

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
**Campus Tuxtepec**

---

**Cultivo de tejidos para la producción de  
diosgenina en *Dioscorea spp.*, de la Cuenca del  
Papaloapan, México**

**TESIS**

Para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

Guadalupe Cristina Sánchez López

Director:

Dr. Enrique Villalobos Amador

Co-Director:

Dr. Lemuel Pérez Picaso

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Mayo 2018



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC


### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS


En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 23 de marzo de 2018 a las 12 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Cultivo de tejidos para la producción de diosgenina en *Dioscorea spp.* de la Cuenca del Papaloapan, México**" presentada por la alumna **Guadalupe Cristina Sánchez López**, con número de matrícula 11090024, aspirante al título de **Licenciatura**.

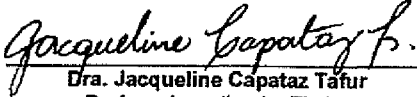
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

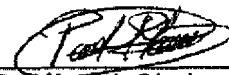
Tuxtepec, Oaxaca, a 23 de marzo de 2018

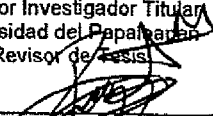
ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

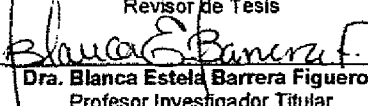
  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Enrique Villalobos Amador**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis


  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Lemuel Pérez Picaso**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Co-Director de Tesis

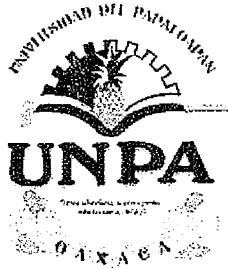
  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Jacqueline Capataz Tafur**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Omar Viñas Bravo**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 05 de abril de 2018  
Oficio No. JCIB/004/04/2018

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Guadalupe Cristina Sánchez López** titulado "**Cultivo de tejidos para la producción de diosgenina en *Dioscorea spp.* de la Cuenca del Papaloapan, México**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

**Dr. Omar Viñas Bravo (Presidente).**  
**Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Vocal).**  
**Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Secretario).**  
**Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa (Primer Suplente).**  
**Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín (Segundo Suplente).**

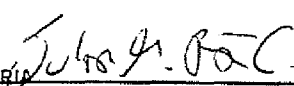
Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

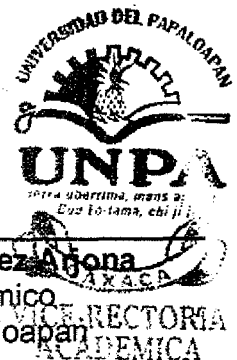
Atentamente

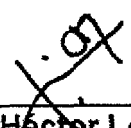
*Terra uberrima, mens aperta*  
*Bøu Lo-tama, chí jí jú*



JEFATURA DE INGENIERÍA  
EN BIOTECNOLOGÍA  
CAMPUS TUXTEPEC

  
**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Jefe de Carrera de Ingeniería en  
Biotecnología  
Universidad del Papaloapan



  
**Vo.Bo. M.C. Héctor López Agón**  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan

c.c.p. Dr. Enrique Villalobos Amador. Director de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Guadalupe Cristina Sánchez López, Alumno, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, y en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, bajo la dirección del Dr. Enrique Villalobos Amador y codirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso. Con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 22973 otorgada a través del proyecto CB-2011/169593.

*A la memoria de mi papá, Leonardo, y de mi Tata Nado (QEPD), por todas sus enseñanzas.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco principalmente a mi madre, Blanca, por su amor incondicional, su dedicación y sus enseñanzas, por todos sus consejos, jalones de oreja y confianza depositada en mí y en cada uno de sus hijos. A mi padre, Leonardo, por haber formado hijos con valores, por dejar huella, ya que, a pesar de ya no estar, sus consejos siempre seguirán con nosotros.*

*A mis hermanos, por todos los momentos compartidos, por contribuir tener la mejor niñez posible. A Makí, por enseñarme a sí se quiere se puede una abrir camino en el ámbito que quieras, sin importar las dificultades a las que debas enfrentarte. A Hugo, por ser un modelo de hijo, de hermano, de estudiante y de persona. A Gabi, por ser siempre confidente y amigo, por su cariño y consentirme tanto. Por último, pero no menos importante, a Ale, por haber sido siempre un cómplice incondicional.*

*A mi abuelo Leonardo, por haber sido un segundo padre para mí y mis hermanos.*

*Agradezco a mis directores, el Dr. Enrique Villalobos Amador y el Dr. Lemuel Pérez Pícaso por su dirección, enseñanza, consejos y tiempo dedicados en la realización del presente trabajo.*

*Al proyecto PROMEP 2010 “Fortalecimiento de cuerpos académicos”.*

*A los miembros del comité tutorial por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo de investigación.*

*Dr. Omar Viñas Bravo*

*Dra. Jacqueline Capataz Tafur*

*Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo*

*Dra. Blanca Estela Barrera Estrella*

*Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín*

*A todos los profesores que colaboraron en mi formación durante los 5 años de carrera, tanto a los que me impartieron clases como a los que no.*

*Al Ing. Juan Hernández por todas las facilidades brindadas para los experimentos realizados.*

*Al Dr. Eugenio Pérez Molphe-Bach por las facilidades brindadas durante la estancia en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por brindarnos las cepas de *Agrobacterium* y todo lo necesario para realizar la transformación genética.*

*Al Dr. Edgar García por los oligos proporcionados para la amplificación del gen rolB (proyecto 3212 Catedra-CONACYT no. 183958).*

*A CONACYT por el financiamiento del proyecto INFRA-2015-01-252013.*

*Al Dr. José Abad y al Dr. Miguel Ángel Peña por facilitarnos el uso de equipos de laboratorio y de reactivos.*

*Al Dr. Adolfo López por su tiempo dedicado a la cuantificación de Diosgenina, por todos sus consejos y ayuda.*

*A todas aquellas personas que me brindaron en algún momento su valiosa amistad, principalmente a los que se quedaron. A Chris, Miché, Liz, Jair, Edith, Alán, Sosa, Cris, Alain, Raquel, Víko, Misa (el nuevo) y principalmente a Erick, por su amistad incondicional.*

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
TABLA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES.....	2
2.1 Importancia del barbasco.....	2
2.2 El barbasco como grupo de especies del género <i>Dioscorea</i> .....	3
2.3 Manejo y problemática.....	7
2.4 Cultivo de tejidos vegetales.....	9
2.4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea</i> .....	11
2.5 Metabolitos secundarios .....	14
2.6 Biosíntesis e importancia de la diosgenina.....	15
2.7 Obtención de diosgenina en diversos cultivos vegetales.....	19
2.8 Transformación genética de plantas .....	22
2.8.1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	22
2.8.2 Genes reporteros .....	23
III. JUSTIFICACIÓN .....	26
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. OBJETIVOS .....	28
5.1 General .....	28
5.2 Particulares .....	28
VI. METODOLOGÍA .....	29
6.1 Localización geográfica .....	30
6.2 Material vegetal.....	30
6.3 Establecimiento <i>in vitro</i> de cultivos .....	31
6.4 Infección con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	33
6.5 Comprobación de la transformación .....	34

6.5.1 Ensayo histoquímico para GUS .....	34
6.5.2 Amplificación de ADN por PCR .....	35
6.6 Cultivos <i>in vitro</i> de raíces en medios suplementados con auxinas.....	37
6.7 Extracción de diosgenina.....	37
6.8 Detección de la diosgenina en los extractos mediante TLC.....	38
6.9 Determinación de diosgenina en los extractos mediante UPLC-MS .....	39
6.10 Diseño estadístico .....	40
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	41
7.1 Establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i> .....	41
7.2 Transformación genética .....	45
7.3 Inducción de raíces con auxinas .....	47
7.4 Identificación y cuantificación de diosgenina .....	52
VIII. CONCLUSIONES .....	56
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	57
X. ANEXOS .....	66
Anexo 1: Tratamientos de desinfección .....	66
Anexo 2: Soluciones madre para medio MS .....	68
Anexo 3: Tablas de contaminación y necrosis. ....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Descripción botánica de una especie del género <i>Dioscorea</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Distribución del género <i>Dioscorea</i> en el mundo.....	6
<b>Figura 3.</b> Distribución del término barbasco en México.....	8
<b>Figura 4.</b> Estructuras químicas de la saponina y la sapogenina. ....	16
<b>Figura 5.</b> Ruta biosintética de la diosgenina.. ....	17
<b>Figura 6.</b> Metodología general. ....	29
<b>Figura 7.</b> <i>Dioscorea sp.</i> , creciendo de manera silvestre dentro de la Universidad. ..	30
<b>Figura 8.</b> Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea sp.</i> .....	32
<b>Figura 9.</b> Proceso para la obtención de los extractos .....	39
<b>Figura 10.</b> Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea sp.</i> .....	44
<b>Figura 11.</b> Raíces transgénicas tras la prueba GUS. ....	46
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de agarosa. ....	47
<b>Figura 13.</b> Rizogénesis en medio suplementado con AIB en oscuridad. ....	48
<b>Figura 14.</b> Rizogénesis en medio suplementado con AIB en fotoperiodo 16:8 .....	49
<b>Figura 15.</b> Rizogénesis <i>in vitro</i> inducida con 1 mg/L de IBA. ....	51
<b>Figura 16.</b> TLC. Placa vista en cámara de UV.....	53
<b>Figura 17.</b> Cromatograma obtenido de las diferentes muestras.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Dioscorea</i> .....	3
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los cultivos <i>in vitro</i> .....	10
<b>Tabla 3.</b> Respuestas a diferentes cultivos <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea</i> .....	12
<b>Tabla 4.</b> Concentración de diosgenina en diferentes especies vegetales.....	21
<b>Tabla 5.</b> Número de explantes de procesados por cada cepa .....	34
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción para PCR .....	36
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de PCR .....	36
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de contaminación y necrosis .....	41
<b>Tabla 9.</b> Capacidad de formación de brotes (CFB).....	42
<b>Tabla 10.</b> Raíces transformadas .....	45
<b>Tabla 11.</b> Respuesta rizogénica a las condiciones de fotoperiodo .....	48
<b>Tabla 12.</b> Rizogénesis obtenida con AIB .....	50
<b>Tabla 13.</b> Rendimiento de los extractos crudos .....	52
<b>Tabla 14.</b> Concentración de diosgenina .....	53

## ABREVIATURAS

<b>μM</b>	Micro molar
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>4-Cl-AIA</b>	4-cloro-indolacético
<b>A.</b>	<i>Agrobacterium</i>
<b>AcEt</b>	Acetato de etilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>AIB</b>	Ácido indol butírico
<b>AIP</b>	Ácido indol propiónico
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>APA</b>	Ácido fenilacético
<b>C-16</b>	Carbono 16
<b>C-22</b>	Carbono 22
<b>C-26</b>	Carbono 26
<b>CFB</b>	Capacidad de formación de brotes
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>D.</b>	<i>Dioscorea</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ESI</b>	Ionización por electro nebulización
<b>g/L</b>	Gramo/litro
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GUS</b>	β-glucuronidasa
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>Kn</b>	Kinetina

<b>L/h</b>	Litro/hora
<b>LC-MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a masas
<b>LCTV</b>	Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales
<b>MetOH</b>	Metanol
<b>mg/g</b>	Miligramo/gramo
<b>mg/L</b>	Miligramo/litro
<b>MS</b>	Murashige y Skoog
<b>N</b>	Norte
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NR</b>	No reportado
<b>O</b>	Oeste
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PTFE</b>	politetrafluoroetileno
<b>Q-TOF</b>	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
<b>Ri</b>	Inductor de raíz
<b>RP</b>	Fase reversa
<b>sp</b>	Especie
<b>T-DNA</b>	ADN de transferencia
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>UAA</b>	Universidad Autónoma de Aguascalientes
<b>UDP</b>	Uridina difosfato
<b>UGT</b>	Uridina difosfato glucuroniltransferasa
<b>UNPA</b>	Universidad del Papaloapan
<b>UPLC-MS</b>	Cromatografía líquida de ultra resolución acoplado a masas
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>X-GLU</b>	3- indoxil- $\beta$ -D-glucurónico

## RESUMEN

Las *Dioscoreas* se han utilizado desde la antigüedad en la medicina tradicional de muchas culturas. Algunas especies contienen en sus rizomas una gran cantidad de compuestos de interés, entre los que destaca la sapogenina, la cual tiene efectos favorables en el tratamiento de diversos padecimientos. Además de ser el precursor para la síntesis de progesterona y cortisona. La propagación convencional de *Dioscorea* resulta ser ineficiente para su multiplicación a gran escala, además de presentar largos periodos de espera para la obtención de biomasa. Las técnicas biotecnológicas pueden representar una solución, tanto para la propagación a gran escala como para la obtención de diosgenina en mayores concentraciones y/o menor tiempo. El objetivo del presente trabajo de tesis fue obtener cultivos bajo condiciones *in vitro* de raíces de *Dioscorea sp.* colectada en la Cuenca del Papaloapan, y a su vez, lograr la transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* para obtener raíces de crecimiento autónomo. Así mismo, la extracción y cuantificación de diosgenina presente en estos cultivos. Se realizó la transformación genética de *Dioscorea sp.* con la cepa A4 de *A. rhizogenes* obteniendo un  $0.33 \pm 0.57$  % de éxito. Así mismo, se logró la rizogénesis con la auxina IBA, teniendo los mejores resultados de rizogénesis (95 %) a una concentración de 1 mg/L. El mayor contenido de diosgenina en los cultivos *in vitro* se encontró en los extractos de raíces transformadas (2.239 mg/g), el cual representa un 62.07 % de la contenida en los extractos de raíz silvestre y un 56.62 % de la contenida en extractos de rizoma silvestre.

## I. INTRODUCCIÓN

Las *Dioscoreas* han sido utilizadas desde la antigüedad como alimento y en la medicina tradicional de muchas culturas (Huang *et al.*, 2016; Yan, Yang, y Li, 2011). Algunas especies contienen en sus rizomas una gran cantidad de compuestos de interés, entre los que destacan la sapogeninas que, al hidrolizarse, liberan diosgenina (Sánchez-Cruz *et al.*, 2008; González-Vega, 2012), la cual tiene efectos favorables en el tratamiento de la diabetes, el Alzheimer, aumenta los niveles de estrógeno en la sangre, mejora la secreción de colágeno y presenta actividad anticancerígena, entre otros (Evkota *et al.*, 2007). Además de ser el precursor para la síntesis de progesterona y cortisona (Bucay, 2009).

La propagación convencional de *Dioscorea* se lleva a cabo generalmente por fragmentación de rizomas, la cual es lenta y resulta ser ineficiente para su multiplicación a gran escala. A nivel industrial la diosgenina se obtiene a partir de la fermentación de rizomas de *Dioscorea*, pero los largos periodos de espera para la obtención de biomasa representan un desafío a nivel industrial (Salazar y Hoyos, 2007; González-Vega, 2012). Las técnicas biotecnológicas podrían representar una solución, tanto para la propagación a gran escala como para la obtención de diosgenina en mayores concentraciones y/o menor tiempo (Castillo, 2008; Bonilla-Morales y Hernández-Castañeda, 2012).

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de cultivos *in vitro* de raíces y de raíces transformadas de barbasco (*Dioscorea sp.*) para la obtención y cuantificación, mediante UPLC-MS, de diosgenina.

## II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

### 2.1 Importancia del barbasco

Las plantas son fuente de una gran diversidad de productos naturales, con una amplia gama de estructuras químicas y actividades biológicas, las cuales pueden y se han usado para la producción de medicamentos (Agrawal *et al.*, 2017).

El barbasco se ha utilizado ampliamente en la medicina tradicional mexicana, ya que presenta acción antiespasmódica, contra la artritis, fiebres reumáticas, inflamación del nervio ciático, dolores de mujeres embarazadas (Hata *et al.*, 2003), diarrea, hemorroides, enfermedades respiratorias (Palacios-Cortez, 2010), cólicos, antialérgico (Naskar y Mishra, 2018), úlceras (Nwafor *et al.*, 2018) y diabetes (Wang *et al.*, 2018). También se ha documentado su uso en la pesca, ya que los peces capturados con barbasco no son tóxicos para el consumo humano (Hata *et al.*, 2003). En el siglo anterior cobró gran relevancia para la industria química, al ser una importante fuente de diosgenina, la cual se emplea en la síntesis de cortisona y otros compuestos corticoesteroides (Palacios-Cortez, 2010; González-Vega, 2012), además del hecho de que sus rizomas tiene alto contenido de almidón resistente (Huang *et al.*, 2016).

En la década de los 70`s la diosgenina fue la única fuente para la producción de algunos fármacos (Palacios, 2010), para este año la demanda abarcaba, además de *D. composita* y *D. mexicana*, *D. floribunda* y *D. spiculiflora* (González-Leija, 1978). Entre 1940 y 1976, México se posicionó como el mayor productor de barbasco en el mundo, cubriendo la demanda de esteroides para la fabricación de más de 200 productos comerciales. Entre 1940 y 1945 cubrió el 80 % de la demanda mundial, entre 1945 y 1965 el 70 % y de 1965 a 1975 el 60 % (González-Leija, 1978; Marks, 1997; Palacios-Cortez, 2010).

El barbasco tiene gran importancia para la industria química, pero también para el ecosistema; su excesivo uso a nivel industrial llegó a poner en peligro su papel en el ecosistema haciendo necesario dar lugar a la regeneración de esta especie (Palacios-Cortez, 2010).

## 2.2 El barbasco como grupo de especies del género *Dioscorea*

En México se le denomina barbasco a un grupo especies vegetales, pertenecientes al género *Dioscorea* (Dioscoreaceae), las cuales son: *D. composita* (barbasco rojo), *D. floribunda* (barbasco amarillo) y *D. spiculiflora* (barbasco blanco). Estas han utilizado como materia prima en la industria de la producción de hormonas esteroideas sintéticas (González-Leija, 1978).

