

1984

80658567

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



PROPAGACION DE *Canavalia ensiformis* POR  
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES E IMPLEMENTACION  
DEL LABORATORIO

AUTOR: MARIA DEL CARMEN BAYARDO PRIETO

## INDICE

I.- INTRODUCCION

II.- OBJETIVOS

III.- MATERIAL Y METODOS

- a) Obtención de plantas madres.
- b) Sección de la planta para obtención de explantes.
- c) Obtención de explantes.
- d) Siembra de explantes.
- e) Medios de cultivo.
- f) Esterilización de material.

IV.- RESULTADOS y DISCUSION

V.- CONCLUSIONES

VI.- BIBLIOGRAFIA

VI.- ANEXO

OP.

## INDICE DE ABREVIACIONES

CIATEJ.- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y  
Diseño del Estado de Jalisco.

IAA.- Ac. indol-3-acético.

EAP.- 6-benziladenina.

2-4.D.- Ac. 2-4, diclorofenoxiacético.

MS.- Medio de cultivo Murashige & Skoog.

B5.- Medio de cultivo Gamborg et. al.

### INDICE DE TABLAS:

- TABLA 1.- Características físicas y químicas de los reguladores de crecimiento utilizados en cultivos "in vitro".
- TABLA 2.- Soluciones madres de los reguladores de crecimiento.
- TABLA 3.- Características fenotípicas de las plantas madres.
- TABLA 4.- Crecimiento de los callos en el medio Mdauc.
- TABLA 5.- Crecimiento de los callos en el medio MS.
- TABLA 6.- Producción de brotes y raíz en el medio MS.
- TABLA 7.- Crecimiento de los callos en el medio B5.
- TABLA 8.- Producción de brotes en el medio B5.
- TABLA 9.- Porcentaje de crecimiento de los callos de tallo en los diferentes medios y reguladores de crecimiento.
- TABLA 10.- Porcentaje de crecimiento de los callos de pecíolo en los diferentes medios y reguladores de crecimiento.
- TABLA 11.- Porcentaje de crecimiento de los callos de ápice en los diferentes medios y reguladores de crecimiento.
- TABLA 12.- Porcentaje de crecimiento de los callos de hoja en los diferentes medios y reguladores de crecimiento.
- TABLA 13.- Porcentaje de crecimiento de los callos de pétalo en los diferentes medios y reguladores de crecimiento.
- TABLA 14.- Porcentaje de producción de brotes y raíces.

## INTRODUCCION

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales iniciaron con los descubrimientos de Sacko y Knops en 1860, quienes observaron que las sustancias más importantes absorbidas por las plantas eran los compuestos inorgánicos y en base a estas observaciones elaboraron una sustancia nutritiva llamada solución "knops" y empleada como componente básico en los medios de cultivo. (23)

Los primeros descubrimientos dentro del área de cultivo de tejidos vegetales "in vitro" se remontan a principios de siglo. En 1902 el alemán G. Haberlandt utilizando el medio de Knops obtuvo pequeñas masas celulares de jitomate pero no obtuvo multiplicación celular a causa de la sencillez del medio de cultivo. Durante el año de 1926, Went descubre las auxinas (fitohormonas). En 1934 White marca la importancia de las vitaminas para el crecimiento de algunas raíces y en 1949 Linasset y Cournuet publican sus observaciones sobre la ausencia de virus en meristemas aislados de tabaco viroso. (1,23)

A principios de los años 50s se generaliza el uso del agua de coco dentro de los medios de cultivo y en el año de 1955 Skoog y sus colaboradores buscaron el factor de la división celular, encontrándolo en preparaciones de DNA. Este factor fue aislado e identificado como 6-furfurilaminopurina llamándolo también Kinetina. En los años de 1957-1960 se encontró que los callos transferidos a medios líquidos producían una suspensión que se podía propagar a través de subcultivos. (23,6,26)

Durante la década de los 60s se practicaron cultivos de anteras produciendo gran cantidad de embriones haploides además de aislar y cultivar protoplastos. Dentro de los años 70s se probó la regeneración de plantas completas a partir de una sola célula, la micropropagación de plantas a partir de protoplastos y la fusión de protoplastos para la regeneración de híbridos. A principios de los años 80s se multiplicó la micropropagación de diferentes plantas tales como ornamentales, frutales y forestales.(17)

El cultivo de tejidos vegetales se refiere al cultivo "in vitro" de todas las partes de la planta bajo condiciones asépticas. Debido a el principio de totipotencia, el cual marca que cada célula dentro de la planta tiene el potencial para regenerar la planta completa igual a la que proviene si es provista de las condiciones adecuadas, ya que un organismo multicelular es el resultado de muchas divisiones sucesivas manteniendo así a toda la planta con la misma información genética.(1)

Los cultivos " in vitro " pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de una planta, como las hojas, el tallo;el meristemo, el embrión, la flor, etc. Sin embargo, la fuente inicial es determinante para el mayor éxito en los cultivos. Es necesario utilizar plantas sanas y vigorosas como fuente donadora; seleccionar las partes más jóvenes y tener en cuenta el tamaño de la sección que se pretende sembrar.

La sección de la planta separada y desinfectada mediante un tratamiento para eliminar los microorganismos que se encuentran en su superficie se llama "explante" del cual se puede iniciar un cultivo. La presencia de los microorganismos es indeseable ya que su tiempo de multiplicación es mucho más corto que el de las células vegetales y al desarrollarse agotan los nutrientes del medio de cultivo, además de que pueden liberar al medio ciertos productos tóxicos impidiendo el buen desarrollo del tejido vegetal (17,12).

