cortes transversales desde la parte basal del bulbo, posteriormente se realizaron varios ensayos de desinfección.

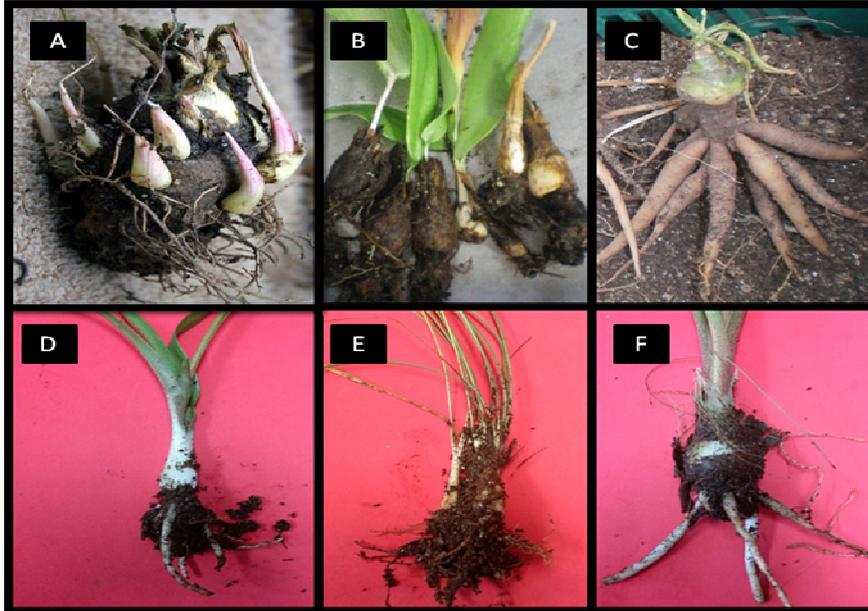


Figura 1. (A) *P. tuberosa* var. Doble, (B) *P. platyphylla*, (C) *P. howardii*, (D) *P. montana*, (E) *P. pringleii*, y (F) *P. geminiflora* var. Pueblensis

Se realizaron diferentes tratamientos de desinfección superficial de los bulbos, utilizando información de distintas publicaciones de donde se buscaba establecer diversas especies, en los que se utilizaron partes subterráneas entre otros explantes. Utilizando estas investigaciones como base se realizó la combinación de tratamientos y tiempos de exposición, hasta obtener el adecuado para los bulbos utilizados en esta investigación.

Cuadro 1. Tratamiento fungicida- bactericida a base de Captan y Bactrol, concentraciones y tiempo de exposición utilizados para la desinfección de bulbos del género *Polianthes*.

Fungicida-Bactericida	Cantidad	Tiempo de exposición
Captan-Bactrol	.5 g·L ⁻¹	30 min.
Captan-Bactrol	1g·L ⁻¹	1 hora
Captan-Bactrol	2 g·L ⁻¹	24 hrs

Cuadro 2. Antibiótico, cantidad y tiempo de exposición utilizados para la desinfección de bulbos del género *Polianthes*.

Antibiótico	Cantidad	Tiempo de exposición
Cefotaxima	300 ·L ⁻¹	1 hora ó 24 hrs
Cefotaxima	600 ·L ⁻¹	1 hora ó 24 hrs
Cefotaxima	1g·L ⁻¹	1 hora ó 24 hrs



Cuadro 3. Utilización de NaCl2 comercial para la desinfección de bulbos del género *Polianthes*.

Concentración de NaClO	Tiempo de exposición
3%	3 min
3%	5 min
3%	7 min

Cuadro 4. Concentración Alcohol y tiempos de exposición para la desinfección de bulbos del género *Polianthes*.