La familia Dioscoreaceae, conformada por 4 géneros (*Stenomeris*, *Tacca*, *Trichopus* y *Dioscorea*) se caracteriza por ser geófita perenne, herbácea, raramente arbustiva, a menudo trepadora. Tallos vasculares dispuestos en dos círculos, venación primaria pinnada o palmada, venación secundaria reticulada, rafidios presentes en órganos vegetativos, tricomas variables; simples o ramificados y uni o multicelulares. La polinización de esta familia no es muy conocida, probablemente se lleve cabo por insectos (Caddick *et al*, 2002). En la Tabla 1 se detalla la clasificación taxonómica del género *Dioscorea*.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del género *Dioscorea* (Caddick *et al.*, 2002)

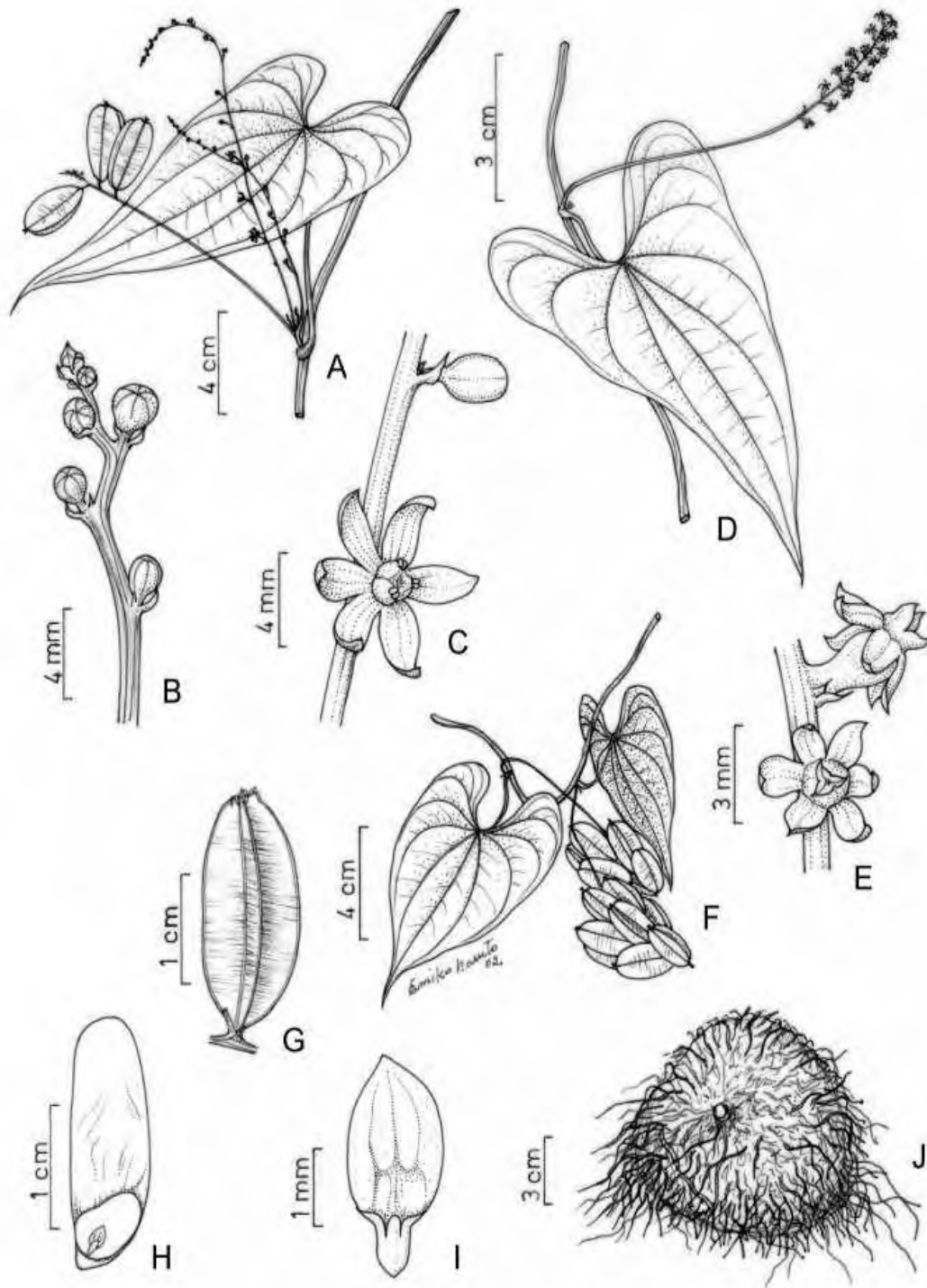
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Orden:</b>	Dioscoreales
<b>Familia:</b>	Dioscoreaceae
<b>Género:</b>	<i>Dioscorea</i>

El género *Dioscorea*, es un grupo de plantas monocotiledóneas perteneciente a la familia Dioscoreaceae, se encuentra conformado por alrededor de 600 especies, se caracteriza por tener partes subterráneas rizomatosas, frecuentemente cortas, tienden de uno a varios rizomas cubiertos con raíces finas y un velamen de una sola capa. Los tallos, anuales, son generalmente torcidos a la izquierda o derecha, con bulbos presentes en algunas especies, hojas opuestas o alternadas, enteras, lobuladas o divididas, venas que surgen en el punto de inserción de la cuchilla del peciolo. El peciolo generalmente se encuentra engrosado en la base y en el ápice. Son plantas dioicas, generalmente están presentes las partes reproductivas masculinas y femeninas (Caddick *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2013; Sosa *et al.*, 1987).

Presentan inflorescencias simples y compuestas, con flores masculinas solitarias o apareadas, a veces en cúmulos, en ocasiones ocultan el eje parcial de la inflorescencia y cuelgan de él. Las flores femeninas son solitarias o pareadas, colgantes al principio, frecuentemente ascendente a medida que maduran las cápsulas, generalmente con 3 a 6 estaminodios, con 2 óvulos por cúmulo. La fruta comúnmente es una cápsula de 3 alas, seca y dehiscente en la madurez, con 6 semillas usualmente, una endotesta cristalina y endospermo de paredes gruesas (Caddick *et al.*, 2002; González-Vega, 2012).

En la Figura 1 se muestra la morfología de una especie del género. La dispersión de semillas es comúnmente por el viento y su propagación puede darse por semillas, rizomas enteros o secciones de éstos y por estacas herbáceas (Sanchez-Cruz *et al.*, 2008).

Alrededor de 60 especies del género *Dioscorea* tienen un valor económico, de las cuales entre 14 y 25 son utilizadas en la alimentación, 6 tienen uso ornamental y 15 uso medicinal, dentro de éstas destacan 9 por su uso en la industria farmacéutica para la producción de hormonas (González-Vega, 2012; Saini *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Descripción botánica de una especie del género *Dioscorea*, A: rama con inflorescencias estaminadas, una de ellas parcialmente fructífera. B: racimo terminal con botones de flores estaminadas. C: flor estaminada. D: rama con inflorescencia pistilada. E: flores pistiladas. F: rama fructífera. G: fruto. H: semilla. I: embrión. J: rizoma (Xifreda y Kirizawa, 2003).

Las *Dioscoreas* se distribuyen generalmente en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo (Figura 2), habitando el suelo sombreado de los bosques hasta sus márgenes, con un centro de diversidad genética en el sureste de África, con máxima diversidad en climas estacionalmente húmedos (Caddick *et al.*, 2002). Se han cultivado a mayor escala en los países en desarrollo de los trópicos, como los pertenecientes a África, Asia, Oceanía y América, donde han tenido una gran importancia socio-económica (Girma *et al.*, 2017). Los cultivares con mayor superficie cultivada en los trópicos son: *D. alata*, *D. cayensis*, *D. vulvifera*, *D. trifida* y *D. esculenta* (Sanchez-Cruz *et al.*, 2008).

Las *Dioscoreas* representan la principal fuente de carbohidratos para algunos pueblos de África occidental y central, siendo el 4º cultivo de rizoma comestible más importante. En los pueblos indígenas de América tropical se han cultivado desde la época precolombina, constituyendo una importante fuente de empleo e ingresos en zonas rurales (González-Vega, 2012).



**Figura 2.** Distribución del género *Dioscorea* en el mundo (González-Vega, 2012)

En México, el género *Dioscorea* crece de forma silvestre o cultivada en zonas tropicales y ha sido explotado en los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco, Oaxaca y Puebla, con mayor producción en los acahuals (González-Leija, 1978). En el país se

pueden encontrar cerca de 70 a 100 especies de *Dioscorea* (Caddick *et al.*, 2002; González-Leija, 1978), entre las más representativas tenemos a: *D. composita* (centro y sur de México, excepto Península de Yucatán), *D. floribunda* (Puebla, Veracruz, Tabasco, Península de Yucatán, Guerrero, Campeche, Oaxaca y Chiapas), *D. spiculiflora* (Veracruz, Oaxaca, Campeche, Chiapas y Península de Yucatán), estas 3 especies son conocidas comúnmente como Barbasco (González-Leija, 1978; Sosa, Schubert y Gómez-Pompa, 1987), *D. mexicana*, conocida como cabeza de negro, (San Luis Potosí, Puebla, Veracruz, Península de Yucatán, Jalisco, Guerrero y Oaxaca), *D. bartlettii* (Tabasco, Chiapas y el sur de Veracruz), *D. bulbifera* (Veracruz), *D. convolvulacea* (Morelos, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Veracruz, Chiapas y Península de Yucatán), *D. orizabensis* (Veracruz), *D. pallens* (Veracruz y Puebla), *D. pilosiuscula* (Veracruz, Chiapas y Península de Yucatán), *D. polygonoides* (Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Veracruz y Península de Yucatán), *D. urophylla* (Veracruz y Oaxaca) (Sosa, Schubert y Gómez-Pompa, 1987), *D. dodecasemina* (Yucatán), *D. juxtlahuacensis* (Oaxaca), *D. longirhiza* (Guerrero), *D. toluicana* (Estado de México) (Caddick *et al.*, 2002).

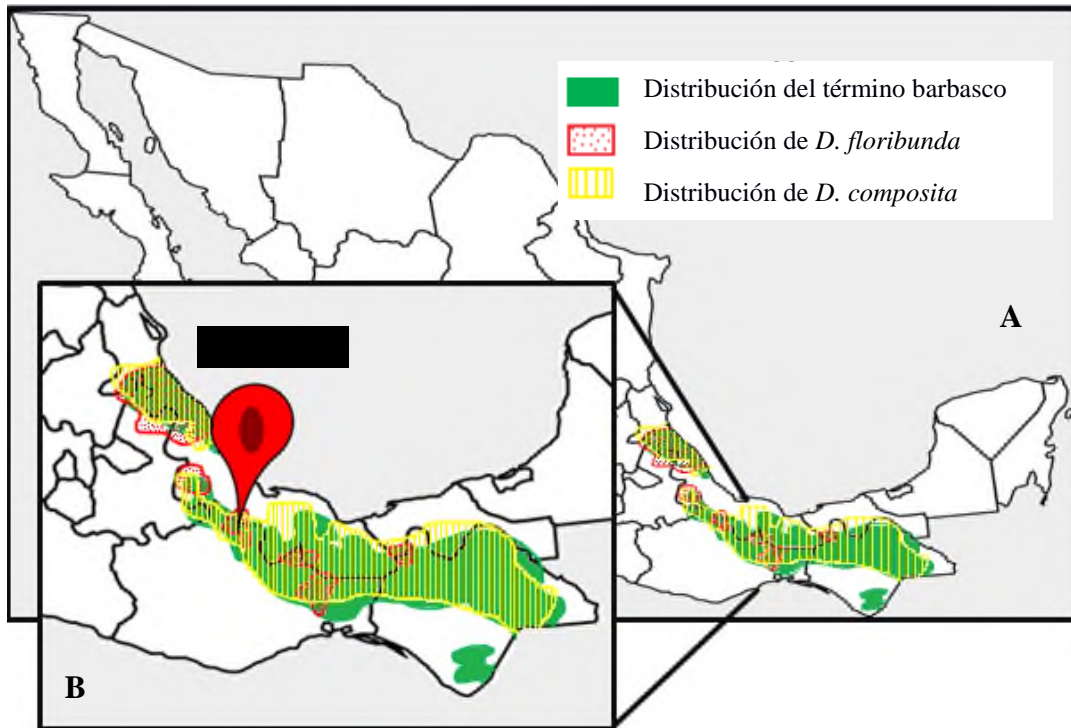
El término barbasco está asociado a 3 especies: *D. composita*, *D. floribunda* y *D. spiculiflora*, cuya distribución se marca en la Figura 3.

Las *Dioscoreas* al ser plantas dioicas presentan poca posibilidad de que las semillas sean fértiles, además de presentar bajas tasas de floración y germinación. Se ha intentado la propagación de esquejes logrando solamente un 30% de éxito.

### 2.3 Manejo y problemática

El método tradicional de propagación de *Dioscoreas* es por fragmentación de rizomas, y es el método utilizado, pero sigue siendo lento e ineficaz para la multiplicación a gran escala de clones, ya que un rizoma de *Dioscorea* solo puede producir como máximo 24 rizomas, a su vez aumentan los riesgos de transferencia y diseminación de enfermedades a la siguiente generación, y se sabe que el ataque de nemátodos y virus

reduce radicalmente el rendimiento del rizoma. (Forsyth y Van Staden, 1981; Hata *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2014; Samy *et al.*, 2017; Seal y Muller, 2007; Yan *et al.*, 2011). Los rizomas pueden ser recolectados a partir de los 7-10 meses alcanzando un peso promedio de 3 a 5 kg en algunas especies (Sanchez-Cruz, Fernandez-Cardona y Esteban-Garcia, 2008).



**Figura 3.** A) Distribución del término barbasco en México y especies denominadas con ese término, exceptuando *D. spiculiflora* B) ubicación geográfica de la Cuenca del Papaloapan (modificado de González Leija, 1978).

Otra de las desventajas del cultivo tradicional es que la morfología general del género presenta gran variabilidad dependiendo de la altitud, clima, tipo de suelo, también si son plantas cultivadas o silvestres, lo cual puede llevar a la variación en el contenido y el rendimiento de diosgenina (González-Leija, 1978).

A pesar de que la producción agrícola mundial de *Dioscorea* alcanzó un 40% de incremento entre 1961 y 1999, las plantas silvestres de *Dioscorea* tienden a desaparecer debido a su uso como alimento básico y como materia prima para la extracción de diosgenina. También se debe tener en cuenta que el manejo agrícola de las variedades

cultivadas es muy rudimentario. Las *Dioscoreas* requieren de un soporte para crecer, por ello muchas veces se les encuentra en cultivos de importancia comercial como cacao, limón, café, entre otros (Esteban *et al.*, 2008; González-Vega, 2012).

## 2.4 Cultivo de tejidos vegetales

La propagación *in vitro* podría ayudar a superar estas limitaciones de disponibilidad de material homogéneo de alta calidad y libre de enfermedades para la siembra o la obtención de diosgenina (Kumar *et al.*, 2017).

La propagación convencional de *Dioscorea* no garantiza la calidad fisiológica, sanitaria y/o genética en grandes volúmenes de producción y en cortos periodos de tiempo, para lo cual la micropropagación a través del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales representa una solución viable (González-Vega, 2012).

La micropropagación tiene amplias ventajas como puede ser la conservación de genotipos a través de bancos de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, la obtención de biomasa durante todo el año con altas tasas de crecimiento y material vegetal libre de enfermedades (Behera *et al.*, 2009). Además el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales representa una alternativa para la producción de metabolitos secundarios, una de sus ventajas más importantes es la no dependencia de la geografía, de las estaciones o de las condiciones ambientales (Agrawal *et al.*, 2017; Nunez-Palenius *et al.*, 2005).

En la producción de metabolitos secundarios existen diversos problemas, pero a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales, en algunos casos, se ha podido incrementar su producción eligiendo genéticamente líneas de alta productividad, o bien, optimizando las condiciones físicas y químicas del cultivo (Piñol, 1999). Una de las aplicaciones del cultivo *in vitro* es la transformación genética, tanto por métodos físicos como por métodos biológicos, como estrategia para la producción de metabolitos de interés. El cultivo *in vitro* puede tener las variantes que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación de los cultivos *in vitro*

<b>Cultivo de plantas completas</b>	Semillas Embriones cigóticos
<b>Cultivo de órganos</b>	Rizomas Tubérculos Raíces Yemas Hojas Tallos Verticilos florales
<b>Cultivo de tejidos o segmentos de órganos</b>	Meristemos Tejidos secundarios
<b>Cultivo de células</b>	Células gaméticas Células somáticas Protoplastos

( Agrawal *et al.*, 2017; Pérez-Molphe-Balch, 2009)

La morfogénesis *in vitro* de las plantas, es decir, la formación de órganos y tejidos de *novo*, varía en respuesta a diferentes estímulos externos como pueden ser; el balance hormonal (reguladores de crecimiento), la disponibilidad de agua y otros nutrientes, estímulos físicos como la calidad y cantidad de luz, pH, entre otros y de estímulos internos como la concentración de fitohormonas endógenas y el genotipo (Pérez-Molphe-Balch, 2009).

Las auxinas son un grupo de reguladores de crecimiento implicadas en muchos aspectos del crecimiento de las plantas, se producen en bajas concentraciones en tejidos vegetales. La auxina encontrada en mayores concentraciones en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA), sin embargo, también es posible encontrar, a menores concentraciones, ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-AIA), ácido fenilacético (APA) y ácido indol butírico (AIB) de manera natural en algunas plantas (Ludwig-müller y Cohen, 2002).

Las auxinas son capaces de regular genes que participan en el ciclo celular, afectando la morfogénesis de las plantas, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y promoviendo la generación de raíces laterales (Han *et al.*, 2012). El AIA es la auxina natural más abundante, sin embargo, para el cultivo de tejidos se prefiere el uso de AIB y el ácido naftalenacético (ANA), sintéticos. Se ha demostrado que cuando se suministra AIB a explantes se promueve eficazmente la generación de raíces adventicias, teniendo un buen transporte en el sistema vascular (Martínez-DelaCruz *et al.*, 2015).

#### **2.4.1 Cultivo *in vitro* de *Dioscorea***

Existen reportes de que los cultivo *in vitro* de especies del género *Dioscorea* proporcionan una manera fácil y rápida para la multiplicación masiva de plantas. En 1975 se realizó por primera vez el cultivo *in vitro* de una especie del género *Dioscorea*, el cual consistió en propagar *D. floribunda* a partir de segmentos nodales (Chaturvedi, 1975), para 1981 se obtuvieron brotes a partir de segmentos nodales de *D. bulbifera* (Forsyth y Van Staden, 1981). A partir de ahí se han realizado cultivos *in vitro* de plantas del género *Dioscorea* mediante el uso de segmentos nodales, bulbos, meristemos, en diversas especies como: *D. floribunda*, *D. bulbifera*, *D. composita*, *D. alata*, *D. batatas*, *D. abyssinica*, *D. oppositifolia*, entre otros. En la Tabla 3 se resumen algunos de los reportes de cultivo *in vitro* de *Dioscoreas*.

Los cultivos de callos y cultivos de células en suspensión derivadas de *D. deltoidea* pueden acumular diosgenina en un nivel muy cercano o igual a 1% del peso seco (Reinert, y Yoeman, 1992).