Para la esterilización de material vegetal, existen gran cantidad de compuestos químicos entre los que se encuentran:(1,23,24)

- hipoclorito de sodio.
- hipoclorito de calcio.
- dicloruro de mercurio.
- bactericidas y fungicidas.
- etanol 70-80 %.

Después de la esterilización y la siembra en los medios adecuados los explantes pueden dar lugar a diferentes tipos de desarrollo:

- a) Callo.- masas de células producida por divisiones celulares desorganizadas.
- b) Células aisladas.- cultivadas en medios líquidos para iniciar el aislamiento a partir de callos.
- c) Organogénesis.- división organizada de tallos ó raíces.
- d) Embriogénesis.- división organizada del embrión.
- e) Protoplastos.- producción de células sin pared celular.

Todos ellos dan lugar a plantas completas idénticas a aquella de la que fueron tomados los explantes.(6)

Para el buen desarrollo que se pretende dar a un cultivo " in vitro " son muy importantes las condiciones ambientales, entre ellas se encuentran principalmente la luz y la temperatura. La luz debe ser blanca, fluorescente, teniendo una intensidad luminosa de 40 watts. De acuerdo a las experiencias previas se sugiere una distancia de 50 cm. entre las preparaciones y las lámparas. Además es necesario proporcionar un fotoperíodo adecuado. En cuanto a la temperatura de las cámaras de incubación es habitualmente constante, para la mayoría de las plantas ésta se sitúa muy cercana a los 27 gC.(1,4,21)

Respecto a las condiciones nutricionales, los medios de cultivo pueden ser semisólidos ó líquidos, dependiendo del propósito particular, al igual del pH adecuado, el cual varía en un rango

de 5.5 a 6.0 generalmente. Ellos contienen sales minerales que incluyen elementos tales como: cloruros, sulfatos, yoduros, fosfatos y nitratos que se pueden almacenar en soluciones concentradas llamadas soluciones stock de las cuales se toma la cantidad necesaria para la concentración adecuada del medio. (8,11,24)

La composición mineral de un medio de cultivo se basa en el equilibrio preciso de los diferentes iones en solución. La diferencia de los medios de cultivo consiste en la variación de las concentraciones de las sales minerales como aumento en la concentración de nitrógeno como nitratos o amonio, del hierro, potasio, calcio y el magnesio que son tan importantes en el metabolismo de las plantas. La fuente de carbono también es de gran importancia dentro del medio de cultivo utilizando generalmente la sacarosa y usando una concentración aproximada de 20 gr por litro. (12,23,24)

Las vitaminas también tienen gran importancia ya que favorecen el desarrollo de los cultivos "in vitro", las más empleadas son aquellas que pertenecen al grupo B:

- Vitamina B<sub>1</sub> ó tiamina-HCl, se descompone en el autoclave pero los productos de su degradación son también activos para el crecimiento vegetal.
- Vitamina B<sub>6</sub> ó piridoxina-HCl, es termorresistente e importante en el crecimiento de las células.
- Mio-inositol aunque no es una vitamina propiamente tiene efectos estimulantes en la formación de varios constituyentes celulares que intervienen en la división celular.
- Vitamina E, ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y de células en suspensión. (23)



Las fitohormonas, llamadas también reguladores de crecimiento a causa de que actualmente existen naturales y sintéticas, se dividen en 3 categorías: auxinas, citocininas y giberelinas. En la TABLA No.1 se muestran algunas de sus propiedades.

El agua utilizada en el cultivo de tejidos para preparar medios y soluciones debe ser destilada y desionizada, cuidando de no almacenarla más de 1 semana.(23)

El agar-agar usado como sistema de soporte presenta diferentes ventajas ya que es estable a un rango amplio de temperaturas además de no ser digerido por las enzimas de la planta y no reacciona con los constituyentes del medio; también se han utilizado otros materiales de soporte como papel filtro y membranas.(23)

Se encuentran también otros suplementos utilizados en los medios tales como el extracto de levadura, jugos y extractos de varias frutas como plátano, jitomate y agua de coco, también antioxidantes como el ácido ascórbico y absorbentes como el carbón activado.(23)

De esta propiedad de regenerar plantas completas a partir de células es donde se establece el potencial del cultivo "in vitro" como una herramienta en diferentes áreas como la micropropagación, conservación de germoplasma, mejoramiento genético, investigación básica, etc.(15)

**Micropropagación.-** Multiplicación asexual "in vitro" a partir de un explante mediante la inducción de la embriogénesis o la organogénesis. Actualmente en México es en esta área donde se presentan más aplicaciones inmediatas, en la solución de problemas de la producción agrícola nacional, farmacéutica y la explotación comercial de plantas ornamentales. Aplicándola a especies con alguna característica sobresaliente, de ciclo reproductivo largo o plantas con valor comercial importante.(15)

**Conservación de germoplasma.**- Es importante para la conservación de materiales que se propagan vegetativamente o que producen semillas recalcitrantes, además de algunas especies que se encuentran en peligro de extinción a causa de la contaminación ambiental, agricultura masiva ó sobre-explotación de los recursos naturales. (15)

**Mejoramiento genético.**- Sometiendo las células vegetales a condiciones controladas de sales, inhibidores, toxinas donde se desarrollen características de adaptación ó resistencia, estas variantes permiten seleccionar métodos de fitomejoramiento. (15)