Concentración de Alcohol	Tiempo de exposición
90%	10s
90%	20 s
90%	30 s
90%	1 min

Cuadro 5. Tratamiento a base de HgCL2 y tiempos de exposición

HgCL2	Tiempo de exposición
1%	5 min
1%	7 min
1%	10 min

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituye un serio problema a escala mundial. Durante la realización de los distintos ensayos todas las especies mencionadas presentaron problemas de contaminación por hongo y bacteria. (Figura 2).

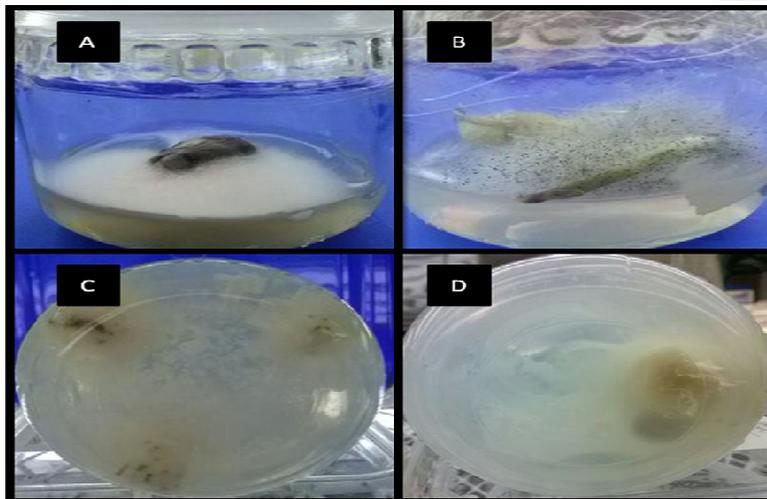


Fig 2. (A y B) contaminación por hongo, (C y D) contaminación por bacteria en especies silvestres del género *Polianthes*.

Martínez (2009), mencionó que durante el establecimiento *in vitro* de yemas del cormo de nardo (*Polianthes tuberosa* L.), hongos y bacterias causan la muerte del explante, reportando como agentes causales de la contaminación a *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp.; concluyen que es posible que estos hongos estén localizados dentro de las yemas del cormo del bulbo de nardo, lo que dificulta la acción de los desinfectantes superficiales. En el caso de especies silvestres del género *Polianthes* no hay información referente a contaminación por algún patógeno en específico; sin embargo, en esta investigación se confirma que la muerte del explante fue causado por hongos y bacterias aún no identificadas. La descontaminación de los explantes obtenidos de las partes subterráneas ha sido una tarea muy difícil, reportado por varios investigadores (Seabrook 1990; Hol y Vander, 1992). Las especies bulbosas presentan en el interior de sus bulbos mucilago y bacterias que dificultan el establecimiento de un cultivo *in vitro* en condiciones asépticas, como lo menciona Chang *et al.* (2003), quienes reportaron este tipo de problemas para hacer una propagación eficiente en *Zantedeschia albomaculata* mediante rizomas de esta especie como fuente de explante, por lo que proponen el uso del meristemos apicales como fuente inicial de explante. Las plantas bulbosas son propagadas a menudo a partir de escamas como en la propagación convencional, esta técnica se ha usado en especies raras y en riesgo incluyendo algunas plantas endémicas españolas como el narciso *Narcissus* spp. (Fay, 1992).

En general la principal fuente de explante para la propagación *in vitro* de *P. tuberosa* ha sido el cormo o secciones del mismo, por lo que en el presente experimento fue la fuente de explante que se decidió utilizar. A continuación se muestran cormos cortados transversalmente de *P. montana*, desinfectados y establecidos *in vitro* (Figura 3). Por carecer de información sobre el manejo *in vitro* del género *Polianthes*, especialmente de las especies silvestres, la estrategia utilizada para la desinfección de los bulbos consistió en varios ensayos hasta encontrar el método más eficiente, logrando el establecimiento de cuatro especies silvestres, *P. platyphylla*, *P. howardii*, *P. montana*, *P. pringleii*, y *P. geminiflora* var. *Pueblensis*; además de una especie comercial *P. tuberosa* var. *Doble*. El mejor tratamiento para la desinfección eficiente de los explantes fue Captan ($2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y Bactrol ($2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 1 día, cefotaxima ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 1 día, Cl comercial al 3% durante 5 min, alcohol al 90% por 1 min y cloruro de mercurio (HgCl_2) al 1% durante 10 min, que mostro una supresión de la contaminación para todas las especies mencionadas sugiriendo que este método es el más adecuado para el establecimiento *in vitro* para su posterior propagación masiva o conservación *in vitro*.