**Tabla 3.** Respuestas a diferentes cultivos *in vitro* de *Dioscorea*

<b>Especie</b>	<b>Medio</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Autor</b>
<i>D. floribunda</i>	MS + 2 mg/L BAP	Brotes	(Chaturvedi, 1975)
<i>D. floribunda</i>	MS + 0.5 mg/L ANA	Raíz	(Chaturvedi, 1975)
<i>D. composita</i>	MS + 80 mg/L de sacarosa.	Micro tubérculo	(Alizadeh <i>et al.</i> , 1998)
<i>D. composita</i>	MS + 1.5 mg/L adenina	Micro tubérculo	(Alizadeh <i>et al.</i> , 1998)
<i>D. composita</i>	MS + 1 mg/L IBA	Micro tubérculo	(Alizadeh <i>et al.</i> , 1998)
<i>D. oppositifolia</i>	MS + 0.5 mg/L Kn MS + 0.5-1.7 mg/L BAP	Brotes	(Poornima y Ravishankar, 2007)
<i>D. Oppositifolia</i>	MS + 0-1 mg/L ANA	Raíz	(Poornima y Ravishankar, 2007)
<i>D. oppositifolia</i>	MS + 30 g sacarosa	Micro-tubérculo	(Poornima y Ravishankar, 2008)
<i>D. pentaphylla</i>	MS + 0.5-0.75 mg/L Kn MS + 0.5-1.75 mg/L BAP	Brotes	(Poornima y Ravishankar, 2007)
<i>D. pentaphylla</i>	MS + 0-0.5 mg/L ANA	Raíz	(Poornima y Ravishankar, 2007)
<i>D. pentaphylla</i>	MS + 30 g sacarosa	Micro-tubérculo	(Poornima y Ravishankar, 2009)
<i>D. opposita</i>	MS + 30 mg/L sacarosa + 2.0 mg/L Kn + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L ANA	Micro-tubérculo	(Behera <i>et al.</i> , 2009)
<i>D. oppositifolia</i>	MS + 2 mg/L Kn + 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L ANA + 100mg/L ác. Ascórbico	Brotes	(Behera <i>et al.</i> , 2009)
<i>D. oppositifolia</i>	MS 0.5X + 2 mg/L ANA	Raíz y Micro-tubérculo	(Behera <i>et al.</i> , 2009)
<i>D. wightii</i>	0.25 mg/L BA, 0.25-0.75 mg/L Kn, 0.2-0.6 mg/L 2iP	Callo	(Mahesh <i>et al.</i> , 2010)
<i>D. fordii</i>	MS + 1.0 mg/L BA, 0.1 mg/L ANA,	brotes	(Yan <i>et al.</i> , 2011)

**Tabla 3.** Respuestas a diferentes cultivos *in vitro* de *Dioscorea* (continuación).

<b>Especie</b>	<b>Medio</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Autor</b>
<i>D. fordii</i>	MS+ 30 g/L sacarosa, MS + 5 mg/L ANA	Micro tubérculo	(Yan <i>et al.</i> , 2011)
<i>D. bulbifera</i>	MS + 0.5 mg/L ANA + 5 mg/L Kn	Brotes	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. bulbifera</i>	MS + 2-8 % sacarosa + 5-10 mg/L Kn	Micro tubérculo	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. composita</i>	MS + 5 mg/L Kn	Micro tubérculo	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. japonica</i>	LS + 0.5 mg/L BA	Brotes	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. opposita</i>	MS+ 1.0 mg/L ANA + 0.5-1.0 mg/L BA	Brotes	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. opposita</i>	MS + 3 % sacarosa + 2 mg/L BAP	Micro tubérculo	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. oppositifolia</i>	MS + 2 mg/L BAP + 0.3% carbón activado	Brotes	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. zingiberensis</i>	MS + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L ANA	Brotes	(Das <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. Alata</i>	MS + 2.5 mg/L ANA	Callo	(Kumar <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. alata</i>	MS + 2.5 mg/L ANA +0.5 mg/L AIB	Raíz	(Kumar <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. alata</i>	MS + 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L ANA	Brotes	(Kumar <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. opposita</i>	MS + 60 g/L sacarosa	Micro tubérculo	(Li <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. alata</i>	MS + 1 mg/L 2,4-D	Callo	(Samy <i>et al.</i> , 2017)

## 2.5 Metabolitos secundarios

Las plantas elaboran y acumulan sustancias o compuestos biológicamente activos en sus tejidos que son importantes desde varios puntos de vista, muchos poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de medicamentos, ya que tienen diferentes estructuras químicas y propiedades preventivas de protección a enfermedades (Itokawa *et al.*, 2008; Valencia-Ortiz, 1995). Casi el 50 % de los medicamentos utilizados en la medicina son de origen vegetal, y sólo una pequeña fracción de las plantas con actividad medicinal han sido estudiadas (Peteros y Uy, 2010).

Los metabolitos secundarios son moléculas implicadas en el metabolismo secundario generadas como respuesta a estrés de origen biótico y abiótico. Dicho estrés puede ser provocado por la limitación de nutrientes, ataque de fitopatógenos, exposición a la radiación solar, debido a la diferenciación celular o a moléculas reguladoras, etc. (Cannell, 1998).

Los principales componentes resultado del metabolismo secundario pueden clasificarse como (Kuklinski, 2003):

- a) Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos.
- b) Derivados fenólicos: fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos, quinonas, antracenosídeos.
- c) Alcaloides.

Las especies del género *Dioscorea* poseen metabolitos secundarios con efectos medicinales como antitrombóticos, anticancerígenos, y algunos asociados a la gastritis. De este género se pueden aislar saponinas, alcaloides y compuestos para la obtención de plástico, entre otros (Bonilla-morales y Hernández-castañeda, 2012).

Las saponinas son heterósidos formados por una parte glucídica (azúcar) más una parte no glucídica (aglicona) (Kuklinski, 2003). Se encuentran en diversas plantas, son

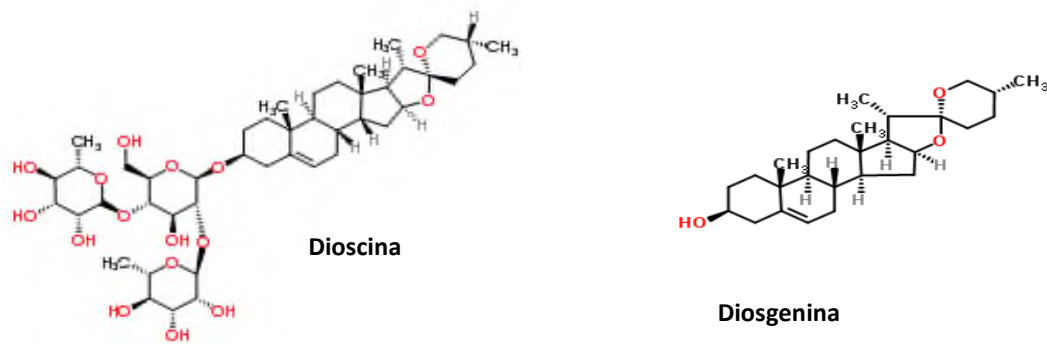
solubles en agua y al ser agitados en solución acuosa producen espuma, generalmente se encuentran asociados a raíces y son de fácil extracción alcohólica o acuosa, además pueden ser utilizados como precursores de hormonas esteroidales. Las saponinas tienen una gran diversidad estructural y una amplia gama de propiedades biológicas, participando en mecanismos de defensa, protección e interacciones ambientales (Ciura *et al.*, 2017).

Las saponinas esteroidales son los principales metabolitos secundarios presentes en los rizomas del género *Dioscorea*, entre las más comunes se encuentra la dioscina que al hidrolizarse libera una o más moléculas de azúcar y un aglicón conocido como sapogenina (Hata *et al.*, 2003). Las sapogeninas más abundantes en la naturaleza son; diosgenina, yamogenina, tigogenina, smilagenina y sarsapogenina (Hinke, 2008; Myszka *et al.*, 2017). El género *Dioscorea* representa una buena fuente de sapogeninas, debido a que sus rizomas pueden acumular entre el 3 y el 5% (Kuklinski, 2000; Maldonado *et al.*, 2012).

## 2.6 Biosíntesis e importancia de la diosgenina

La diosgenina (Figura 4) es una aglicona de la saponina esteroideal dioscina, que está presente de manera natural en el género *Dioscorea* y es una de las principales materias primas en la industria para la producción de fármacos esteroidales (Son *et al.*, 2007).

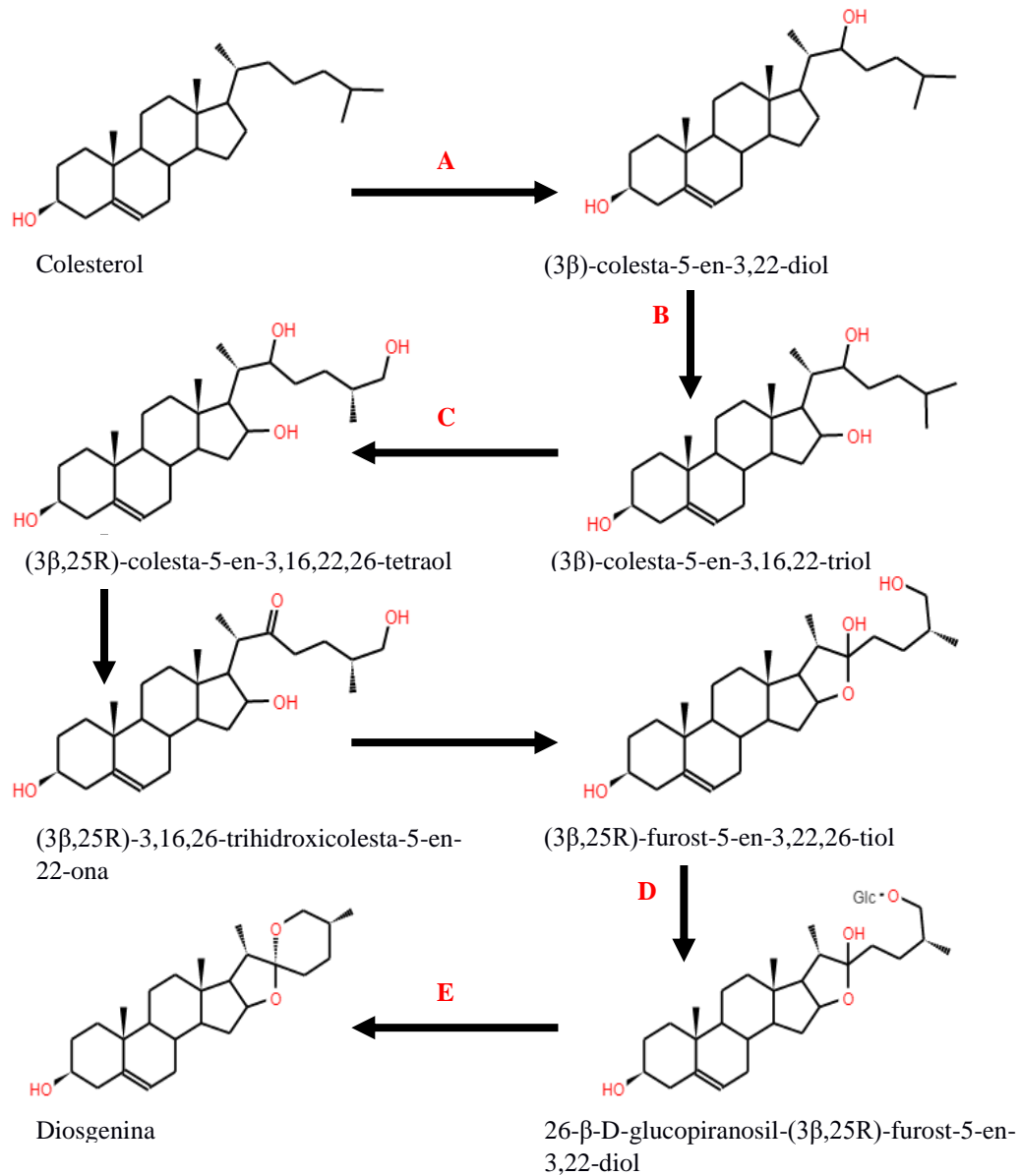
Ciura *et al.*, (2017) propusieron la ruta para la biosíntesis de diosgenina (Figura 5) a partir del colesterol. La estructura terpenica principal del colesterol es sintetizada a partir de mevalonato. La hidroxilación del C-22 del colesterol es catalizada por la esteroide-22a-hidroxilasa. Una monooxigenasa participa en la hidroxilación de C-16, y los citocromos CYP18A1 / CYP734A1 catalizan la hidroxilación de C-26. Las dos últimas etapas implican el cierre del anillo F y la formación del espirocetal. Primero, la glicosilación de C-26 es catalizada por UDP-glucosiltransferasa (UGT), y luego la molécula de glucosa es eliminada por la  $\beta$ -glucosidasa para formar un anillo espiro de diosgenina (Ciura *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Estructuras químicas de la saponina (dioscina) y la sapogenina (diosgenina). Imágenes tomadas de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure>

La diosgenina tiene un efecto hipocolesterolemico, por supresión de la absorción del colesterol e incrementando la secreción de colesterol (Son *et al.*, 2007), también tiene efectos favorables en el tratamiento de la diabetes *mellitus* y la regulación del metabolismo de lípidos (Wang *et al.*, 2014; Wang, Shi y Wang, 2018), aumenta los niveles de estrógenos en la sangre, ayuda a la regulación menstrual, cólicos biliares, en el tratamiento de dolores neurálgicos, bronquitis espástica, tosferina, trastornos hepáticos, reumatismo (Hata *et al.*, 2003). También reduce las placas amiloides en el Alzheimer, mejora la secreción de colágeno, y presenta actividad anticancerígena (Bhuvanalakshmi *et al.*, 2017; Chiang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014) además de mostrar propiedades hipolipidémicas, hipoglucémicas, antioxidantes, antiinflamatorias (Kim y Park, 2018).

Hasta los años 50 la obtención de hormonas para el comercio era a partir de órganos y productos animales era sumamente complicada (ovarios de puerco para progesterona, testículos de toro para testosterona y orina de caballo para estrona), además de las grandes cantidades de materia prima necesaria y los altos costos de producción. La diosgenina fue descubierta en 1936 por Fujii y Matsukawa, pero fue hasta 1943 que se descubrió el potencial de las sapogeninas, presentes en *Dioscorea*, para la semi-síntesis de hormonas, cuando Russell Merker sintetizó progesterona a partir de diosgenina (González-Leija, 1978; Hinke, 1997; Maldonado-García *et al.*, 2012).



**Figura 5.** Ruta biosintética de la diosgenina. En esta ruta la diosgenina se crea a partir del colesterol. A) esteroide-22a-hidroxilasa, B) monooxigenasa, C) citocromos CYP18A1 / CYP734A1, D) UDP-glucosiltransferasa (UGT) y E) β-glucosidasa. Ciura *et al*, (2017)

El investigador estadounidense, Marker, aisló sapogenina primeramente a partir de un extracto de *D. tukamoro* transformándola en pregnenolona, a través de un proceso conocido como “Degradación de Marker” (Marker *et al.*, 1940). Este proceso constituyó toda una revolución en la síntesis orgánica de hormonas esteroidales y disminuyó drásticamente el costo de la progesterona. Marker llega a México en 1941 en busca de una especie de *Dioscorea* que crecía en Veracruz, conocido como “cabeza de negro” (*D. mexicana*). Posteriormente, colectó otra especie denominada barbasco (*D. composita*), de mayor importancia comercial por su mayor contenido en diosgenina (Olivares, 2001).

Marker hizo posible la producción barata de hormonas sexuales gracias al barbasco, que contiene grandes cantidades de dioscina (Hinke, 2008). A partir de esto, se desarrolló en México una gran industria química que, en un principio se sostenía a partir de rizomas de *D. mexicana*, pero para 1949 la especie más demandada era *D. composita*.

Las hormonas esteroidales poseen una estructura química bastante compleja, lo cual hace de su síntesis química un proceso difícil y poco rentable, por lo que el camino más viable para su obtención es la semisíntesis a partir de sapogeninas esteroidales (Hata *et al.*, 2003). A partir del descubrimiento de Marker, de la degradación de la cadena lateral de sapogeninas, se obtuvo una fuente barata de precursores para la síntesis de esteroides a partir de diosgenina (Barredo y Herraiz, 2017).

México lideró la industria de la extracción de diosgenina hasta el momento en que compañías chinas se introdujeron en el mercado de los esteroides (Barredo y Herraiz, 2017). Actualmente, China se dedica a exportar grandes cantidades de diosgenina ya que han descubierto diversas sapogeninas, que manejan diferente especificidad para la producción de múltiples fármacos. México pasó de ser exportador mundial de hormonas a ser importador en el momento que la industria farmacéutica retiró sus inversiones y se perdieron las vías de comercialización de esta planta mexicana (Palacios-Cortez, 2010).

## 2.7 Obtención de diosgenina en diversos cultivos vegetales

La diosgenina es un metabolito presente en especies de plantas como: *Solanun xanthocarpum* (Sato y Latham, 1953), especies del género *Dioscorea*, *Xmilax aspera* (Marker, Tsumamoto y Turner, 1940) *Agave cupreata*, *A. inaequidens*, *A. hookeri* (Figueredo-Urbina, Casas *et al.*, 2018), *Costus speciosus*, *Smilax menispermoidea*, *Trigonella foenum*, *Helicteres isora* (Deshpande y Bhalsing, 2014; Kim y Park, 2018).

En 1940, Marker y colaboradores, aislaron diosgenina y sarsasapogenina a partir de *D. tokoro* y *Xmilax aspera* (zarzaparrilla) respectivamente, con los cuales pudieron sintetizar progesterona (Marker, Tsumamoto y Turner, 1940), con ello la diosgenina se convirtió en un importante precursor natural de hormonas esteroidales en la industria farmacéutica (Dong *et al.*, 2015; Kim y Park, 2018), es precursor de prednisona, prednisolona, dexametasona, betametasona, hidrocortisona, metilprednisolona (Barredo y Herraiz, 2017) y pregnenolona, la cual se puede transformar en progesterona, que permite obtener andrógenos y estrógenos (estradiol) (Kuklinski, 2003).

La diosgenina se puede obtener a partir de *Dioscorea* realizando una extracción acuosa, obteniendo heterósidos que al someterse a una hidrólisis ácida permitirá separar los azúcares de agliconas (Kuklinski, 2003; Rothrock *et al.*, 1957). Con este fin, los rizomas son fragmentados, fermentados o hidrolizados directamente para obtener diosgenina (Espejo *et al.*, 1982) y con ayuda de *Rhizopus arrhizus* y *R. nigricus*, se puede llevar a cabo una transformación microbiológica, transformando la progesterona en 11- $\alpha$ -OH-progesterona con la cual se puede obtener hidrocortisona para posteriormente transformarla en cortisona. También por vía microbiológica es posible transformar la hidrocortisona o cortisona en prednisolona, un derivado más potente (Kuklinski, 2003). Algunos estudios muestran que el proceso de fermentación de rizomas no incrementa realmente el contenido de diosgenina en comparación con la

hidrólisis ácida, pero se prefiere por ser un proceso más económico, a pesar de ser más lento (Segura-Gomez y Carrizales-Navarrete, 1983; Cheng *et al.*, 2015).

Se ha reportado que el rendimiento de la fermentación es muy bajo, ya que la conversión es solo de alrededor del 50%, sin embargo el rendimiento final de un proceso combinado de fermentación e hidrólisis es superior al 88% (Barredo y Herraiz, 2017).

Cheng *et al.* (2016) utilizaron *D. zingiberensis* debido a su alta concentración de saponinas, para transformar dioscina en diosgenina, realizando una transformación microbiana con un cultivo mixto, utilizando *Trichoderma reesei* y *Aspergillus fumigatus*, obteniendo la concentración más alta de 0.028g/g de diosgenina (Cheng *et al.*, 2015).

La diosgenina se obtiene comercialmente a partir de *Dioscorea* y es precursor de muchos esteroides con actividad farmacológica (Maldonado-García *et al.*, 2012). Es uno de los principales precursores de compuestos esteroidales usados en la síntesis de anticonceptivos orales, hormonas sexuales y otros esteroides de la industria farmacéutica (Cheng *et al.*, 2016). A partir de 30 kg de rizoma de *D. composita* se puede obtener 250 g de diosgenina, con lo cual se pueden producir 60 g de cortisona (Kuklinski, 2003).

Se han reportado diferentes concentraciones de diosgenina en diferentes especies entre ellas las del género *Dioscorea*, en la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos. Los rendimientos y purezas de diosgenina pueden variar en una misma especie de acuerdo a diversos factores de su ecología (González-Leija, 1978).