**Investigación Básica.**- Como herramienta en la investigación de la biología vegetal, fisiología vegetal, genética vegetal y patología vegetal, presentando diferentes ventajas como el trabajar con células genéticamente homogéneas, reducción del tiempo en la duración de experimentos genéticos, permitiendo la manipulación de variables químicas y físicas. Desde el punto de vista práctico el cultivo de tejidos vegetales contribuye en la multiplicación y mejoramiento de plantas útiles. (15)

Estas técnicas aplicadas a la agronomía han originado nuevas variedades, gracias a las recombinaciones genéticas a partir de protoplastos y una rápida multiplicación. En la industria farmacéutica la aplicación más importante es la obtención de diferentes sustancias como enzimas o alcaloides para la producción de fármacos. Algunas enzimas, de origen vegetal, juegan un papel muy importante en la industria farmacéutica, destinadas a resolver problemas de salud. Este tipo de enzimas pueden usarse en la determinación de algunas sustancias biológicas usuales en el cuerpo humano y que en la industria farmacéutica se conocen como reactivos de diagnóstico. (16)

TABLA No.1

CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS EN CULTIVOS " IN VITRO ".

NOMBRE

AUXINAS: ABEVIACION NATURALEZA SOLUBILIDAD ESTABILIDAD ALMACENAMIENTO

Ac.Indol-3-acético (IAA) Natural poco soluble en agua, soluble en etanol al 96%.

poco estable, se degrada por la luz.

A 4-5 C y en la oscuridad.

Ac.naphthalenacético (ANA) Sintética soluble en etanol al 96% y en agua a 17 C

estable a 120 C

4-5 C y en la oscuridad.

Ac.2,4-Diclorofenoxiacético (2,4D) Sintética poco soluble en agua ó soluble en etanol al 96% calentado ligeramente y diluyendo progresivamente con agua.

estable a 120 C

4-5 C y en la oscuridad.

CITOCININAS:

6-Furfurilamino-purina ó Kinetina.

(KIN)

Sintética

soluble en NaOH 1N, HCl 1N.

estable a 120 C, en solución acuosa se degrada por la luz.

4-5 C y en la oscuridad.

6-Benzilaminopurina ó Benziladenina.

(BAP)

Sintética

soluble en NaOH 1N, HCl 1N.

estable a 120 C, en solución acuosa se degrada por la luz.

4-5 y en la oscuridad.

Zeatina

(Z)

Natural

soluble en NaOH 1N, HCl 1N.

estable a 120 C

4-5 C y en la oscuridad.

GIBERELINAS:

Ac. Giberélico

(GA3)

Natural

soluble en etanol al 96% poco soluble en agua.

poco estable se degrada por el calor

en alcohol a 4-5 C y en la oscuridad.

## JUSTIFICACION:

En México la producción de enzimas de uso farmacéutico se ha desarrollado en forma independiente. Las principales enzimas que se emplean en el país, incluyendo la ureasa son de importación y generalmente los importadores tienen poco control sobre las condiciones de los procesos, de producción y de supresión. (15)

La presente investigación se enfoca a la especie Cana valia ensiformis. Esta planta se reconoce también por los nombres comunes de:

- Pois sabre
- Jack bean
- Sword bean
- One Eye bean
- Horse gram
- Feijoa de porco

Es originaria de los trópicos de América Central y del Sur. Se adapta bien a los lugares húmedos como bosquecillos y alrededores de ríos, aunque es resistente a la sequía. (3,9)

Logra una altura de 1 a 2 mts., las hojas tienen forma oval, sin pubescencia, de 7 a 20 cm. de largo y de 4 a 10 cm. de ancho, las flores son blancas con manchas rosas ó purpúreas, la floración se presenta después de los 3 meses de cultivo. Las vainas son de 15 a 30 cm. de largo y de 2.5 a 5 cm. de ancho, pueden contener de 10 a 20 semillas blancas elípticas de 1.5 a 2 cm.

Es utilizada principalmente como abono verde y para hacer forraje. Puede utilizarse también en alimentación para ganado (semillas inmaduras) en combinación con sorgo. Sin embargo, debido a la presencia de 4 toxinas (ureasa, canavanina y concanavalina A y B) no debe constituir más del 10% de la ración. (9,10,14)

El alto contenido de estas sustancias hacen al frijol de Canavalia ensiformis de gran interés en la industria farmacéutica. Su aplicación más importante estriba en la producción de fármacos.

## SISTEMATICA

Basándose en : Cronquist, A., 1980. (5)

DIVISION: Magnoliophita.

CLASE: Magnoliopsida.

ORDEN: Rosales.

FAMILIA: Leguminosae.

SUBFAMILIA: Papilionaceae.

GENERO: Canavalia.

ESPECIE: ensiformis.

## OBJETIVOS

- \* DISEÑAR E IMPLEMENTAR EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.
- \* IMPLEMENTAR LAS TECNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES PARA EL FRIJOL CANAVALIA ENSIFORMIS.

## MATERIAL Y METODOS

### OBTENCION DE PLANTAS MADRES:

Las plantas utilizadas en esta investigación se obtuvieron de semillas adquiridas por nuestro laboratorio. Estas semillas fueron germinadas en algodón y posteriormente las plántulas se trasladaron a un terreno de 10 X 10 metros, que se localiza dentro de las instalaciones de CIÁTEJ.

El terreno se encuentra cercado para mayor control de maleza y plagas, además se preparó mezclando la tierra anterior con 8 bolsas de tierra de hoja. Después de adecuar el lugar se prepararon los surcos y se instalaron las estacas y el alambre que servirían de apoyo.