Fig. 3. *Polianthes montana* desinfectada y establecida *in vitro*

Se continuara realizando investigación sobre protocolos de desinfección, para el *establecimiento in vitro* de *Polianthes* silvestres. Hasta el momento los bulbos de las distintas especies se encuentran en condiciones *in vitro*, posteriormente se realizara la propagación masiva por medio de la técnica de proliferación de yemas axilares, haciendo un comparativo de la eficiencia de *Polianthes* silvestres en relación a una especie comercial la cual es *Polianthes tuberosa* var. Doble.

CONCLUSIONES

- La contaminación por hongos y bacterias fue una constante en la mayoría de los tratamientos.
- De los ensayos realizados, en los que se utilizo un mayor tiempo de exposición del tratamiento al explante, a excepción del alcohol., fueron los que mostraron mejor resultado.
- Con la presente investigación se encontró un método de desinfección para el establecimiento de cultivos asépticos.
- Este trabajo demostró que es posible establecer cultivos asépticos de especies silvestres del género *Polianthes*: *P. platyphylla*, *P. howardii*, *P. montana*, *P. pringleii*, además de una especie comercial *P. tuberosa* var. Doble., y puede tomarse como base para futuras investigaciones utilizando los métodos descritos en este documento.
- Para el caso de *P. geminiflora* var. Pueblensis, se sugiere continuar con la desinfección de los explantes utilizando los mismos tratamientos en concentraciones y tiempos mayores de exposición., para lograr el establecimiento *in vitro* de los bulbos de esta especie.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdelnour-Esquivel A y Vincent-Escalant J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Turrialba, Costa Rica pp. 2-3.
2. Challenger A. 1998. Utilización y Conservación de los Sistemas Terrestres de México. Ed. CONABIO, Instituto de Biología, UNAM y Sierra Madre. 847 p.
3. Chang HS, Chakrabarty D, Hahn EJ y Paek KY. 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* 39: 129-134.
4. Fay MF. 1992. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. In: *In Vitro Cellular and Developmental Biology.* 28:1-4.
5. Hutchinson MJ, Onamu R y Obukosia S. 2004. Effect of thidiazuron, benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on *in vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. *Journal of Agricultural Science and Technology.* 6: 48-59.



6. Krishnamurthy KB, Mythili JB y Meenakshi S. 2001. Micropropagation studies in "single" vs. "double" types of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Journal of Applied Horticulture*.3: 82-84.
7. Martínez MO. 2009. Control químico *in vitro* de hongos contaminantes de cultivos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Tesis de ingeniería. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 27.
8. Muralidhar CE y Mehta AR. 1982. Clonal propagation of three ornamental plants through tissue culture methods. In Plant Tissue Culture 1982. Proceedings 5th International Congress of plant Tissue Cell Culture. A. Fujiwara, (ed.). pp. 693-694.
9. Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A y Fa J. 1998. Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución. Ed. Instituto de Biología, UNAM. 812 p.
10. Sangavai C y Chellapandi P. 2008. *In vitro* Propagation of a Tuberose Plant (*Polianthes tuberosa* L.). *Electronic Journal of Biology*. 4: 98-101.
11. Villaseñor JL. 1991. Las Heliantheae endémicas de México: una guía hacia la conservación. *Acta Botánica*. 15: 29-46.