**Tabla 4.** Concentración de diosgenina en diferentes especies vegetales

<b>Especie</b>	<b>Concentración (mg/g)</b>	<b>Material biológico</b>	<b>Autor</b>
<i>D. composita</i>	57.4-58.2	Raíz	(Lopez-Sanchez <i>et al.</i> , 1972)
<i>D. composita</i>	130	Rizoma	(González-Leija, 1978)
<i>D. floribunda</i>	2-100	Rizoma	(González-Leija, 1978)
<i>D. spiculiflora</i>	7-15	Rizoma	(González-Leija, 1978)
<i>D. composita</i>	2-5.7	Rizomas fermentados	(Segura-Gomez y Carrizales-Navarrete, 1983)
<i>D. deltoidea</i>	10	Callos	(Reinert, y Yoeman, 1992)
<i>T. foenum-graecon</i>	0.4	Raíces transformadas	(Merkli <i>et al.</i> , 1997)
<i>T. foenum-graecon</i>	0.24	Raíces	(Merkli, Christen y Kapetanidis, 1997)
<i>T. foenum-graecon</i>	2.2	Callos	(Oncina <i>et al.</i> , 2000)
<i>C. speciosus</i>	NR	Callos	(Singh <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. pictus</i>	25.4	Rizomas	(Singh, Gautam y Vimala, 2013)
<i>D. zingiberensis</i>	8.67	Rizoma	(Yi <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. zingiberensis</i>	19.52	Rizoma	(Yi <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. septemloba</i>	0.78	Rizoma	(Yi <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. septemloba</i>	1.18	Rizoma	(Yi <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. colletii</i>	13.19	Rizoma	(Yi <i>et al.</i> , 2014)
<i>D. zingiberensis</i>	28	Rizomas fermentados	(Cheng <i>et al.</i> , 2016)

NR: No reportado. *D.*: *Dioscorea*; *T.*: *Trigonella*; *C.*: *Costus*

## 2.8 Transformación genética de plantas

La exitosa transferencia de genes en plantas se ha realizado desde hace más de 30 años como una valiosa herramienta para estudiar la fisiología vegetal, para el desarrollo de nuevas variedades y para la producción de metabolitos, entre otros (Martinez *et al.*, 2004). La ingeniería genética de plantas proporciona una vía para la manipulación genética de estas. Existen dos métodos de transformación: los físicos y los biológicos los métodos biológicos se basan en el uso de la bacteria fitopatógeno *Agrobacterium* como vehículo que transporta ADN foráneo y lo integra en el genoma de las células vegetales (sistemas T-ADN). Los métodos físicos se basan en la integración del ADN foráneo mediante una gama de recursos, como la biobalística, el uso de compuestos como el polietilenglicol o la electroporación (Herrera-Estrella *et al.*, 1997; Gulnar-Asybaeva *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2017).

### 2.8.1 *Agrobacterium rhizogenes*

*Agrobacterium rhizogenes* (o *Rhizobium rhizogenes*) es una bacteria gram negativa transmitida por el suelo a las plantas, capaz de infectarlas cuando sufren heridas. Contiene un plásmido inductor de raíz (Ri), que contiene un ADN de transferencia que codifica los loci de genes del locus de la raíz (rolA, rolB, rolC y rolD). Es capaz de inducir la producción de raíces pilosas altamente ramificadas en la superficie de los explantes infectados. Estas raíces pueden mantenerse en cultivo sin la necesidad de agregar hormonas al medio. Las raíces pilosas se han utilizado para varios propósitos, como en la producción de proteínas recombinantes, en la ingeniería metabólica y en análisis fisiológico, entre otros (Ron *et al.*, 2014; Nester, 2015; Chen *et al.*, 2017).

Durante el proceso de infección, un segmento del plásmido Ri, denominado T-ADN, se exporta desde *Agrobacterium* al núcleo de la célula vegetal donde se integra en el ADN cromosómico y se expresa, este es un proceso de transformación genética estable. La transformación de células vegetales da como resultado una producción elevada de

hormonas (auxinas) y desencadenan una proliferación que conduce a un enraizamiento anormal (Chilton *et al.*, 1982; Tzfira y Citovsky, 2008).

Diversos estudios muestran varios avances y ventajas del cultivo de raíces transformadas, incluyendo sus altas tasas de crecimiento en medios libres de hormonas, estabilidad genética y biosintética. Estos cultivos pueden producir niveles más altos de metabolitos secundarios o cantidades comparables a las de las plantas intactas. Los cultivos de raíz pilosa ofrecen una promesa para la producción de metabolitos secundarios valiosos en muchas plantas (Bathoju *et al.*, 2017; Giri y Narasu, 2000; Hanafy *et al.*, 2018).

El rango de hospederos de *Agrobacterium* está determinado por los genes de patogenicidad bacteriana y oncogenes del T-ADN y a la susceptibilidad de la planta determinada por el tipo de tejido y el estado fisiológico, entre otros. Las monocotiledóneas se conocen como no hospederas de *Agrobacterium*, pero las células meristemáticas de varias monocotiledóneas se han transformado con éxito en condiciones de laboratorio, como *Oriza sativa* (arroz) y *Zea mays* (maíz). La diversidad genética del patógeno y sus huéspedes potenciales da como resultado patrones de rango de hospedadores diferentes (Tzfira y Citovsky, 2008).

La transformación de plantas mediada por *A. rhizogenes* ha sido posible generalmente en plantas dicotiledóneas, por ejemplo: *Glycine max* (soya), *Capsicum annum* (pimiento), *Lotus corniculatus* (zapaticos de la virgen), *Prunus spp.* (árbol frutal), *Pisum sativum* (chícharo), *Catharanthus roseus* (vinca de Madagascar), *Nicotiana glauca* (gandul), *Ophiorrhiza pumila*, entre otros (Ron *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017).

### 2.8.2 Genes reporteros

En los organismos genéticamente modificados comúnmente se incorpora al genoma, junto con el gen de interés, un gen reportero para identificar la regulación

transcripcional éste. Los genes reporteros se generan fusionando un promotor regulador de un gen de interés con el gen de una proteína fácilmente detectable, o de una enzima capaz de generar un contraste detectable tras la reacción con un sustrato administrado exógenamente. Existen dos mecanismos para la visualización de los genes reporteros: a) detección de una señal endógena del reportero: por ejemplo, expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) o b) detección de la señal tras la administración exógena: por ejemplo, expresión de una enzima (luciferasa o  $\beta$ -galactosidasa) y administración exógena del sustrato, de modo que para producir un producto de reacción detectable.

La  $\beta$ -glucuronidasa hidroliza  $\beta$ -glucurónidos, en presencia del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Glu), forma un compuesto de color azul. Jefferson *et al.*, (1987) propusieron la estrategia de localización de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en plantas transgénicas portadoras del gen reportero *gusA* de *Escherichia coli*. El análisis histoquímico se ha usado para demostrar la localización de la actividad del gen en células y tejidos de plantas transformadas. La expresión de GUS puede medirse con precisión usando ensayos fluorométricos con cantidades muy pequeñas de tejido vegetal transformado, es muy estable y los extractos de tejido continúan mostrando altos niveles de actividad GUS aún después de un almacenamiento prolongado (Jefferson *et al.*, 1987).

### **1.8.3 Transformación genética en *Dioscorea***

El primer antecedente que se tiene de transformación genética de alguna especie del género *Dioscorea* mediada por *Agrobacterium* se llevó a cabo en 2012 utilizando callos *in vitro* de *D. zingiberensis* mediada por *A. tumefaciens*, obteniendo una eficiencia de transformación del 6 % (Shi, Fan, Hu, Luo, y Yao, 2012). Poco después se realizó la transformación genética de *D. rotundata* mediada por *Agrobacterium* usando brotes axilares como explantes. Se confirmó la transformación exitosa por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por Southern blot y por ensayo histoquímico GUS, obteniendo una frecuencia de transformación del 9.4 al 18.2 %. Desde la transformación hasta la generación de una planta completa pasaron entre 3 y 4 meses.

Cabe señalar que *D. rotundata* tiene una importancia alimenticia y su transformación genética fue enfocada hacia la mejora del cultivo, y no enfocado a la producción de metabolitos secundarios (Nyaboga, Tripathi, Manoharan, y Tripathi, 2014). Bathoju, Rao, y Giri, 2017 realizaron una transformación genética de *Chlorophytum borivillianum* via *A. rhizogenes* cepa MTCC 2364 para una mayor producción de saponinas (estigmasterol y hecogenina), en la que obtuvieron una frecuencia de transformación del 98% con concentraciones de estigmasterol 23 veces mayor y el doble de ecogenina (Bathoju *et al.*, 2017).

También se ha realizado la transformación de *Helicteres isora* L. mediada por *A. rhizogenes* para evaluar la producción de diosgenina en comparación con las semillas silvestres. El contenido de diosgenina se midió por HPLC en muestras de semillas silvestres (127µg/L), en callos (633µg/L), y en raíces transformadas (1043µg/L) (V. Kumar, Desai, y Shriram, 2014). Se ha reportado el establecimiento *in vitro* de raíces pilosas de *Trigonella foenum-graecon* L con la cepa A4 de *A. rhizogenes* para incrementar el contenido de diosgenina en extractos de raíces liofilizadas, determinado por HPLC (Merkli *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta la fecha no se cuenta con antecedentes de la estrategia de transformación genética de especies del género *Dioscorea* mediada por *A. rhizogenes* para la obtención de diosgenina.

### III. JUSTIFICACIÓN

La demanda de productos obtenidos de plantas aumenta cada día que pasa debido al aumento de la población, y que las fuentes silvestres son cada vez más escasas, debido, en muchos casos, a la biología de éstas, por lo que se deben desarrollar alternativas para la producción de metabolitos de interés que eviten la merma de las poblaciones silvestres.

Se estima que para 2020 aumentará la demanda de *Dioscorea* para uso alimenticio, tanto humano como animal, para la producción de almidón y para uso industrial (González-Vega, 2012). Sin embargo, el consumo de *Dioscorea* para fines alimenticios y en la industria farmacéutica está limitado debido a diversos factores como son el largo ciclo de vida, los largos periodos de cultivo en campo necesarios para acumular niveles altos de diosgenina, problemas fitosanitarios y el casi nulo implemento de tecnología, entre otros.

El cultivo de tejidos vegetales, junto con la ingeniería genética, son un conjunto de técnicas que en casos exitosos representan una alternativa viable para la producción de metabolitos secundarios de interés.

El aumento en la demanda de rizomas de *Dioscorea* en la industria farmacéutica, hace necesario el uso de estas técnicas biotecnológicas para la producción de diosgenina, en especial, a partir de especies mexicanas, y que éstas recuperen la industria de *Dioscorea* en México.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los cultivos *in vitro* de *Dioscorea sp.*, son susceptibles a la rizogénesis inducida por AIB y a la transformación vía *A. rhizogenes*, y estas raíces acumularán diosgenina en concentraciones similares a las raíces en estado silvestre.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

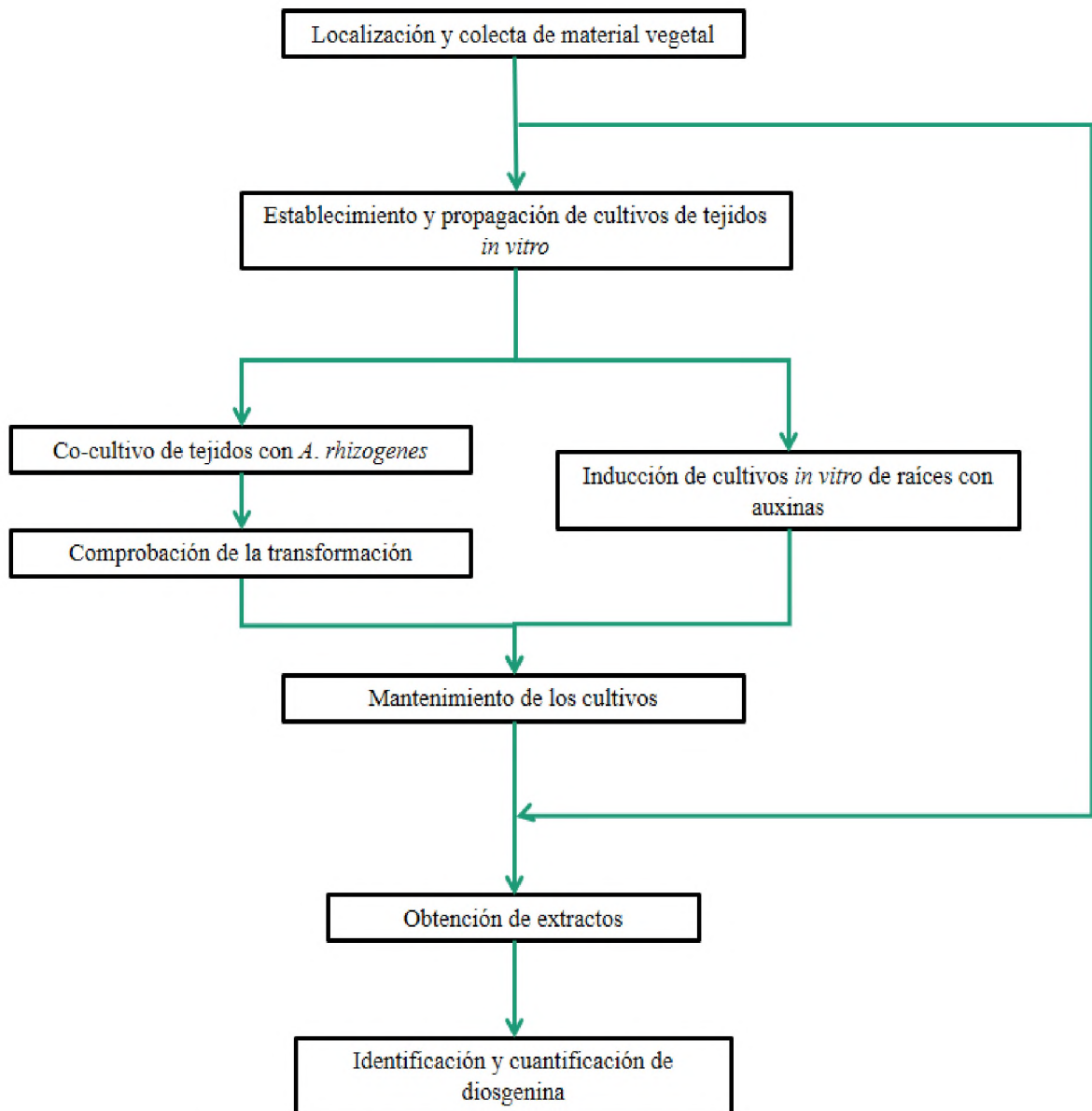
Identificar y cuantificar diosgenina a partir de cultivos *in vitro* de raíces y de raíces transformadas de barbasco (*Dioscorea sp.*) de la Cuenca del Papaloapan.

### 5.2 Particulares

1. Establecer un sistema de cultivo *in vitro* de *Dioscorea sp.* de la Cuenca del Papaloapan.
2. Obtener cultivos *in vitro* de raíces y de raíces transformadas de *Dioscorea sp.*
3. Identificar y cuantificar diosgenina por medio de UPLC a partir extractos de cultivos *in vitro* de raíces y raíces transformadas, así como de raíces y rizomas en estado silvestre de *Dioscorea sp.*

## VI. METODOLOGÍA

En la Figura 6, se muestra un esquema general del proceso de que se llevó a cabo en el presente trabajo, desde la identificación de las plantas de barbasco (*Dioscorea sp.*) hasta la cuantificación de la diosgenina. En adelante se describe a detalle cada una de estas etapas.



**Figura 6.** Metodología general seguida durante este trabajo.

## 6.1 Localización geográfica

Se localizaron plantas adultas de barbasco (Figura 7), creciendo de manera silvestre dentro del perímetro de la Universidad del Papaloapan (UNPA), Campus Tuxtepec, ubicada en San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, en las coordenadas 18°00'49.2"N+96°10'19.5"O.



**Figura 7.** *Dioscorea sp.* creciendo de manera silvestre dentro de la Universidad. Fotografías tomadas por: Sánchez L. Guadalupe.

## 6.2 Material vegetal

Para realizar el establecimiento *in vitro* de *Dioscorea sp.* se colectaron ramas juveniles de los ejemplares localizados, durante los meses de abril a junio de 2015 y 2016, las cuales se trasladaron inmediatamente al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

(LCTV) de la UNPA, Campus Tuxtepec, para su inmediato establecimiento bajo las condiciones *in vitro*.

También se colectaron rizomas y raíces frescas de ejemplares jóvenes, los cuales fueron lavados con agua corriente para la obtención de extractos. Para realizar el secado de la muestra se siguió el protocolo descrito por Montes *et al.*, (2008) realizando algunas modificaciones. Se tomó una muestra de la parte media del rizoma, se cortó en pequeños trozos y se secó a una temperatura de 50°C durante 14 horas, se maceró en un mortero hasta obtener un polvo con partículas de tamaño  $\leq 0.01$  cm. Se realizó el mismo procedimiento para las raíces colectadas.

### 6.3 Establecimiento *in vitro* de cultivos

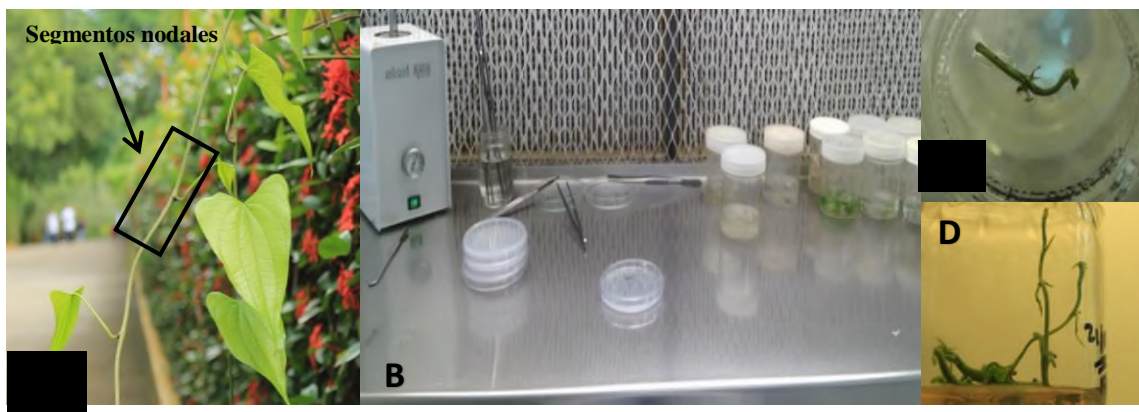
Para el establecimiento *in vitro* de *Dioscorea sp.* (Figura 8), el material vegetativo fue seccionado tomando los segmentos nodales, conteniendo nudos y entrenudos con yemas laterales, los cuales fueron depositados en recipientes de cristal tapados de 500 mL para su desinfección. Para ello se llevaron a cabo tres diferentes tratamientos de desinfección (Anexo 1), el primero consistió en realizar un lavado con agua destilada y Tween 20<sup>®</sup> durante 20 min en agitación constante. Posteriormente se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Este proceso se repitió una vez más.

Los explantes se mantuvieron en reposo con Microdyn<sup>®</sup> (plata coloidal al 0.35 %) durante 10 min según indicaciones del producto. Se realizaron dos enjuagues con agua destilada. Un lavado con etanol al 70% durante 1 min. Dos enjuagues con agua destilada estéril. A partir de esta etapa se manejaron en campana de flujo laminar. Un lavado con Cloralex<sup>®</sup> (5.4% hipoclorito de sodio) al 20% durante 20 min aplicando un ciclo de vacío. Se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril.

Para el segundo tratamiento se modificó el tiempo de exposición a Cloralex<sup>®</sup> al 20% de 20 a 30 min, y para el tercero se agregó al inicio un lavado con agua destilada estéril y Tween 20<sup>®</sup> durante 60 min, seguido de dos enjuagues con agua destilada estéril,

posterior a esto se llevaron a cabo los pasos del primer tratamiento de desinfección cambiando el tiempo de reposo con Microdín® de 10 a 50 min.