Se inició la siembra de los frijoles en los surcos después de haberlas germinado sobre algodón en el laboratorio durante 3 semanas. Los surcos se hicieron con una distancia de 50 cms entre cada uno y las semillas se sembraron a una distancia de 27 cms cada una, teniendo aproximadamente 9 semillas por metro cuadrado.

Cada 15 días se aflojó la tierra de los surcos para evitar la formación de nidos de plagas; cada 3 meses se abonó con fertilizante NPK triple 17.

Los primeros botones florales aparecieron 3 meses después de la siembra y el inicio de la floración fue a los 15 días después de la aparición de los botones florales. A los 9 meses después de la siembra se inició la cosecha durando solamente 1 mes.

Para iniciar la micropropagación de los frijoles, las plantas se seleccionaron de acuerdo a las características fenotípicas deseables basadas en la TABLA No.3



## SECCION DE LA PLANTA PARA OBTENCION DE EXPLANTES:

De las plantas seleccionadas se obtuvieron los tejidos para llevar a cabo la micropropagación. Para ello se escogieron hojas pecíolos, pétalos y tallos (epicotilos e hipocotilos). Todos los tejidos fueron preferentemente jóvenes siendo la edad fisiológica de las plantas determinante en el tipo y la velocidad del desarrollo morfogenético y mostrar mejores respuestas en el cultivo "in vitro", utilizándolas de 40 días ó de medio año.

Los tejidos maduros tienen la ventaja sobre los jóvenes de que provienen de plantas que han mostrado su potencial genético, algo que no ocurre en las plantas jóvenes.

También se sembraron ápices y yemas axilares, ya que estos tejidos son de naturaleza meristemática, no requiriendo de una fase intermedia de formación de callos para la inducción de brotes.

Los inóculos ó explantes, llamados así por la palabra "explant", en inglés, es un fragmento de la planta donadora cultivado asépticamente, cuando es más pequeño hay menos probabilidades de ser contaminado por microorganismos que se encuentren sobre el inóculo, pero también hay menos probabilidades de desarrollo.

Los explantes que en esta investigación se usaron fueron:

- Hojas.- Se obtuvieron de las plantas madres, estas presentaron un tamaño de 1 a 1.5 cm. de largo por 0.3 a 0.5 mm. de ancho, siendo estas hojas las más jóvenes de la planta. Se cuidó de que no estuvieran plagadas ó maltratadas por causas físicas; también se usaron hojas de mayor tamaño ó sea de 3 cm. de largo por 2 cm. de ancho.

- Tallos.-Se obtuvieron de dos tipos de plantas madres, unas fueron de una edad de 20 días y otras de medio año. de las plantas de medio año se cuidó que los tallos no fueran leñosos y que fueran los más juvenes de ellas. De las plantas de 20 días se utilizó todo el tallo dividiéndolo en hipocotilos y epicotilos.
- Pecíolos.-los pecíolos se separaron de las hojas y los tallos, utilizándolos generalmente completos a causa de su tamaño, pero algunas veces se dividieron en dos secciones.
- Flor.- De la flor solamente se utilizaron los pétalos, tomando en consideración otras experimentaciones de las cuales se han obtenido brotes a partir de tal explante; por ejemplo en el crisantemo.
- Yemas.- Se utilizaron tanto las axilares como las apicales, de estas no se obtuvieron meristemas aislados.

#### OBTENCION DE EXPLANTES:

Para la obtención de callos o brotes es importante conocer el origen del explante y la planta madre de la cual provienen.

En el presente trabajo se utilizó toda la planta en un periodo de crecimiento de aproximadamente 40 días o secciones de plantas de medio año, estas secciones fueron hojas, tallos, flores, pecíolos, yemas axilares y apicales.

Después de separar las diferentes secciones de la planta madre se aislaron dichas secciones marcándolas para mantener la posición en la que se encontraban en la planta, posteriormente se lavaron cuidadosamente con un cepillo y con agua corriente, para remover la mayor cantidad de tierra posible y se separaron las hojas, pecíolos, tallos, pétalos y yemas axilares utilizando un bisturí y en algunos casos el microscopio estereoscópico.

Utilizando una campana de flujo laminar, los órganos se lavaron durante 2 minutos en alcohol etílico al 70% y se mantuvieron durante 15 minutos en hipoclorito de sodio al 50%, los órganos fueron lavados 4 veces con agua destilada estéril para removerlo y se mantuvieron en ella para que no se deshidrataran las secciones.

Estas concentraciones y tiempos se mantuvieron constantes durante esta investigación después de haber sido probadas diferentes alternativas y comprobar cuales eran las óptimas.

Para la obtención de ápices y yemas axilares se utilizó un microscopio estereoscópico, después de haberse limpiado con alcohol etílico al 70%.

Los tallos, pecíolos y hojas de mayor tamaño se sacaron del agua individualmente y se secaron con papel filtro estéril antes de ser cortados y obtener los explantes de un tamaño de 0.3 a 0.5 cm. de largo en los tallos. Las hojas se cortaron en 6 u 8 secciones de un tamaño de 0.5 a 0.8 cm. de largo y manteniendo su posición para mantener la forma de la hoja. Los pecíolos por ser pequeños solo unos pocos fueron cortados en dos partes, siendo generalmente el explante el pecíolo completo, los pétalos se aislaron de la flor completa después de su esterilización para que no se maltrataran; al igual que los pecíolos, no se cortaron siendo estos los explantes completos.

El bisturí y las pinzas se flamearon antes de realizar los cortes, teniendo el cuidado de pasar una sola vez el bisturí sobre los órganos para no dañar los tejidos internos.

#### **SIEMBRA DE EXPLANTES:**

Acumulados algunos explantes se sembraron en las cajas de petri conteniendo 20 ml de los medios de cultivo Mdauc, MS 6 B5, los cuales contienen los requerimientos necesarios para el desarrollo, suplementados con reguladores de crecimiento además de las vitaminas y la fuente de carbono.

En cada caja de petri se colocaron de 16 a 20 explantes manteniendo la posición y secuencia que tenían al formar parte del tallo en la planta completa, además de tener cuidado de no introducir gran parte del explante en el agar pero el suficiente para que funcione este como soporte.

Al alcanzar los explantes un tamaño de 0.3 a 1.0 cm. se resembraron en tubos de vidrio para proporcionar espacio para su continuo crecimiento y después de que se diferenciaron las hojas y cuando el desarrollo del tallo alcanzado un tamaño de 2 a 3 cm. de largo se resembraron a un medio adecuado para iniciar la formación de la raíz.

#### **MEDIOS DE CULTIVO:**

Los medios de cultivo en general se encuentran constituidos por diferentes componentes como las sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, una fuente de carbono, agua y agar aunque algunos pueden ser complementados con diferentes productos como: el agua de coco, jugos de frutas (jitomate, piña y plátano), ácido ascórbico ó carbón activado.

Los medios se prepararon a partir de soluciones orgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento y sales inorgánicas concentradas.

Para reducir pasos en la preparación de un medio de cultivo y para aumentar la precisión pesando cantidades específicas de sustancias muy pequeñas, se prepararon soluciones concentradas de muchos de los ingredientes (sales inorgánicas, orgánicas, vitaminas y reguladores de crecimiento). Varias sustancias pueden ser combinadas para minimizar el número de soluciones concentradas.

Para preparar las soluciones concentradas se consideraron varios factores importantes:

- Sales minerales.- Algunas son incompatibles con otras a ciertas concentraciones y se precipitan, por lo que se prepararon individualmente.
- Compuestos orgánicos.- Generalmente estos son solubles en agua y en algunos casos la solubilidad aumenta al calentarla un poco.
- Reguladores de crecimiento.- También se prepararon en soluciones concentradas, utilizando: IAA, BAP, 2-4,D.

La estabilidad de las soluciones concentradas varía, ciertas pueden ser almacenadas por tiempo indefinido a la temperatura ambiente, otras se refrigeran, ó se congelan y algunas más deben ser preparadas cada vez que se utilizan.

El pH de los medios se ajustó a 5.7 con HCL ó NaOH 1N.

El agar se adiciona después de ajustar el pH y se calienta el medio hasta que se disuelva.

La esterilización del medio se lleva a cabo en autoclave a 121 gC durante 15 minutos.

Los medios de cultivo utilizados en esta investigación fueron:

- Medio Mdauc.
- Medio Murashige and Skoog (MS).
- Medio Gamborg et al. (B5).

Los cuales fueron suplementados con los siguientes reguladores de crecimiento: IAA, BAP, 2-4,D

TABLA No.2

SOLUCIONES MADRES DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

REGULADOR DE CRECIMIENTO	ABREV.	PM	CONCENTRACION UTILIZADA/
Ac. indol-3 acetico	IAA	175	0.01 M
Ac. 2-4,di_ clorofenoxi_ acetico	2-4,D	221	0.01 M
6-benzilade_ nina	BAP	357	0.01 M

**ESTERILIZACION DEL MATERIAL:**

Una característica esencial del cultivo de tejidos es la conservación del material y medios de cultivo sin contaminación de microorganismos. El medio de cultivo, material de cristalería (empleado en la siembra), instrumentos, agua y otros implementos deben ser esterilizados.

a) Material de cristalería e instrumentos.- La esterilización de estos se realizó en autoclave envuelto en papel de estraza y esterilizado a 121 °C durante 15 a 20 minutos.

Después de esterilizado se colocó en una estufa para secarlo antes de su uso. Los instrumentos metálicos unas veces fueron esterilizados y en ocasiones remojados en etanol al 70% (v/v) y se flameaban, este procedimiento de rutina se efectuó repetidamente en cada manipulación.

b) El agua, siendo uno de los componentes más importantes en el medio de cultivo puede contribuir con mas impurezas que el material de cristalería, para evitar esto se usó agua destilada y desionizada estéril, cuidando de no almacenarla más de una semana.

c) Medios de cultivo.- El medio de cultivo debe ser esterilizado en autoclave en iguales condiciones (121 gC durante 15 minutos) teniendo la debida precaución, ya que algunos componentes del medio como vitaminas, reguladores de crecimiento, urea y otros más son termolábiles, debiendo ser esterilizados por filtración a través de una membrana de 0.45µm).

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS:

MEDIO Mdauc

	g/l
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O -----	0.44
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	0.027
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	0.17
KNO <sub>3</sub> -----	1.90
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	0.37
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -----	1.65
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O -----	2.5 X 10E-6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O -----	2.5 X 10E-5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -----	6.2 X 10E-5
KI -----	8.3 X 10E-4
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O -----	2.2 X 10E-2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O -----	2.5 X 10E-4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	8.6 X 10E-2
Na <sub>2</sub> EDTA -----	0.04
Ac. Nicotínico -----	5 X 10E-4
Piridoxina HCl -----	1 X 10E-4
Tiamina HCl -----	1 X 10E-4
Glicina -----	3 X 10E-3
Sacarosa -----	20.0
Agar-agar -----	5.8
pH -----	5.7