Los explantes se sembraron en medio de cultivo reportado por Forsyth y Van Staden (1981), con algunas modificaciones, el cual se describe a continuación: medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con vitaminas, elaborado a partir de soluciones madre (Anexo 2), 30 g/L de sacarosa, 1 mg/L BAP y 3.1 g/L de Fitagel® a pH de 5.7. Se mantuvieron en observación constante para determinar el porcentaje de contaminación y necrosis, bajo un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, bajo luz fluorescente continua ( $54 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ; lámparas de luz diurna) a una temperatura de  $27^\circ\text{C}$ .



**Figura 8.** Establecimiento *in vitro* de *Dioscorea* sp. A) *Dioscorea* en campo, se resaltan los segmentos nodales B) establecimiento de los segmentos nodales en condiciones de asepsia C) siembra de los explantes en medio de cultivo, D) Brotes. Fotografías tomadas por: Sánchez L. Guadalupe.

Cada tratamiento se repitió por triplicado, y se tomaron resultados de contaminación entre los 3 y 15 días y los resultados de necrosis fueron tomados a partir de los 15 días hasta los 2 meses.

Una vez establecido el cultivo se analizó el porcentaje de explantes con brotes y el promedio de explantes por brote. Con estos datos se evaluó la capacidad de formación de brotes (CFB) en respuesta al subcultivo según la metodología de Villalobos-Amador (1997) utilizando la siguiente fórmula:

$$CFB = \frac{(\text{Promedio de brotes por explante})(\% \text{ de explantes con brotes})}{100}$$

La recopilación de datos se realizó por triplicado y fueron cuantificados a los 2 meses del establecimiento y subcultivo.

#### **6.4 Infección con *Agrobacterium rhizogenes***

Para realizar la transformación genética de *Dioscorea sp.*, el material establecido *in vitro* se trasladó a la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), en donde se evaluaron tres cepas diferentes de *A. rhizogenes* cepa A4, cepa Arqual y cepa K599. Antes de realizar los co-cultivos, se verificó que las cepas contaran con sus plásmidos correspondientes siguiendo la metodología descrita por Villalobos-Amador *et al.*, (2002).

A partir de plántulas de *Dioscorea sp.* establecidas *in vitro*, se tomaron entre nudos de 1 a 2 cm de longitud, en los cuales se siguió el protocolo de transformación de Rodríguez-Hernández *et al.*, (2007), realizando pequeñas modificaciones como describe a continuación: se realizaron múltiples cortes con bisturí en la superficie del explante, evitando aplastar o traspasar el tejido, inmediatamente se depositaron en un frasco que contenía medio basal MS líquido con 100 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L ácido ascórbico. Después, los explantes fueron transferidos a un frasco que contenía medio 45 mL de medio basal MS líquido con 50 µL de acetosiringona 100 mM y 5 mL del cultivo bacteriano en fase exponencial, se dejaron reposar durante 30 min.

Los explantes fueron sacados de la suspensión bacteriana, eliminando el exceso de cultivo con ayuda de una gaza estéril para posteriormente ser transferidos a cajas Petri con medio basal MS sólido sin antibióticos, colocando de 4 a 5 explantes por caja, y se mantuvieron por 72 horas en oscuridad.

Pasadas las 72 horas, los explantes fueron transferidos a un frasco que contenía medio basal MS líquido con 500 µg/L de cefotaxima, durante 30 min. Finalmente, los explantes fueron colocados en los siguientes medios: MS basal suplementado con 50 µg/L de kanamicina, medio basal MS suplementado con 100 µg/L de estreptomina y medio basal MS suplementado con 50 µg/L de kanamicina y 50 µg/L de rifampicina, para las cepas K599, Arqua1 y A4psc4 respectivamente. Se incubaron en oscuridad hasta la aparición de raíces. Este procedimiento fue realizado por triplicado como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Número de explantes de procesados por cada cepa

CEPA	PROMEDIO DE EXPLANTES	RÉPLICAS	NÚMERO DE EXPLANTES TOTALES
<b>K599</b>	21.33	3	<b>64</b>
<b>A4</b>	20	3	<b>60</b>
<b>ARqua1</b>	15	3	<b>45</b>
		<b>TOTAL</b>	<b>169</b>

## 6.5 Comprobación de la transformación

Se realizó la comprobación de la transformación genética vía *A. rhizogenes* por medio de dos técnicas; el ensayo histoquímico GUS y por PCR.

### 6.5.1 Ensayo histoquímico para GUS

Una vez que aparecieron y crecieron las raíces se realizó el ensayo histoquímico para β-glucuronidasa (GUS), para el cual se tomaron pequeñas secciones de raíces menores a 1 cm de longitud cortadas con la ayuda de un bisturí. Se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL al cual se adicionó; 100 µL de Buffer de Fosfatos 1 M, 40 µL de E.D.T.A 0.25 M, 100 µl de Ferrocianuro de Potasio 5 mM, 100 µl de Ferricianuro de Potasio 5 mM, 10 µL de Tritón X-100 al 10 %, 50 µL de sustrato X-Glu 40 mM y 600 µL de agua destilada. El tejido vegetal con la mezcla se dejó incubar durante 12 h. finalmente,

los segmentos de raíces fueron retirados de la mezcla y se observó el cambio de coloración.

### **6.5.2 Amplificación de ADN por la reacción de polimerización en cadena (PCR)**

La técnica de PCR se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la UNPA, Campus Tuxtepec utilizando el kit de extracción DNeasy® Plant Mini Kit de la marca QIAGEN®. Para ello, se extrajo ADN genómico a partir de las siguientes muestras: raíz silvestre y raíz en condiciones de crecimiento *in vitro* obtenida del co-cultivo con *A. rhizogenes*.

La cuantificación de las muestras de ADN genómico se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la UNPA, Campus Tuxtepec, utilizando el equipo Nanodrop 2000™, y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, corrido a 90 V y 400 mA durante 30 min, las bandas se observaron con ayuda de un fotodocumentador de fluorescencia y el programa GeneSnap™.

A partir de ADN genómico se amplificó el gen *rolB* de *A. rhizogenes*, para lo cual se utilizaron los oligos 5'--GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG, 3'--GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA. La mezcla de reacción se realizó según el protocolo sugerido por el kit de la enzima en NZYTaQ II DNA polymerase descrito en la Tabla 6.

Se realizó la PCR punto final de ambas muestras de ADN, bajo las condiciones que se indican en la Tabla 7, en un termociclador MaxiGene Gradient®, y se comprobó el tamaño del amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 %, corrido a 90 V y 400 mA durante 45 min, y se observaron las bandas con ayuda de un fotodocumentador y el software GeneSnap™.

**Tabla 6.** Mezcla de reacción para PCR

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Buffer de reacción</b>	10X	2.5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2.5 mM	1.25
<b>Oligo directo</b>	10 pmol/ $\mu\text{L}$	1
<b>Oligo reversa</b>	10 pmol/ $\mu\text{L}$	1
<b>Muestra de ADN</b>	10 ng/ $\mu\text{L}$	2
<b>Nzytaq II DNA polimerasa</b>	5 u/ $\mu\text{L}$	0.5
<b>Mezcla de DNTPs</b>		0.8
<b>H<sub>2</sub>O libre de nucleasas</b>		15.95
<b>Volumen final</b>		25

**Tabla 7.** Condiciones de PCR

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	3 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	30 s	30
<b>Alineación</b>	62	30 s	
<b>Extensión</b>	72	20 s	
<b>Extensión final</b>	72	10 min	1

## **6.6 Cultivos *in vitro* de raíces en medios suplementados con auxinas**

Para la inducción de raíces se evaluó, previamente, el efecto de las condiciones de luz (Fotoperiodo 1; 16 h luz/ 8 h oscuridad, Fotoperiodo 2; 24 h oscuridad). Los resultados fueron tomados a los 3 meses del subcultivo, se cuantificó el número de explantes que produjeron raíces y el peso de las mismas.

Partiendo de las plántulas *in vitro* de *Dioscorea sp.* se indujo el crecimiento de raíces en medio MS con vitaminas suplementado con la auxina AIB en diferentes concentraciones: 0.25 mg/L, 0.50 mg/L, 0.75 mg/L y 1.00 mg/L, utilizando un control libre de auxina. Los explantes se mantuvieron en observación en el cuarto de cultivo. Se evaluó el número de explantes que generaron raíces, y el promedio de pesos de estas raíces, los resultados se tomaron 3 meses después del subcultivo.

## **6.7 Extracción de diosgenina**

La preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Yi *et al.*, (2014). Se colectaron raíces y rizomas de ejemplares juveniles de *Dioscorea sp.*, los cuales fueron lavados con agua corriente. Se tomó una muestra de la parte media del rizoma.

El rizoma y las raíces fueron cortadas en pequeños trozos. Para los cultivos de raíces *in vitro* generados con auxina y mediante transformación, éstas fueron retiradas del medio de cultivo, se eliminó el exceso de éste y fueron pesadas. Todo el material vegetal fue secado a una temperatura de 50°C durante 14 horas y triturado en un mortero para obtener partículas de tamaño  $\leq 0.01$  cm.

Partiendo de 0.5 g de muestra seca y macerada, se le agregó 15 mL de metanol (MeOH), se incubó en un baño ultrasónico durante 30 min. Cada extracto fue filtrado y

centrifugado a 12,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada extracto fue recuperado en un matraz y se eliminó el disolvente en un rotavapor. Este tratamiento se realizó por triplicado por cada muestra utilizando 5 mL de MeOH en la última extracción.

El extracto seco se resuspendió en 100 mL de agua destilada, se colocó en un embudo de separación, se mezcló con 100 mL de hexano y se recuperó la fase acuosa. El extracto acuoso se llevó a sequedad en un rotavapor y fue hidrolizado con 15 mL de ácido clorhídrico 2 M en sistema de reflujo durante 5 h.

Pasadas las 5 h, el contenido del matraz se llevó a un embudo de separación y se realizó la separación líquido/líquido con acetato de etilo (AcOEt), se recuperó el extracto de AcOEt rico en diosgenina. Posteriormente se concentró en un rotavapor para obtener el extracto seco. Se tomó el peso del extracto hidrolizado por diferencias de peso. El proceso se ilustra en la Figura 9.

El hidrolizado seco se resuspendió en 5 mL de MeOH grado LC-MS, se transfirió 1 mL a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 18,000 g durante 10 min a 4°C. Se recuperó 10 µL del sobrenadante, se aforó a 1 mL con MeOH, se filtró utilizando una membrana de PTFE de 0.22 µm. El filtrado se colocó en un vial de HPLC de 2 mL para su posterior análisis por UPLC-MS.

### **3.1 Detección de la diosgenina en los extractos mediante cromatografía en capa fina**

Se determinó la presencia de diosgenina en los extractos mediante cromatografía en capa fina (TLC), usando como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt en una relación 9:1 y fue revelada en una cámara de UV a 250 nm, se utilizó diosgenina Sigma-aldrich® como estándar.



**Figura 9.** Proceso para la obtención de los extractos (en este caso para el rizoma silvestre). A) y B) rizomas silvestres. C) rizoma ya lavado y cortado en trozos. D) tozos de rizoma secos. E) hidrólisis ácida. F) extractos hidrolizados. G) separación líquido/líquido. H) extractos finales. Fotografías tomadas por: Sánchez L. Guadalupe.

### 3.2 Determinación de diosgenina en los extractos mediante UPLC-MS

La cuantificación de la diosgenina se llevó a cabo utilizando la metodología reportada por Yi *et al.*, (2014) con algunas modificaciones, la cual se describe a continuación: Se utilizó un sistema cromatográfico UPLC Acquity I Class (Waters) acoplado a la fuente de ionización por electronebulización (ESI) del espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) Synapt G2-Si (Waters). La programación del equipo y el análisis de datos se llevaron a cabo con el programa MassLynx 4.1(Waters). Para el análisis de muestras se introdujeron 1  $\mu\text{L}$  en una columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , Waters) utilizando un flujo de 0.3 mL/min y temperatura de 40 °C.

La separación se llevó a cabo en 10 minutos empleando las fases móviles: A, ácido fórmico acuoso al 0.1 % (v/v); y B, acetonitrilo en modo isocrático de elución con 85 % de B. Las condiciones de operación del espectrómetro de masas fueron las siguientes: ionización en modo positivo, voltaje de capilar 3000 V, voltaje de cono 30 V, temperatura del capilar 120 °C, temperatura de desolvatación 450 °C, gas de cono 50 L/h, gas de desolvatación 600 L/h, presión del nebulizador 6 Bar. Para la corrección de masa exacta se introdujo continuamente el compuesto de referencia Leucina-Encefalina ( $m/z = 556.2771$ ). Para la cuantificación de diosgenina se utilizaron estándares en el intervalo de 0.5 a 5 mg/L.

### **6.10 Diseño estadístico**

Se realizaron pruebas estadísticas de varianza, con un  $\alpha=0.05$  para determinar si existía diferencia significativa entre 3 tratamientos de desinfección en cuanto al porcentaje de contaminación y al porcentaje de necrosis. De la misma forma para la CFB con respecto al subcultivo y el efecto de la luz en la rizogénesis.

El análisis estadístico se realizó con ayuda del software MINITAB 17. Cada tratamiento de desinfección se realizó por triplicado tomando resultados de contaminación entre 3 y 15 días, y de necrosis. De igual manera los subcultivos para la CFB se realizaron por triplicado.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Establecimiento de los cultivos *in vitro*

El cultivo *in vitro*, como técnica, consiste en cultivar asépticamente una porción aislada de la planta bajo condiciones de ambiente controlado, para que las células expresen su potencial intrínseco e inducido. Como primera etapa se evaluó el porcentaje de contaminación y necrosis de los tres tratamientos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Dioscorea sp* (Tabla 8).

**Tabla 8.** Porcentaje de contaminación y necrosis en los diferentes tratamientos de desinfección

Tratamiento de desinfección	Contaminación (%)	Necrosis (%)
1	61.490 ( $\pm 9.92$ ) <sup>A</sup>	13.725 ( $\pm 6.15$ ) <sup>A</sup>
2	63.796 ( $\pm 1.25$ ) <sup>A</sup>	6.875 ( $\pm 3.54$ ) <sup>A</sup>
3	64.324 ( $\pm 3.13$ ) <sup>A</sup>	11.076 ( $\pm 1.25$ ) <sup>A</sup>

Nota: letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia estadísticamente significativa mediante análisis ANOVA por la prueba de Tukey (N= 50,  $p=0.05$ ).

El Tratamiento 3 mostró un mayor porcentaje de contaminación de ( $64.32\pm 3.13$  %) mientras que el tratamiento 1 fue el de menor porcentaje ( $61.49 \pm 9.92$  %). Por otro lado, el porcentaje de necrosis en el tratamiento 1 y 2 mostraron el mayor y menor porcentaje de necrosis ( $6.875\pm 3.54$  % y  $13.725\pm 6.15$  %), respectivamente. En general, los tres tratamientos mostraron un porcentaje de contaminación mayor al 60% con porcentajes de necrosis diferentes, los cuales no tuvieron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 3).

Estos resultados contrastan con los reportados por García *et al.*, (2009) para *Dioscorea alata*; contaminación de 5% y necrosis de 4%, para su mejor tratamiento (1.5%

hipoclorito de sodio, 10 min). También con los reportados por Mwirigi *et al.*, (2010) para *Dioscorea spp.* que utilizando desinfecciones solas (15 y 20 % blanqueador comercial, 20 y 30 min) obtiene solamente el 10% de supervivencia, sin embargo, en desinfecciones secuenciales (20 y 30 % blanqueador comercial, 30-20 min) obtienen porcentajes de supervivencia de 75-85%.

Entre los tres tratamientos de desinfección utilizados no existieron diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de contaminación y necrosis, sin embargo, el tiempo empleado en el Tratamiento 2 y 3 fue mayor que el empleado en el Tratamiento 1, por lo tanto, los establecimientos consecuentes se realizaron utilizando dicho tratamiento.

Se logró establecer el cultivo *in vitro* de *Dioscorea sp* (Figura 10) con el Tratamiento de desinfección 1, en el medio MS basal con 1 mg/L de BAP, obteniéndose la proliferación de brotes a partir de yemas axilares, es decir a partir de meristemas pre-existentes, cuantificando tanto el porcentaje de explantes con al menos un brote, como el promedio del mismo por cada explante, determinando que no hay diferencia estadísticamente significativa de la CFB en el establecimiento del cultivo con la del posterior subcultivo (Tabla 9).

**Tabla 9.** Capacidad de formación de brotes (CFB)

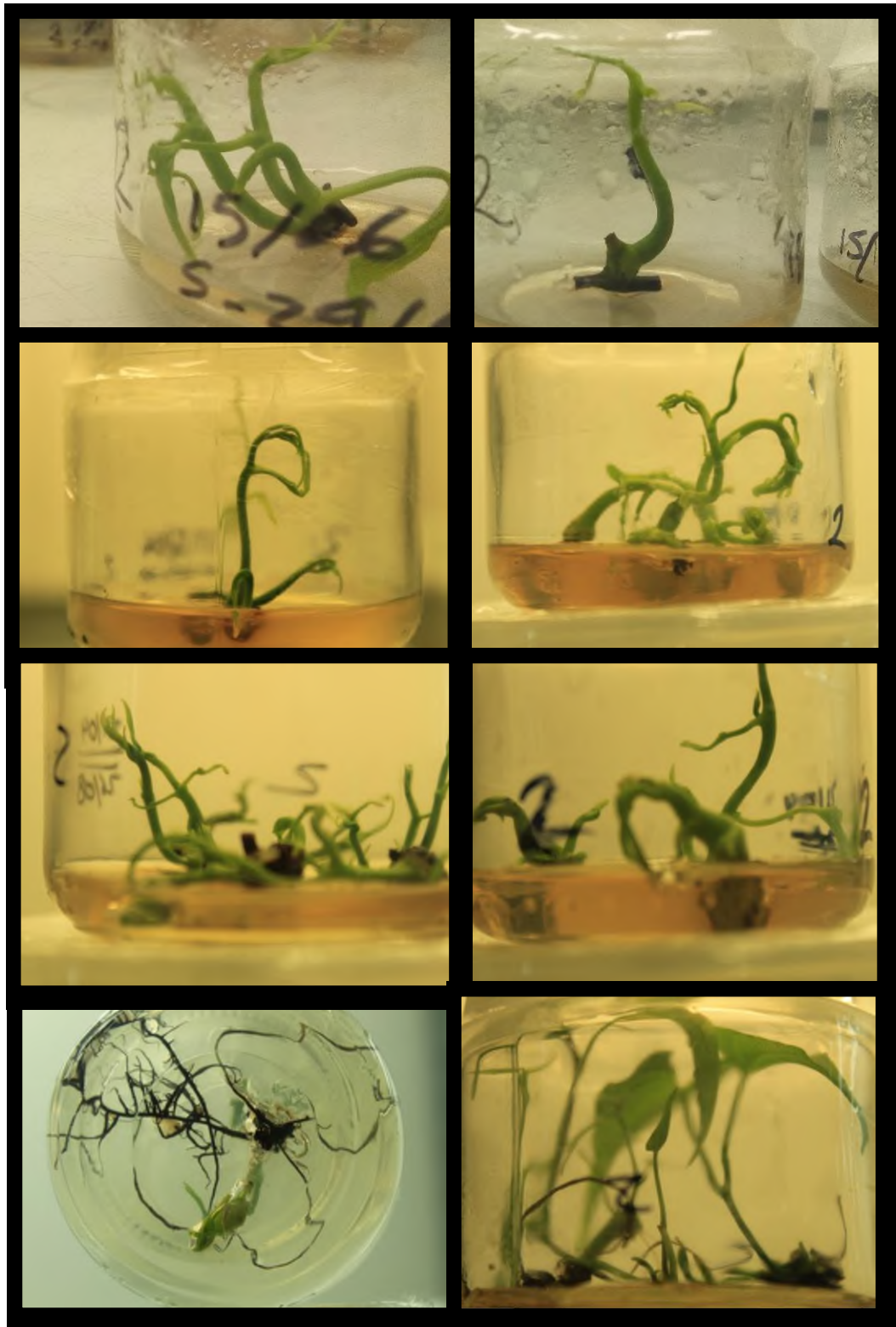
	<b>Establecimiento</b>	<b>1er subcultivo</b>
<b>Promedio de brotes por explante</b>	1.043 ±0.519	1.49 ±0.48
<b>Porcentaje de explantes con brotes</b>	77.1 ±39.7	69.7 ±19.8
<b>CFB</b>	0.929 ±0.704 <sup>A</sup>	1.071 ±0.656 <sup>A</sup>

Nota: letras iguales en la misma fila indican que no hay diferencia estadísticamente significativa mediante análisis ANOVA por la prueba de Tukey (N= 50, p=0.05).