MEDIO MURASHIGE & SKOOG (MS)

	g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O -----	2.75
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	0.17
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	1.06
KNO <sub>3</sub> -----	1.90
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	2.31
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -----	1.65
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O -----	1.5 X 10E-4
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O -----	1.5 X 10E-4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -----	0.04
KI -----	0.01
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O -----	0.11
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O -----	0.02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O -----	0.05
Na <sub>2</sub> EDTA -----	0.23
Ac. Nicotínico -----	5 X 10E-7
Piridoxina HCl -----	5 X 10E-4
Tiamina HCl -----	1 X 10E-4
Glicina -----	2 X 10E-6
Myo-inositol -----	0.1
Sacarosa -----	30.0
Agar-agar -----	7.5
pH -----	5.7

MEDIO GAMBORG et al. (B5)

g/l

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.15
KNO <sub>3</sub>	2.50
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.5 X 10E-5
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2.5 X 10E-5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0 X 10E-3
KI	7.5 X 10E-4
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.5 X 10E-4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0 X 10E-3
Na <sub>2</sub> EDTA	0.04
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.13
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe <sub>9</sub> SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.06

Ac. Nicotínico	2 X 10E-3
Piridoxina HCl	2 X 10E-3
Tiamina HCl	2 X 10E-2
Glicina	0.20
Myo-inisitol	0.20

Sacarosa	25.0
Ágar-agar	7.0

pH	5.7
----	-----

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1.- Instalación del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales:

El laboratorio de cultivo de tejidos iniciaba sus actividades, por lo que se tuvieron que instalar y adaptar los equipos necesarios. Gran parte del equipo empleado en un laboratorio de este tipo, tiene el propósito de controlar las condiciones bajo las cuales se desarrolla un cultivo " in vitro ".

En la instalación de un laboratorio debe existir una organización adecuada de las áreas para su buen funcionamiento. De acuerdo a la literatura (1) y a nuestra experiencia sugerimos un laboratorio con la organización siguiente:

1.- **AREA GENERAL.**- Reservada para la preparación de medios de cultivo. Las mesas equipadas con de gas, agua, corriente eléctrica, vacío y tarjas para el lavado de material. Se deben instalar un máximo de estantes y cajones para almacenar la cristalería, soluciones preparadas y material pequeño.

Dentro de esta área se necesita una balanza granataria, una balanza analítica, un potenciómetro, una parrilla con agitador magnético, un refrigerador y un congelador.

2.- **AREA DE LAVADO.**- Con tarjas suficientes para el material de laboratorio y el autoclave. Estas áreas deberán estar lo más cercanas posible.

3.- **AREA DE CULTIVO.**- De preferencia debe ser sin ventanas, blanca y de fácil limpieza, el clima será controlado por un climatizador que se localice sobre una pared evitando que el aire llegue directamente a los estantes donde se localizan los tejidos manteniendo la temperatura con un termostato.

Los estantes deberán estar acomodados de manera tal que no bloqueen la circulación del aire ni obstaculicen la iluminación a otros estantes

La luz deberá ser fluorescente y de una intensidad constante para evitar al máximo los factores de variación. Siendo las que se utilizaron en esta investigación de 40 watts y a una distancia de 50 cm. entre ésta y los medios de cultivo además de controlarla con un reloj de fotoperíodo.

**4 .- AREA DE SIEMBRA.-** Se mantendrá en condiciones estériles con luz ultravioleta durante 30 min. antes de iniciar la siembra, encontrándose en ella la campana de flujo laminar y el microscopio estereoscópico si es necesario.

La esterilización y el lavado de la cristalería ocupan un lugar importante dentro de la actividad del laboratorio, el agua destilada y el agua desionizada deben tener fácil acceso.

Para almacenar las soluciones stock algunas pueden estar a temperatura ambiente, como sales minerales, solventes, etc. otros productos deben estar almacenados en refrigeración ó congelación y algunos además en la oscuridad.

La figura siguiente presenta un esquema de la distribución de un laboratorio:

SALA DE  
CRECIMIENTO.

SALA DE  
INCUBACION.

SALA DE  
SIEMBRA.

LABORATORIO.

PRIVADO.

Los equipos que se consideraran como fundamentales son:

- a) Potenciómetro.
- b) Balanza analítica y granataria.
- c) Agitadores magnéticos con barras y control de temperatura.
- d) Microscopio estereoscópico.
- e) Centrífuga.
- f) Microscopio de objetivos invertidos.
- g) Campana de flujo laminar.
- h) Cámara fotográfica.
- i) Mecheros bunsen y de alcohol.
- j) Charolas de laboratorio.
- k) Agitadores giratorios ó recíprocos.
- l) Refrigerador.
- m) Congelador.
- n) Incubadoras.
- o) Desionizador de agua.
- p) Destilador de agua.

#### **MATERIAL:**

- Tubos de vidrio de 150 x 25 mm.
- Parafilm.
- Pipetas graduadas.
- Micropipetas.
- Portapipetas.
- Vasos de precipitado de diferentes volúmenes.
- Matraces de diferentes volúmenes.
- Gradillas.
- Pinzas.
- Bisturí.
- Cajas petri.
- Espátulas.
- Algodón.
- Papel filtro.
- Papel aluminio.

## II.- Obtención de la planta Canavalia ensiformis:

La primera actividad que se realizó en CIATEJ, fue obtener las plantas que nos proporcionaran los explantes requeridos para este trabajo. Para ello se adquirieron semillas del frijol Canavalia ensiformis, provenientes de diferentes lugares. Nuestro primer proveedor fue Sigma Chemical Co. en los Estados Unidos y los segundos fueron adquiridos de la isla de la Martinica. Estos últimos dieron los mejores resultados en la germinación y adaptación.

Los frijoles se germinaron en algodón ó tierra de hoja directamente, observándose mejores resultados en los frijoles que se germinaron sobre algodón, el cual se cambiaba diariamente.

Después de su germinación se pasaban a tierra de hoja sobre un soporte cúbico, y se mantenían dentro del laboratorio hasta lograr un tamaño de 20 cm. de altura aproximadamente, para posteriormente pasarlos al terreno tratado especialmente para ellos y que no se vieran afectados por el cambio de sombra a sol. La cosecha se realizó después de 8 meses, en el tiempo que se instalaba y adaptaba el laboratorio.

Después de la cosecha se realizaron más siembras, germinándose y desarrollándose en las mismas condiciones del cultivo anterior. Estas plantas nuevas también se utilizaron como plantas madres para el cultivo " in vitro " cosechando sus frutos a los 6 meses después de su germinación.

La floración inició a los 3 meses después de la germinación para el primer lote sembrado y un poco más de 2 meses para el segundo ó sea los de la cosecha. La floración siguió durante 3 meses y se detuvo cuando se dejó de regar, para la maduración de las vainas ya formadas.

A fin de tener más control sobre la floración se regó abundantemente cuando empezaron a salir los botones florales, para alcanzar el máximo número de flores en el mínimo de tiempo, después de la floración se regó normalmente ya que la fase en que las vainas se desarrollan es crítica la cantidad de agua, permitiendo así la homogeneidad en el crecimiento y su maduración. Los resultados del desarrollo de las plantas se muestran en la TABLA No.3

TABLA No.3

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LAS PLANTAS MADRES:

- Número total de plantas -----	90
- Plantas con vainas -----	36
- Plantas sin vainas -----	54
- Tamaño promedio de plantas con vainas -----	91.2 cm.
- Tamaño promedio de plantas sin vainas -----	77.5 cm.
- Número de vainas por planta -----	6.93
- Número de vainas con granos/planta -----	5.75
- Peso total de los granos -----	412.5 g.
- Peso promedio de grano por planta -----	25.5 g.
- Peso promedio de grano por vaina -----	9.0 g.
- Número de granos totales -----	534.0
- Número de granos por planta -----	29.3
- Número de granos por vaina -----	10.6
- Peso promedio de un grano -----	1.7 g.



### III.- Ensayos preliminares sobre plantas prueba para establecer las condiciones de los cultivos de tejidos vegetales " in vitro "

Para esta fase del trabajo se requirió un medio nutriente consistente en una mezcla de sales minerales, una fuente de carbono y vitaminas, adicionando reguladores de crecimiento requeridos para iniciar y mantener la división celular. El medio que se eligió fue el Mdauc ya que en base a la literatura (6) las células meristemáticas de muchas plantas dicotiledóneas proliferaban rápidamente, utilizando así una planta bien conocida como la zanahoria.

En este ensayo se trabajó con explantes de raíz de zanahoria conteniendo partes de floema, xilema y cambium cada uno. En nuestras instalaciones se incubaron a 25 gC desarrollándose normalmente como lo menciona la bibliografía (6,24).

### IV.- Desarrollo práctico de las técnicas para el cultivo del frijol Canavalia ensiformis:

Para iniciar este trabajo sobre el frijol C. ensiformis, se decidió ensayar las mismas condiciones que se utilizaron para la zanahoria. En este caso se trabajó con explantes provenientes del tallo, pecíolo, ápice, hojas y pétalos. El medio de cultivo fue el Mdauc y se probaron el ac. indol-3-acético (IAA), el ac. 2-4,diclorofenoxiacético (2-4,D) y el 6-benziladenina (BAP), como reguladores del crecimiento, para observar el desarrollo del explante en ausencia y presencia de estos, utilizando en todos la misma concentración, ver TABLA No.2 y las mismas condiciones ambientales. Los resultados observados se muestran en la TABLA No.4.

En esta tabla se muestra que el desarrollo de los callos fue muy homogéneo en el medio Mdauc con los tres tipos de reguladores de crecimiento siendo este menor de 0.2 hasta 0.5 cms. en los explantes de tallo, peciolo, hoja y pétalo, mostrando una mayor variabilidad de crecimiento en el explante de ápice, ya que este fue desde menos de 0.2 hasta 0.8 cm, donde se observa mayor diferencia en el crecimiento de los callos es cuando no se usó regulador de crecimiento, todos los explantes se mantuvieron en el mismo medio durante 2 meses, distinguiéndose que en los medios con regulador de crecimiento el desarrollo fue en un tiempo de 5 a 6 días y sin él se detenía hasta 3 ó 4 semanas.

TABLA No.4

CRECIMIENTO DE LOS CALLOS EN EL MEDIO Mdauc:

	! -.-	! IAA	! BAP	! 2-4,D
TALLO	! *	! ***	! **	! ***
PECIOLLO	! *	! ***	! **	! ***
APICE	! **	! ****	! ***	! **
HOJA	! *	! ***	! **	! ***
PETALO	! **	! ***	! **	! ***

- .-) Ausencia de regulador de crecimiento.
- Sin crecimiento.
- \* Hinchamiento del explante.
- \*\* División celular perceptible, callo menor a 0.2 cm.
- \*\*\* Callo entre 0.2 y 0.5 cm.
- \*\*\*\* Callo entre 0.5 y 0.8 cm.
- \*\*\*\*\* Callo mayor de 0.8 cm.