Los resultados obtenidos de proliferación de brotes a partir del establecimiento (0.929±0.704) difieren con los obtenidos por varios autores. Behera *et al.*, (2009) reportan, para *D.oppositifolia*, un 90 % de explantes con brotes (medio MS + 2 mg/L cinetina + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L ANA + 100 mg/L ácido ascórbico).

Salazar y Hoyos, (2007) reportan para *D. alata* un 70% de explantes con brotes (medio MS + 0.5 mg/L BAP). Royera *et al.*, (2007) reportan, para *D. alata*, un promedio de 4.9 brotes por explante (medio MS + 0.5 mg/L BAP). Mwirigi *et al.*, (2010), reportan, para *Dioscorea spp.*, un promedio de 1.1 brotes por explante (medio MS + 0.5 mg/L y 1.0 mg/L BAP). Yan *et al.*, (2011) reportan, para *D. fordii*, una media de 4.8 brotes por explante (medio MS + 1.0 mg/L BAP, 0.1 mg/L ANA, 30 g/L sacarosa y 1.5 g/L carbón activado en medio líquido).

Y el resultado del subcultivo ( $1.071 \pm 0.656$ ) difiere con el reportado por Forsyth y Van Staden, (1981) que reportan un promedio de 9 (medio MS + 1.0 mg/L BAP) y 8 (medio MS + 10 mg/L Kn) brotes por explante.



**Figura 10.** Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Dioscorea sp.*, a partir de segmentos nodales. Aspecto de la brotación y elongación en medio de cultivo suplenemtado con 1 mg/L de BAP. Fotografías tomadas por: Sánchez L. Guadalupe.

## 7.2 Transformación genética

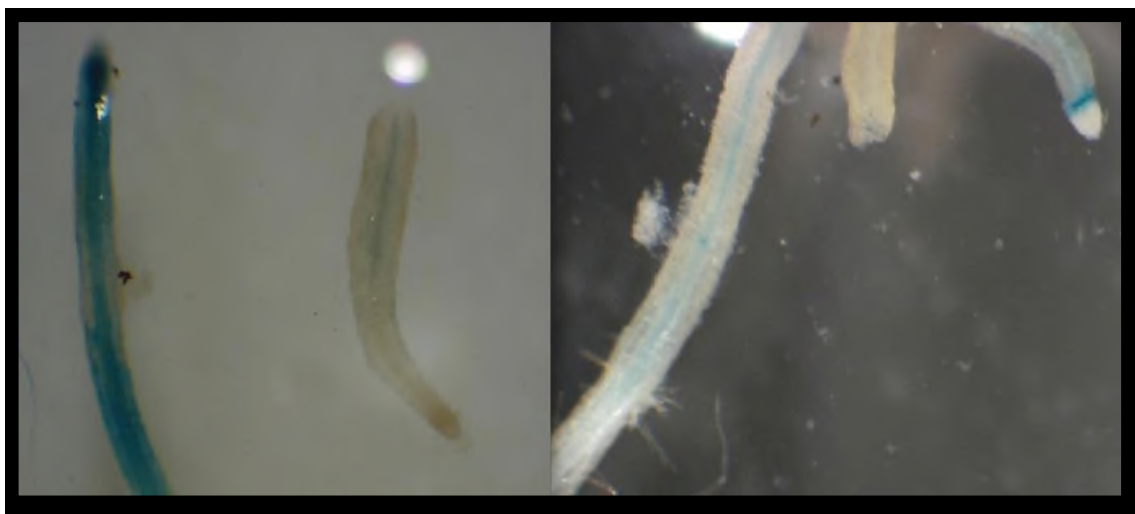
Para la transformación genética de entrenudos de *Dioscorea sp.*, se evaluaron las cepas de *A. rhizogenes*: cepa K599, cepa A4 y cepa Arqua1, las cuales fueron evaluadas mediante PCR para verificar la presencia de los plásmidos (datos no mostrados) antes de ser utilizadas para la transformación. Después de 2 meses del co-cultivo se obtuvieron raíces a partir de las cepas A4 y ARqua1, en medio basal MS líquido suplementado con vitaminas del medio MS, 30 g/L de sacarosa y el antibiótico correspondiente.

Se obtuvo una eficiencia de transformación de 0.33 % con la cepa A4 y de 0 % tanto para la cepa K599, como para la cepa Arqua1 (Tabla 10). En un principio el porcentaje de explantes con raíces fue mayor, sin embargo, en el segundo subcultivo a medio basal MS líquido suplementado con vitaminas del medio MS, 30 g/L de sacarosa sin antibiótico sólo progresó una línea a partir de la cepa A4.

**Tabla 10.** Raíces transformadas

Cepa	Promedio de explantes co-cultivados	Promedio de raíces transformadas
<b>K599</b>	21.33 ±9.71	0
<b>A4</b>	20 ±12.76	0.33 ±0.57
<b>Arqua1</b>	15 ±3	0

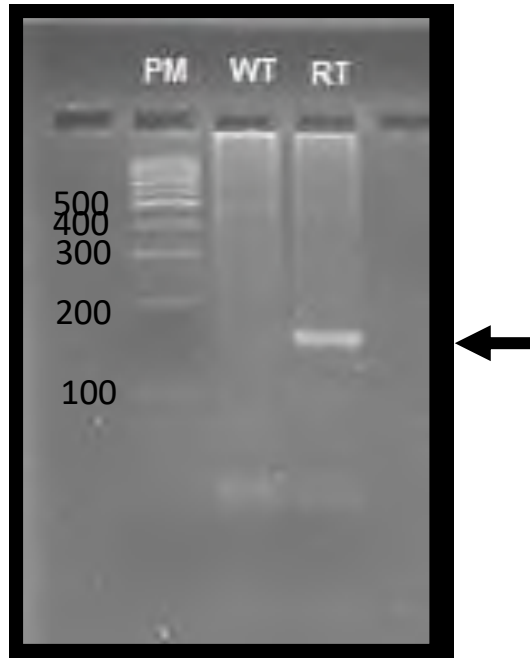
A esta línea se realizó el ensayo histoquímico GUS utilizando el sustrato X-Glu, el cual resultó positivo (Figura 11) indicando que la transformación fue positiva. Para comprobar este resultado realizó una PCR a tiempo final (Figura 12). La muestra de ADN de la raíz transformada presentó una banda de 150 pb correspondiente al tamaño esperado del amplificado del gen rolB, banda que no se encuentra en la muestra de ADN de la planta silvestre.



**Figura 11.** Raíces transgénicas tras la prueba GUS. La coloración azul indica que el sustrato X-glu está interactuando con la enzima. Fotografías tomadas por: Villalobos A. Enrique.

No existen antecedentes de transformación genética de especies del género *Dioscorea* empleando *A. rhizogenes*. Sin embargo, la eficiencia de transformación con *A. tumefaciens* está entre 9.4-18.2 % para *D. rotundata* y del 6 % para callos in vitro de *D. zingiberensis* (Shi *et al.*, 2012). Mientras que en la transformación genética de *D. rotundata* mediada por *A. tumefaciens* usando brotes axilares como explantes se obtiene una frecuencia de transformación del 9.4 al 18.2 %, cabe señalar que el enfoque de estas transformaciones no fue para monitorear el incremento o disminución de la producción de diosgenina (Nyaboga *et al.*, 2014).

La eficiencia de transformación observada en el presente trabajo es más de 100 veces menor a la reportada por Kumar *et al.*, (2014) del 42 % para *H. Isora* vía *A. rhizogenes*, aunque se debe tomar en cuenta que no pertenecen a la misma especie. A su vez, esta eficiencia resulta ser 13 veces mayor a la reportada por Merkli *et al.*, (1992) que obtienen solo un 0.024 % de eficiencia de transformación en *T. foenum-graecon* con la cepa A4 de *A. rhizogenes*.

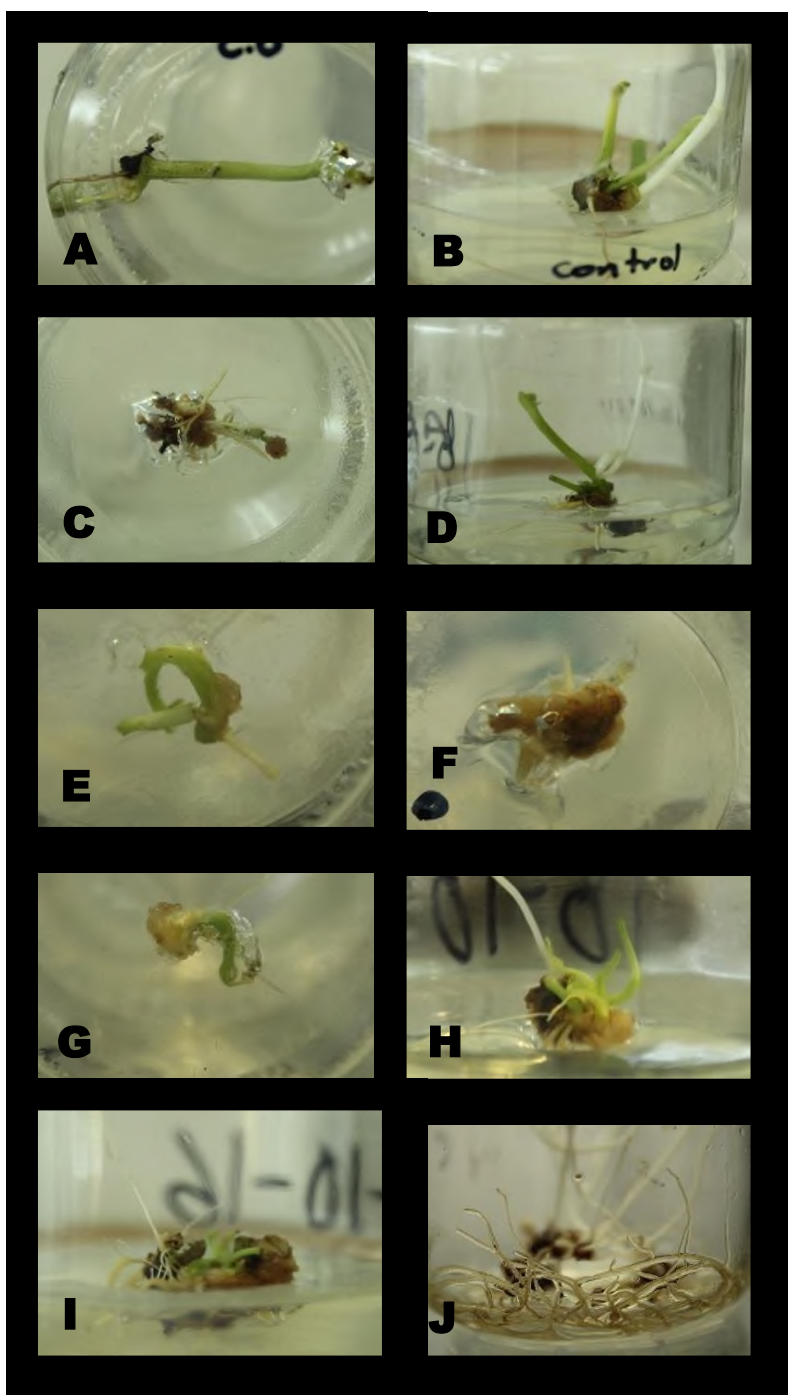


**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 3 % mostrando el producto de la PCR. PM) marcador de peso molecular, WT) planta silvestre, RT) raíz transformada genéticamente. La banda resultante es de  $\approx 150$  pb correspondiente a un fragmento del gen rolB. Fotografía tomada mediante un fotodocumentador y el software GeneSnap™.

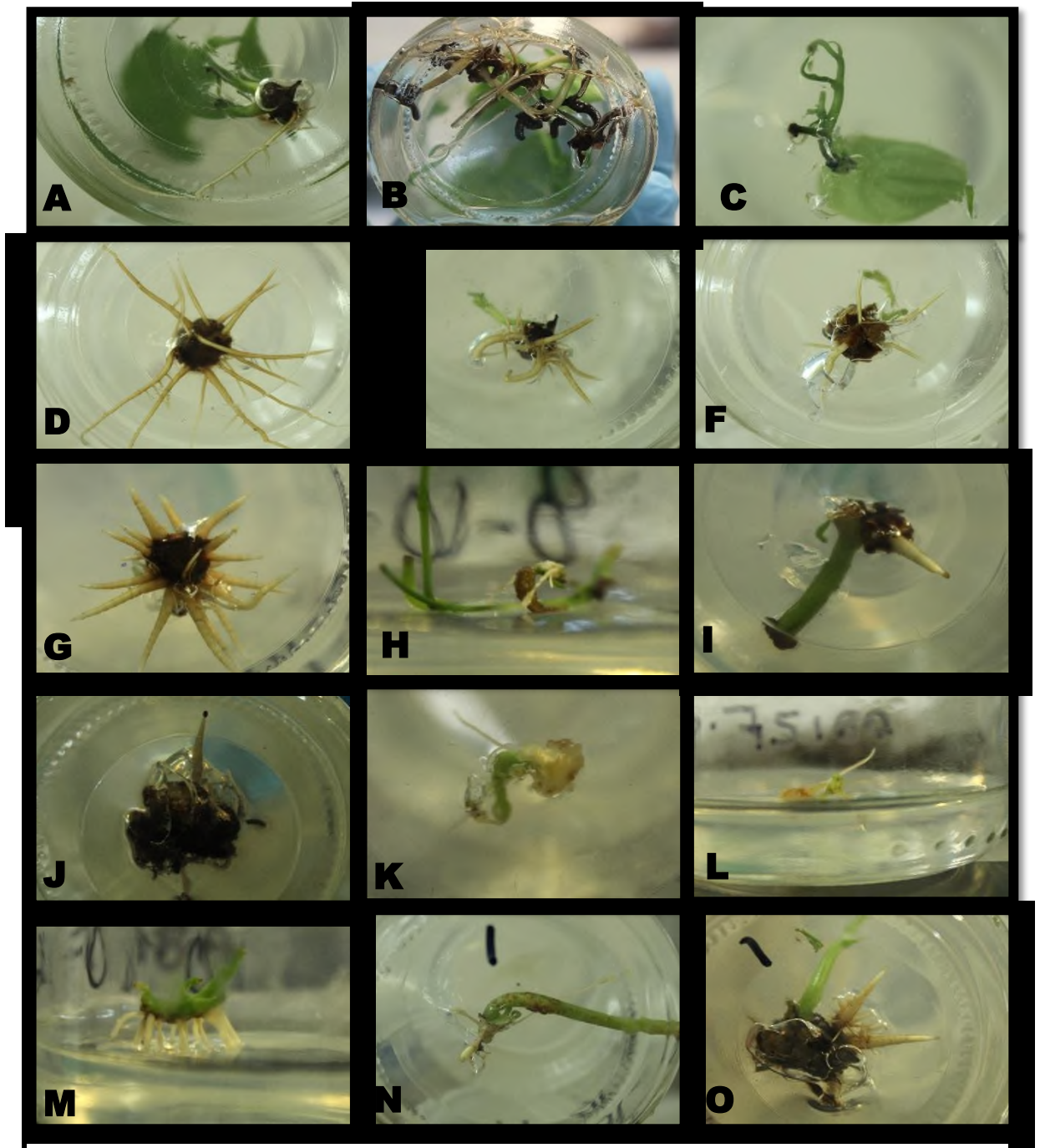
### 7.3 Inducción de raíces con auxinas

Para la inducción de raíces se evaluó previamente el efecto de las condiciones de luz; Fotoperiodo 1 (16 h luz/ 8 h oscuridad) y Fotoperiodo 2 (24 h oscuridad). La mayor formación de raíces se obtuvo en el Fotoperiodo 1 ( $0.82 \pm 0.3881$ ) y el mayor promedio en peso fresco se obtuvo en fotoperiodo 2 ( $0.76 \pm 0.4314$ ). Sin embargo, los diferentes fotoperiodos no presentaron diferencia significativa en cuanto al porcentaje de rizogénesis por explante y a la ganancia en peso (Tabla 11).

Para inducir la producción y crecimiento de las raíces se evaluaron 4 concentraciones diferente de la auxina AIB: 0.25 mg/L, 0.50 mg/L, 0.75 mg/L y 1.00 mg/L. En los 4 tratamientos utilizados y en el control se observó la proliferación de raíces tanto en los cultivos que se mantuvieron en total oscuridad (Fotoperiodo 1) (Figura 13), o 16 horas luz (Fotoperiodo 2) (Figura 14).



**Figura 13.** Rizogénesis de *Dioscorea sp.* en medio suplementado con AIB en oscuridad (A-I: 20 días. J:120 días). A, B: control. C, D: 0.25 IBA. E, F: 0.5 IBA. G, H: 0.75 IBA. I, J: 1.0 IBA. Cabe resaltar que los explantes originales conservaron las clorofilas (20 días) mientras el explante original se mantenía. A los 120 días ya no se encontraban presentes. Fotografías tomadas por: Sánchez L. Guadalupe.



**Figura 14.** Rizogénesis de *Dioscorea sp.* en medio suplementado con AIB en fotoperiodo 16:8 con 20 días de crecimiento. A, B y C: control. D, E y F: 0.25 mg/L IBA. G, H e I: 0.5 mg/L IBA. J, K y L: 0.75 mg/L IBA. M, N y O: 1.0 mg/L IBA. Fotografías tomadas por: Sánchez L. Guadalupe.

**Tabla 11.** Respuesta rizogénica a las condiciones de fotoperiodo

<b>Fotoperiodo</b>	<b>Media de explantes con raíz</b>	<b>Media de peso fresco</b>
<b>1</b>	0.82 ±0.3881 <sup>a</sup>	0.1593 ±0.2414 <sup>a</sup>
<b>2</b>	0.76 ±0.4314 <sup>a</sup>	0.1986 ±0.3058 <sup>a</sup>

Nota: letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia estadísticamente significativa mediante análisis ANOVA por la prueba de Tukey (N= 20,  $p=0.05$ ).

A las 12 semanas del cultivo, se contabilizó el número de explantes que generaron raíces y el peso de éstas (Tabla 12). La mejor respuesta de raíces generadas y ganancia en peso fue con la concentración de AIB de 1 mg/L (Figura 15) obteniéndose un 95 % de explantes con raíz.

**Tabla 12.** Rizogénesis obtenida con AIB

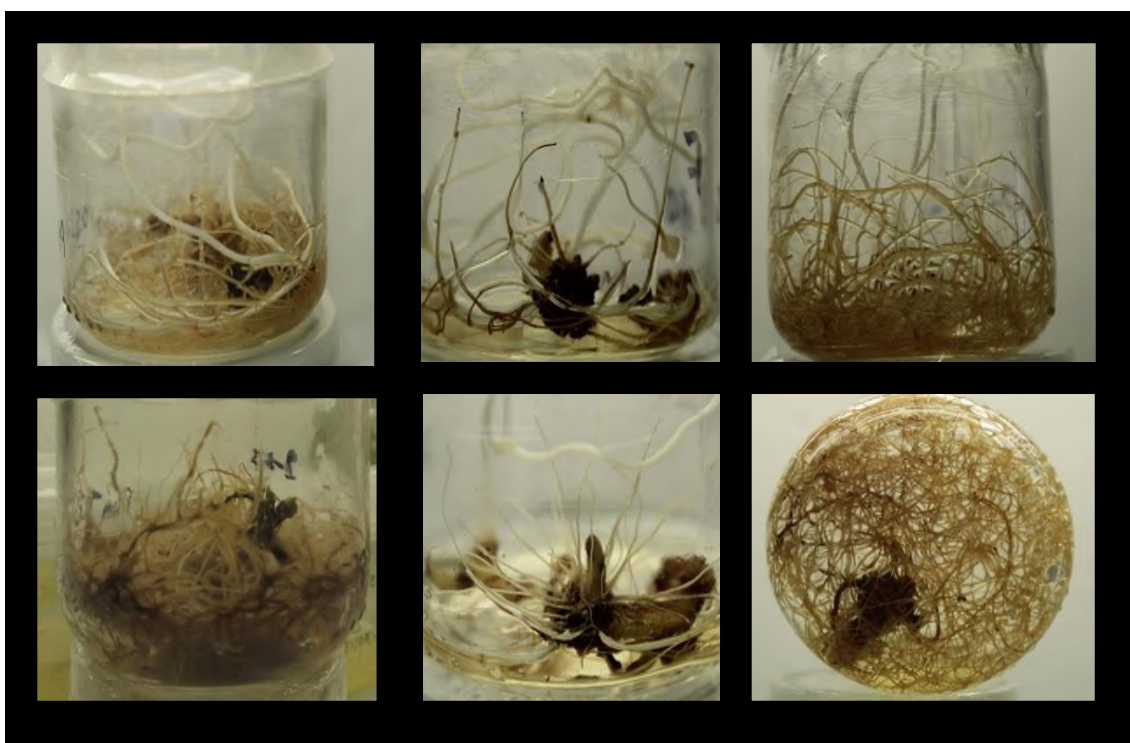
<b>[AIB] (mg/L)</b>	<b>Media de explantes con raíces</b>	<b>% de explantes con raíces</b>	<b>Media de peso fresco (g)</b>
<b>0</b>	0.80 (± 0.4104) <sup>ab</sup>	80	0.0213 (±0.0284) <sup>b</sup>
<b>0.25</b>	0.90 (±0.3078) <sup>ab</sup>	90	0.2390 (±0.2104) <sup>ab</sup>
<b>0.50</b>	0.60 (±0.5030) <sup>b</sup>	60	0.1563 (±0.2874) <sup>b</sup>
<b>0.75</b>	0.70 (±0.4700) <sup>ab</sup>	70	0.0998 (±0.1549) <sup>b</sup>
<b>1.00</b>	0.95 (±0.2236) <sup>a</sup>	95	0.3781 (±0.4038) <sup>a</sup>

Nota: letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia estadísticamente significativa mediante análisis ANOVA por la prueba de Tukey (N= 20,  $p=0.05$ ).

Estos resultados pueden ser comparados con los reportados por varios autores que utilizan AIB en diferentes concentraciones para la rizogénesis en diferentes especies del género *Dioscorea*. Alizadeh *et al.*, (1998) reportan resultados superiores para *D. Composita*, del 90 (medio MS + 0.25 mg/L AIB) y 100% (medio MS + 0.5 mg/L AIB y medio MS + 1 mg/L AIB) de explantes con raíces. Sin embargo, reportan resultados

similares en cuanto al peso fresco de las raíces generadas, 0.126 g, 0.190 g y 0.397 g respectivamente. Behera *et al.*, (2009) reportan un porcentaje máximo de rizogénesis de 60% (medio MS + 2 mg/L IBA) en explantes de *D. oppositifolia* L.

Estos resultados, además, pueden ser comparados con los reportados por otros autores que utilizan diferentes reguladores de crecimiento en la rizogénesis de diferentes especies del género *Dioscorea*. Dessalegn *et al.*, (2015) reportan, para *Dioscorea sp.*, un 45% de explantes con raíces (medio MS + 2mg/L ANA + 0.5 mg/L IBA). Poornima y Ravishankar, (2007) reportan un 89% de rizogénesis en explantes de *D. oppositifolia* (medio MS + 0-0.5 mg/L ANA). Chaturvedi, (1975) reporta un 90% de explantes con raíces en *D. floribunda* (medio MS + 0.5 mg/L ANA).



**Figura 15.** Rizogénesis *in vitro* inducida con 1 mg/L de IBA a los 120 días. Fotografías tomadas por: Sánchez L. Guadalupe.

## 7.4 Identificación y cuantificación de diosgenina

El rendimiento de los extractos obtenidos a partir de 0.5 g de material vegetal seco se muestra en la Tabla 13.

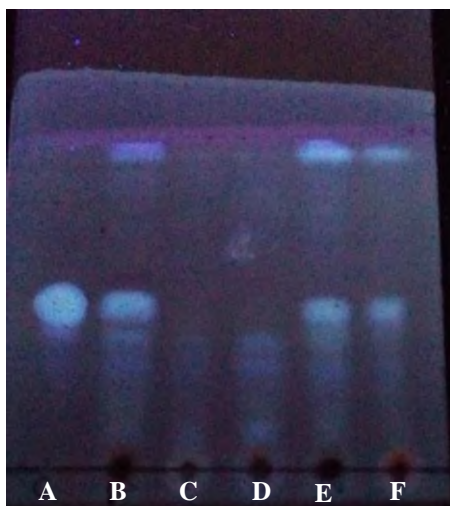
**Tabla 13.** Rendimiento de los extractos crudos

Muestra	Peso del extracto crudo (g)	Rendimiento (%)
Transformada	0.14	28
AIB luz	0.026	5.2
AIB oscuridad	0.045	9
Raíz silvestre	0.018	3.6
Rizoma silvestre	0.027	5.4

Se detectó la presencia de diosgenina mediante TLC (Figura 16), en la cual se observó claramente la presencia de la diosgenina en los extractos de raíces transformadas, rizoma y raíz silvestre. En las dos muestras de raíces de cultivo *in vitro* con auxinas, él no se logra apreciar la presencia de diosgenina debido a las concentraciones tan pequeña en estas muestras.

Otros trabajos reportan la detección de diosgenina mediante el uso de TLC, como el de Zhu (2014) a partir de rizomas de *D. zingiberensis* hidrolizados y fermentados. Sin embargo, realizar la TLC no es suficiente para determinar la concentración de Diosgenina, para ello se realizó la cuantificación de diosgenina mediante UPLC-EM utilizando estándares en el intervalo de 0.5 a 5 mg/L.

La diosgenina presentó un tiempo de retención de 4.63 min, el cual presenta una pequeña variación con el reportado por Yi *et al.*, (2014) (5.2 min), la diferencia en el tiempo de retención podría deberse al aumento de acetonitrilo en la fase móvil (de 82 a 85%) lo cual hace que el analito tenga mayor afinidad a la fase móvil y se retenga por un menor tiempo.



**Figura 16.** TLC. Placa vista en cámara de UV, se observa en cada carril, A) diosgenina control, B) extracto de raíces transformadas, C) extracto de raíces inducidas en AIB bajo fotoperiodo 1, D) extracto de raíces inducidas con AIB en Fotoperiodo 2 (oscuridad), E) extracto de raíces silvestres y F) extracto de rizomas silvestres.

En la Tabla 14, se muestra la cuantificación de diosgenina en los diferentes extractos de *Dioscorea sp.* cabe señalar que no se pudieron realizar réplicas de los extractos debido a la poca disponibilidad del material biológico por dificultades en la etapa de cultivo.

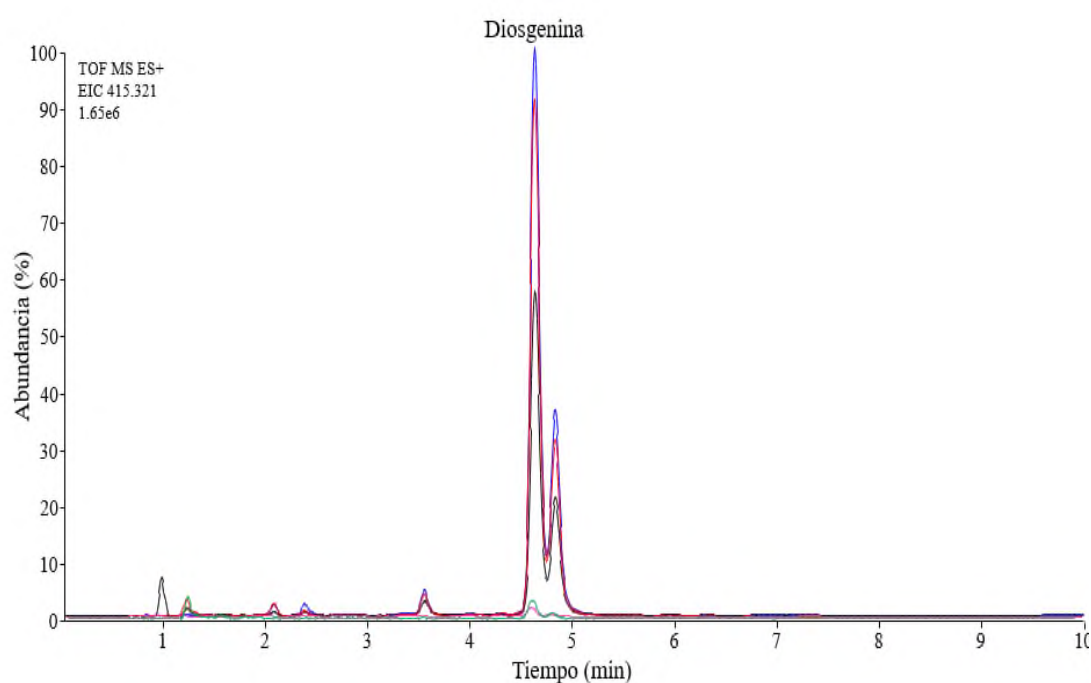
**Tabla 14.** Concentración de diosgenina

Extractos	Concentración (mg/g)
Raíz transformada	2.239
Raíz (AIB y Fotoperiodo 1)	0.087
Raíz (AIB y Fotoperiodo 2)	0.151
Raíz silvestre	3.607
Rizoma	3.954

La mayor concentración de diosgenina en los cultivos *in vitro* de raíces, se obtuvo en las raíces transformadas (2.239 mg/g) que representa el 62.07% de la diosgenina contenida en los extractos de raíz silvestre, y el 56.62 % de la diosgenina contenida en el extracto de rizoma silvestre.

Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Yi *et al.*, (2014) que cuantificaron diosgenina en *D. zingiberensis*, *D. septemloba* y *D. opposita*. En la Tabla 4 se muestra la concentración de diosgenina reportada para estas especies.

El contenido de diosgenina en las raíces transformadas de *Dioscorea sp.* equivale al 11.47 y 25.82 % de la contenida en *D. zingiberensis*, al 287.05 y 189.74 % de la contenida en *D. septemloba* y al 16.97 % de la contenida en *D. collettii*,



**Figura 17.** Cromatograma obtenido de las diferentes muestras. Se muestra: raíz silvestre (azul), rizoma silvestre (rojo), raíz transformada (negro), IBA oscuridad (verde) e IBA luz (rosa).

Así mismo, el contenido de diosgenina en la raíz transformada es 2.16 veces mayor al contenido en raíces transformadas de *H. Isora* ( 1.034 mg/g ) (Kumar *et al.*, 2014), y 5.59 veces mayor al contenido en *T. foenum-graecon* (0.4 mg/g) (Merkli *et al.*, 1997). Se han encontrado concentraciones de diosgenina de hasta 130 mg/g en *D. composita* obtenidos a través de un proceso de fermentación e hidrólisis (González-Leija, 1978). La elevada concentración se encuentra en función de la especie, el proceso de extracción, de la etapa de madures y la época de colecta.

En los cultivos de raíces *in vitro* con 1 mg/L de IBA y Fotoperiodo 1 (16:8 luz:oscuridad) se obtuvo una concentración de 0.08 mg/g, esta concentración representa un 2.41 % del contenido de diosgenina en la raíz silvestre y un 2.20 % del contenido de diosgenina en el rizoma silvestre. Además, equivale al 0.44 y 1.06 % del contenido de diosgenina en *D. zingiberensis*, al 7.37 y 11.15 % de la contenida en *D. septemloba* y al 0.65 % de la contenida en *D. collettii* (Yi *et al.*, 2014).

Mientras que en los cultivos *in vitro* de raíces con 1 mg/L de IBA y Fotoperiodo 2 (oscuridad) se obtuvo una concentración de 0.15 mg/g. Esta concentración representa un 2.18 % del contenido de diosgenina en la raíz silvestre y el 3.85 % del contenido de diosgenina del rizoma silvestre. Además, equivale al 0.77 y 1.74 % de la diosgenina contenida en *D. zingiberensis*, al 12.79 y 19.35 % de la contenida en *D. septemloba* y al 1.14 % de la contenida en *D. collettii* (Yi *et al.*, 2014).

Estos resultados, a su vez, representan el 33.3 y 62.5 % (fotoperiodo 1 y fotoperiodo 2 respectivamente) de la diosgenina presente en cultivos *in vitro* de raíces de *T. foenum-graecum* (0.24 mg/g) reportados por Merkli *et al.*, (1997).

## V. CONCLUSIONES

Fue posible establecer cultivos *in vitro* de *Dioscorea sp.* de la Cuenca del Papaloapan mediante la desinfección de segmentos nodales utilizando el Tratamiento 1 de desinfección a base de Cloralex al 20% y vacío, obteniendo un 24.785% de explantes establecidos.

Los brotes obtenidos *in vitro* de *Dioscorea sp.* mostraron ser susceptible en un 95 % a la rizogénesis utilizando 1mg/L de AIB y un  $0.33 \pm 0.57$  % susceptible a la transformación genética vía *A. rhizogenes* cepa A4.

Las raíces transformadas mostraron mayor acumulación de diosgenina (2.239 mg/g) que las raíces inducidas en condiciones *in vitro* con AIB en oscuridad (0.151 mg/g) y en fotoperiodo (16:8) (0.087 mg/g).

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal, D. C. *et al.* (2017) *Biotechnology of Medicinal Plants and Fungi in Taiwan: Production of Bioactive Secondary Metabolites in In Vitro Culture Systems*. pp. 473-474.
2. Alizadeh, S., Mantell, S. H. y Viana, A. M. (1998) 'In vitro shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(2), pp. 107–112.
3. Barredo, J. L. y Herraiz, I. (2017) *Microbial Steroids. Methods and protocols*. Human Press. pp. 15-29.
4. Bathoju, G., Rao, K. y Giri, A. (2017) 'Production of saponin (stigmasterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of *Chlorophytum borivillanum* (Safed musli)', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands.
5. Behera, K., Sahoo, S. y Prusti, A. (2009) 'Regeneration of plantlet of water Yam ( *Dioscorea oppositifolia* L.) through *in vitro* Culture from Nodal Segments', *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1), pp. 94–102.
6. Bhuvanlakshmi, G. *et al.* (2017) 'Breast cancer stem-like cells are inhibited by diosgenin , a steroidal saponin , by the attenuation of the wnt  $\beta$  -catenin signaling via the wnt antagonist secreted frizzled related protein-4', *Frontiers in Pharmacology*, 8(March), pp. 1–14.
7. Bonilla-Morales, M. M. and Hernández-Castañeda, Ó. I. (2012) 'Propagación *in vitro* de ñame ( *Dioscorea spp.* ): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma', *Agronomía*, 20(2), pp. 65–76.
8. Bucay, J. W. (2009) 'El uso tradicional de las especies del género *Dioscorea* ', *Revista de Fitoterapia*, 9(1): pp. 53-67.
9. Caddick, L. R. *et al.* (2002) 'Yams reclassified: a recircumscription of *Dioscoreaceae* and *Dioscoreales*', *International Association for Plant Taxonomy*, 51(1), pp. 103–114.
10. Cannell, R. J. P. (1998) *Natural Products Isolation. Methods in biotechnology natural products isolation*. Edited by S. Science and Business Media.

11. Castillo, A. (2008) 'Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo', *Las Brujas, Uruguay: Ar-vitro, inia*, p. 8.
12. Chaturvedi, H. C. (1975) 'Propagation of *Dioscorea floribunda* from *in vitro* culture of single-node stem segments', *current science*, 44(23), pp. 839–841.
13. Chen, L. *et al.* (2017) 'Soybean hairy roots produced *in vitro* by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation', *The Crop Journal*. Elsevier B.V., pp. 1–10.
14. Cheng, Y. *et al.* (2016) 'Production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* with mixed culture in a new tray bioreactor', *Biotechnology y Biotechnological Equipment*. Taylor and Francis, 30(1), pp. 158–164.
15. Chiang, L. *et al.* (2018) 'Estrogenic activity of yam via a yeast model and its effects on two cancer cell lines', *Journal of Functional Foods*. Elsevier, 40(January 2017), pp. 86–92.
16. Chilton, M. D. *et al.* (1982) '*Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells', *Nature*, pp. 432–434.
17. Ciura, J. *et al.* (2017) 'Next-generation sequencing of representational difference analysis products for identification of genes involved in diosgenin biosynthesis in fenugreek ( *Trigonella foenum - graecum* )', *Planta*. Springer Berlin Heidelberg, 245(5), pp. 977–991.
18. Das, S., Choudhury, M. D. y Mazumder, P. B. (2013) '*In vitro* propagation of the genus *Dioscorea* - A critical review', *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(3), pp. 2–6.
19. Deshpande, H. A. y Bhalsing, S. R. (2014) 'Isolation and characterization of diosgenin from *in vitro* cultured tissues of *Helicteres isora* L', *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(1), pp. 89–94.
20. Dessalegn, O., Bantte, K. y Diro, M. (2015) 'Effect of Different Combinations of o Plant Growth regulators on *in vitro* Propagation of Yam ( *Dioscorea* Species )', *Journal of Applied Biotechnology*, 3(2), pp. 20–40.
21. Dong, J. *et al.* (2015) 'Direct Biotransformation of Dioscin into Diosgenin in Rhizome of *Dioscorea zingiberensis* by *Penicillium dioscin*', *Indian Journal*

- Microbiology*, 55(2), pp. 200–206.
22. Espejo, O. *et al.* (1982) ‘Spirostanic diosgenin precursors from *dioscorea composita* tubers’, *Phytochemistry*, 21(2), pp. 413–416.
  23. Evkota, K. P. D. *et al.* (2007) ‘Cholinesterase Inhibiting and Antiplasmodial Steroidal Alkaloids from *Sarcococca hookeriana*’, 55(September), pp. 1397–1401.
  24. Figueredo-Urbina, C. J. *et al.* (2018) ‘Domestication and saponins contents in a gradient of management intensity of agaves : *Agave cupreata*, *A. inaequidens* and *A. hookeri* in central Mexico’, *Genet Resour Crop Evol*, (January).
  25. Forsyth, C. y Van Staden, J. (1981) ‘An improved method of in vitro propagation of *Dioscorea bulbifera*’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1(1), pp. 275–281.
  26. García, B., Abeal, E. y Rodríguez, P. (2009) ‘Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L . clon caraqueño’, *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), pp. 127–135.
  27. Giri, A. y Narasu, M. L. (2000) ‘Transgenic hairy roots: recent trends and applications’, *Biotechnology Advances*, 18(1), pp. 1–22.
  28. Girma, G. *et al.* (2017) ‘Re-defining the yam (*Dioscorea spp.*) core collection using morphological traits’, *Plant Genetic Resources*, (May), pp. 1–8.
  29. González-Vega, M. E. (2012) ‘Revisión bibliográfica El ñame (*Dioscorea spp.*). Características , usos y valor medicinal . Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo’, *Cultivos Tropicales*, 33(4), pp. 5–15.
  30. González Leija, L. A. (1978) ‘Algunas investigaciones sobre la domesticación del barbasco’, *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, pp. 48–64.
  31. Gulnar Yasybaeva, Zilya Vershinina, Bulat Kuluev, Elena Mikhaylova, A. B. y A. C. (2017) ‘Biostimulated plasmid-free transformation for induction of hairy roots in tobacco plants’, *Plant Root*, 1918, pp. 119–124.
  32. Han, B. *et al.*, (2012) ‘ZmHO-1, a maize haem oxygenase-1 gene, plays a role in determining lateral root development’, *Plant Science*, 184, pp. 63-74.
  33. Hanafy, M. S., Asker, M. S. y El-shabrawi, H. (2018) ‘*Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation in *Cichorium spp.* : hairy root

- production , inulin and total phenolic compounds analysis’, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Taylor y Francis, 0(0), pp. 1–9.
34. Hata, Y. *et al.* (2003) ‘Evaluacion del contenido de saponinas en variedades nativas de ñame (*Dioscorea ssp*), provenientes dela colección de la Universidad de Córdoba’, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 32(2), pp. 149–157.
35. Hinke, N. (2008) ‘El barbasco’, *Ciencias*, 86(enero-marzo), pp. 54–57.
36. Huang, H. *et al.* (2016) ‘Food hydrocolloids preparation , physico e chemical characterization and biological activities of two modified starches from yam ( *Dioscorea Opposita* Thunb .)’, *Food hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 55, pp. 244–253.
37. Itokawa, H. *et al.* (2008) ‘Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery’, *Jurnal of Natural Medicines*, 62, pp. 263–280.
38. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W. (1987) ‘GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.’, *The EMBO Journal*, 6(13), pp. 3901–7.
39. Kim, J. K. y Park, S. U. (2018) ‘An update on the biological and pharmacological activities of diosgenin’, *Experimental and Clinical Sciences*, 17(January), pp. 24–28.
40. Kuklinski, C. (2003) *Farmacognosia : estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega. pp. 230-275.
41. Kumar, A. *et al.* (2014) ‘Rapid protocol for callus induction and differentiation of roots and shoots in *Dioscorea alata* a medicinal plant’, *Indian Journal of Agricultura Sciences*, 84(1), pp. 107–111.
42. Kumar, A., Chand, S. y Charu, G. (2017) ‘Rapid, efficient direct and indirect regeneration protocol of *Dioscorea deltoidea* Wall’, *National Academy Science Letters*. Springer India, 40(4), pp. 237–240.
43. Kumar, V., Desai, D. y Shriram, V. (2014) ‘Hairy root induction in *Helicteres isora* L . and production of diosgenin in hairy roots’, *Naural Products and Bioprospecting*, 4, pp. 107–112.
44. Li, M. *et al.* (2014) ‘A protocol for *in vitro* production of microtubers in

- Chinese yam ( *Dioscorea opposita* ), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Taylor y Francis, 78(6), pp. 1005–1000.
45. Lopez-Sanchez, G., Medina-Acevedo, J. C. y Ramirez-Soto, R. (1972) ‘Spectrophotometric determination of diosgenin in *Dioscorea composita* following thin-layer chromatography’, *Analyst*, 97(December), pp. 973–976.
46. Ludwig-müller, J. y Cohen, J. D. (2002) ‘Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*’, *Physiologia Plantarum*, 115, pp. 320–329.
47. Maldonado-Garcia, H. J. *et al.* (2012) ‘Estudio de sapogeninas esteroidales de especies peruanas del género *dioscorea*’, *Revista de la Sociedad Quimica de Peru*, 78(3), pp. 208–218.
48. Marker, R. E., Tsumamoto, T. y Turner, D. L. (1940) ‘Esteroles. C. Diosgenina’, *Contribution from the school of chemistry and physics of the pennsylvania state college and from the pharmazeut. Institut und d. Klinikum apotheke d. Medizin. Fakultat zu kanazawa, Japan*, 62(7), pp. 2525–2532.
49. Marks, L. (1997) ‘Historia de la pildora anticonceptiva’, *Centre for History of Science, Technology and Medicine Imperial College*.
50. Martínez-DelaCruz, E. *et al.* (2015) ‘Auxins differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings’, *Journal of Plant Physiology*. Elsevier GmbH., 176, pp. 147–156.
51. Martinez, M., Cabrera, J. L. y Herrera-Estrella, L. (2004) ‘Transgenic plants: a complete vision’, *e-Gnosis*, 2(2).
52. Merkli, A., Christen, P. y Kapetanidis, I. (1997) ‘Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. ’, *Plant Cell Reports*, 16, pp. 632–636.
53. Montes, E. *et al.* (2008) ‘Modelado de la cinética de secado de ñame (*Dioscorea rotundata* ) en capa delgada’, *Revista ingeniería e investigación*, 28(2), pp. 45–52.
54. Murashige, T. y Skoog, F. (1962) ‘A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures’, *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473–497.

55. Mwirigi, P. N. *et al.* (2010) 'In vitro propagation of the Kenyan yam (*Dioscorea spp.*)', *African Journal of Horticultural Sciences*, 3, pp. 112–122.
56. Myszka, H. *et al.* (2017) 'Diosgenyl 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-galactopyranoside: synthesis, derivatives and antimicrobial activity', *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13, pp. 2310–2315.
57. Naskar, K. K. y Mishra, O. (2018) 'Action of Diosgenin and homoeopathic pathogenesis of *Dioscorea villosa*', *Indian Journal of Research in Homoeopathy*, pp. 5–11.
58. Nester, E. W. (2015) 'Agrobacterium: nature's genetic engineer', *Frontiers in Plant Science*, 5(january).
59. Nunez-Palenius, G., H. *et al.* (2005) 'Methods in plant tissue culture hector', in *Plant and Animal Food Applications and Functional Foods*, pp. 551–603.
60. Nwafor, F. I. *et al.* (2018) 'Ethnobiological study of traditional medicine practices for the treatment of chronic legulcer in South eastern Nigeria', *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 17(January), pp. 34–42.
61. Olivares, F. L. (2001) 'El origen de Syntex, una enseñanza histórica en el contexto de ciencia, Tecnología Y Sociedad', *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(2), pp. 93–96.
62. Oncina, R. *et al.* (2000) 'Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum L.*', *Food chemistry*, 70, pp. 489–492.
63. Palacios-Cortez, A. (2010) *Induccion y multiplicacion de callos de barbasco (Dioscorea composita)*. Universidad Veracruzana.
64. Pérez-Molphe-Balch, E. (2009) 'Curso: cultivo de tejidos vegetales'. *Universidad Autonoma de Aguascalientes*. pp. 25-29
65. Peteros, N. P. y Uy, M. M. (2010) 'Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of four Philippine medicinal plants', *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(5), pp. 407–414.
66. Piñol, M. T. (1999) 'XIII Reunión de la sociedad española de fisiología y VI congreso hispano-luso de fisiología vegetal', pp. 22–24.
67. Poornima, G. N. y Ravishankar, R. V (2007) 'In vitro propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn)', *African*

- Journal of Biotechnology*, 6(20), pp. 2348–2352.
68. Rahman, Z. A. *et al.* (2017) ‘Optimization of various factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of putative transgenic Malaysian MR219 rice with *Bacillus* SP 289 endo-  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase gene’, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(9), pp. 690–695.
69. Rodríguez-Hernández, G. *et al.* (2007) ‘Generación de raíces transformadas de *Agave salmiana* otto y su colonización por *Glomus intraradices*’, *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(3), pp. 215–222.
70. Ron, M. *et al.* (2014) ‘Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model’, *Plant Physiology*, 166(October), pp. 455–469.
71. Rothrock, J. W., Hammes, P. A. y McAleer, W. J. (1957) ‘Isolation of diosgenin by acid hydrolysis of saponin’, *Industrial and Engineering chemistry*, 49(2), pp. 186–188.
72. Royera, M., Vargas, T. E. y Oropeza, M. (2007) ‘Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ñame)’, *Interciencia*, 32(4), pp. 247–252.
73. Saini, H. *et al.* (2016) ‘Interspecific crossing between yam species (*Dioscorea rotundata* and *Dioscorea bulbifera*) through *in Vitro* Ovule Culture’, *American Journal of Plant Sciences*, 7(June), pp. 1268–1274.
74. Salazar, R. y Hoyos, R. (2007) ‘Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal.’, *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 60(2), pp. 3907–3921.
75. Samy, B. G., Jegatheesan, K. and Francina, C. I. (2017) ‘*In-vitro* propagation of *Dioscorea alata* for tyrosinase production’, *Journal of Applied Biology y Biotechnology*, 5(2), pp. 85–88.
76. Sanchez-Cruz, M. S., Fernandez-Cardona, H. y Esteban-Garcia, C. A. (2008) ‘Caracterización agromorfológica de cultivares de ñame (*Dioscorea spp.*), procedentes del suroccidente de Guatemala y efecto de su variabilidad como espesante de salsas caseras’. *Universidad de San Carlos de Guatemala*. pp. 7-

77. Sato, Y. y Latham, G. (1953) 'The isolation of diosgenin from *Solanum Xanthocarpum*', p. 5905.
78. Seal, S. y Muller, E. (2007) 'Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam badnavirus from *Dioscorea sansibarensis*', *Archives of Virology*, 152(4), pp. 819–825.
79. Segura-Gomez, A. y Carrizales-Navarrete, S. (1983) 'Efecto de la fermentación sobre la concentración de Diosgenina en el rizoma de barbasco', *Revista Riencia Forestal*, 8(46).
80. Singh, I., Gautam, Y. K. y Vimala, Y. (2013) 'Detection and isolation of diosgenin from *Costus Speciosus* callus raised from non-germinal seeds', *International Journal Chemical and Life Sciences*, 2(10), pp. 1240–1242.
81. Son, I. S. *et al.* (2007) 'Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin , a steroidal saponin of yam ( *Dioscorea spp.*), on high-cholesterol fed rats', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(12), pp. 3063–3071.
82. Sosa, V., Schubert, B. G. y Gómez-Pompa, A. (1987) 'Dioscoreaceae', *Flora de Veracruz*, pp. 1–46.
83. Tzfira, T. y Citovsky, V. (2008) *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer. pp.3-5
84. Valencia-Ortiz, C. (1995) *Fundamentos de fitoquímica*. Trillas. pp. 107-117
85. Villalobos-Amador, E., Rodriguez-Hernandez, G. y Perez-Molphe-Balch, E. (2002) 'Organogenesis and *Agrobacterium rhizogenes* induced rooting in *Pinus maximartinezii* Rzedowsky y *P. pinceana* Gordon', *Plant Cell Reports*, 20, pp. 779–785.
86. Wang, H., Shi, S. y Wang, S. (2018) 'Can highly cited herbs in ancient Traditional Chinese medicine formulas and modern publications predict therapeutic targets for diabetes mellitus ', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd, 213(October 2017), pp. 101–110.
87. Wang, W. *et al.* (2014) 'The effects of diosgenin in the regulation of renal proximal tubular fibrosis', *Experimental Cell Research*, pp. 1–8.
88. Yan, H., Yang, L. y Li, Y. (2011a) 'Axillary shoot proliferation and tuberization

- of *Dioscorea fordii* Prain et Burk', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(2), pp. 193–198.
89. Yan, H., Yang, L. y Li, Y. (2011b) 'Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system', *African Journal of Biotechnology*, 10(83), pp. 19444–19448.
90. Yi, T. *et al.* (2014) 'Comparative analysis of diosgenin in *Dioscorea* species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS', *BMC Biochemistry*, 15(19).

## **VII. ANEXOS**

### **Anexo 1: Tratamientos de desinfección**

#### **Tratamiento de desinfección 1**

1. Lavado con agua destilada estéril y Twin 20 durante 20 minutos en agitación constante
2. 2 enjuagues con agua destilada estéril.
3. Repetir paso 1 y 2.
4. Mantener los explantes en reposo con Microdyn durante 10 minutos.
5. 2 enjuagues con agua destilada estéril
6. Lavado con etanol al 70% durante un minuto
7. 2 enjuagues con agua destilada estéril
8. A partir de esta etapa se manejará en campana. Un lavado con Cloralex al 20% durante 20 minutos aplicando un sitio de vacío
9. 2 enjuagues con agua destilada estéril
10. Colocar los explantes en el medio de cultivo

#### **Tratamiento de desinfección 2**

1. Lavado con agua destilada estéril y Twin 20 durante 20 minutos en agitación constante
2. 2 enjuagues con agua destilada estéril.
3. Repetir paso 1 y 2.
4. Mantener los explantes en reposo con Microdyn durante 10 minutos.
5. 2 enjuagues con agua destilada estéril
6. Lavado con etanol al 70% durante un minuto
7. 2 enjuagues con agua destilada estéril
8. A partir de esta etapa se manejará en campana. Un lavado con Cloralex al 20% durante 30 minutos aplicando un sitio de vacío
9. 2 enjuagues con agua destilada estéril
10. Colocar los explantes en el medio de cultivo

**Tratamiento de desinfección 3**

1. Lavado con agua destilada estéril y Twin 20 durante 60 minutos en agitación constante.
2. 2 enjuagues con agua destilada estéril.
3. Lavado con agua destilada estéril y Twin 20 durante 20 minutos en agitación constante
4. 2 enjuagues con agua destilada estéril.
5. Mantener los explantes en reposo con Microdyn durante 50 minutos.
6. 2 enjuagues con agua destilada estéril
7. Lavado con etanol al 70% durante un minuto
8. 2 enjuagues con agua destilada estéril
9. A partir de esta etapa se manejará en campana. Un lavado con Cloralex al 20% durante 30 minutos aplicando un sitio de vacío
10. 2 enjuagues con agua destilada estéril
11. Colocar los explantes en el medio de cultivo

## Anexo 2: Soluciones madre para medio MS

### Solución de macronutrientes (10X)

g/L	
$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	16.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7
$\text{KNO}_3$	19.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7

### Solución de calcio (10X)

g/L	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4

### Solución de micronutrientes (1000X)

g/L	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{KI}$	0.83

**Solución Fe-EDTA (100X)**

	<b>g/L</b>
<b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	2.78
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	3.73

**Solución de vitaminas (100X)**

	<b>g/L</b>
<b>myo- Inositol</b>	100
<b>Tiamina HCl</b>	0.1
<b>Acido nicotínico</b>	0.5
<b>Glicina</b>	2.0
<b>Piridoxina HCl</b>	0.5

El medio MS se elabora adicionando:

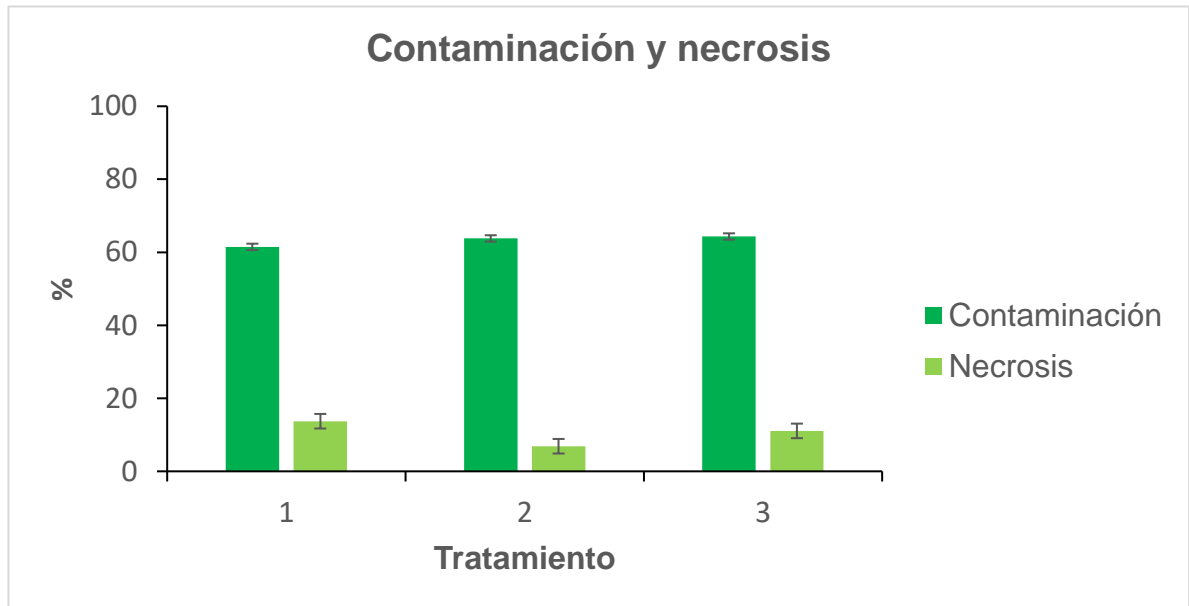
- 100 ml del stock de macronutrientes.
- 100 ml del stock de Ca.
- 1 ml del stock de micronutrientes.
- 10 ml de la solución hierro EDTA.
- 10 ml del stock de vitaminas.

En agua destilada, y aforando en un litro.

**Anexo 3: Tablas de contaminación y necrosis en cada tratamiento de desinfección y grafica de los totales.**

Tratamiento	Contaminación (%)			Media por tratamiento
	Réplica			
	1	2	3	
<b>1</b>	71.794	62.500	67.690	61.490 ( $\pm 9.92$ ) <sup>A</sup>
<b>2</b>	52.000	65.000	63.7930	63.796 ( $\pm 1.25$ ) <sup>A</sup>
<b>3</b>	60.674	63.888	61.490	64.324 ( $\pm 3.13$ ) <sup>A</sup>

Tratamiento	Necrosis (%)			% por tratamiento
	Replica			
	1	3	3	
<b>1</b>	7.6923	10.4166	9.6774	13.725 ( $\pm 6.15$ ) <sup>A</sup>
<b>2</b>	20	3.33333	11.4285	6.875 ( $\pm 3.54$ ) <sup>A</sup>
<b>3</b>	13.4831	6.875	12.1212	11.076 ( $\pm 1.25$ ) <sup>A</sup>



Gráfica del porcentaje contaminación y necrosis presentado en cada uno de los tratamientos de desinfección.