**V.- Ensayo de micropropagación del frijol Canavalia ensiformis en el medio MS:**

En base a la literatura (11) se observó que el medio MS contenía las mismas sales minerales, vitaminas y fuente de carbono que el medio Mdauc pero con las concentraciones diferentes en algunas sales, por lo que se probó utilizando los mismos reguladores de crecimiento y así establecer mejor la selección en el tipo de explante del cual se iniciaría la micropropagación.

En este medio se presentaron dos tipos de crecimiento :

- a) proliferación de callos.
- b) desarrollo de meristemoides.

Estos resultados mostraron que el desarrollo de la planta de frijol " in vitro " se presenta por organogénesis, esto es desarrollando meristemoides que son regiones preferenciales de actividad mitótica produciendo pequeñas protuberancias de apariencia nodular seguidas de primordios y finalmente la formación de tallos ó raíz. La TABLA No.5 muestra los resultados sobre el crecimiento de callos, como se puede ver existe una clara diferencia entre el medio MS con reguladores de crecimiento y sin ellos, además de que el pecíolo muestra un menor desarrollo mientras que el del ápice y la hoja es más homogéneo, al igual que el del tallo y pétalo, marcándose más el mejor crecimiento del callo en el pétalo con 2-4,D como regulador de crecimiento.

La TABLA No.6 , marca la presencia de brotes y raíz mostrando el desarrollo de los explantes en el medio MS con los reguladores de crecimiento que se utilizaron y que les dieron origen, donde claramente se observa que los tallos originaron el desarrollo de la raíz y que los ápices dieron origen a la producción de brotes.

TABLA No.5

CRECIMIENTO DE CALLOS EN EL MEDIO MS:

	-,-	IAA	BAP	2-4,D
TALLO	**	***	***	***
PECIOLA	*	*	**	**
APICE	-	*	**	**
HOJA	-	**	**	**
PETALO	**	***	****	*****

-,-) Ausencia de regulador de crecimiento.

- Sin crecimiento.

\* Hinchamiento del explante.

\*\* División celular perceptible , callo menor a 0.2 cm

\*\*\* Callo entre 0.2 y 0.5 cm.

\*\*\*\* Callo entre 0.5 y 0.8 cm.

\*\*\*\*\* Callo mayor de 0.8 cm.

TABLA No.6

PRODUCCION DE BROTES Y RAIZ EN EL MEDIO MS:

	-,-	IAA	BAP	2-4,D
TALLO	RAIZ	RAIZ		
PECIOLA				
APICE			BROTE	
HOJA				
PETALO				

VI.- Ensayo de micropropagación del frijol Canavalia ensiformis en medio B5:

En el medio B5. según la bibliografía (7,11) ha presentado el desarrollo de brotes en otros tipos de frijoles como los Phaseolus vulgaris, Glicine max y Vicia faba y otras leguminosas, por lo tanto se utilizó para probar el desarrollo de los diferentes explantes y con los mismos reguladores de crecimiento que se venían utilizando en los medios anteriores, mostrando los resultados del crecimiento de callos en la TABLA No. 7

En este medio se presentó también la producción de brotes en los explantes de tallos y ápices en los medios que contenían BAP como regulador de crecimiento, observándose que ningún explante presentó el desarrollo de la raíz, como se muestra en la TABLA No.8

TABLA No.7

Crecimiento de los callos en el medio B5:

	-.-	IAA	BAP	2-4,D
TALLO	**	***	***	***
PECIOLO	-	-	-	*
APICE	*	**	**	**
HOJA	*	**	**	**
PETALO	**	*	***	*

-.-) Ausencia de regulador de crecimiento

- Sin crecimiento

\* Hinchamiento del explante

\*\* División celular perceptible, callo menor de 0.2 cm.

\*\*\* Callo entre 0.2 y 0.5 cm.

\*\*\*\* Callo entre 0.5 y 0.8 cm.

\*\*\*\*\* Callo mayor de 0.8 cm.

TABLA No.8

PRODUCCION DE BROTES EN EL MEDIO B5:

	! -.- !	! IAA !	! BAP !	! 2-4,D !
TALLO	!	!	! BROTE !	!
PECIOLO	!	!	!	!
APICE	!	!	! BROTE !	!
HOJA	!	!	!	!
PETALO	!	!	!	!

-.-) Ausencia de regulador de crecimiento

IAA) Ac. indol-3-acético

BAP) 6-benziladenina

2-4.D) Ac. 2-4,diclorofenoxiacético

Tomando como base los resultados anteriores se realizaron las tablas siguientes para presentar el porcentaje de crecimiento de los diferentes explantes en los medios y con los reguladores de crecimiento que se utilizaron para este trabajo.

TAFLA No.9

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE LOS CALLOS DE TALLO EN LOS DIFERENTES MEDIOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS:

R.deC.	MEDIO	-	*	**	***	****	*****
-.-	Mdauc	28	72				
-.-	MS	27	73	54			
-.-	B5	17	83	57			
IAA	Mdauc	19	81	73	64		
IAA	MS	8	92	84	79		
IAA	B5	12	88	88	85		
BAP	Mdauc	17	83	80	67		
BAP	MS	12	88	81	72		
BAP	B5	7	93	87	87	84	
2-4,D	Mdauc	18	82	80	78		
2-4,D	MS	7	93	86	83		
2-4,D	B5	5	95	93	90		

TABLA No.10

PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO DE CALLOS DE PECIOLLO EN LOS DIFERENTES MEDIOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS:

R.deC.	MEDIOS	-	*	**	***	****	*****
-,-	Mdauc	35	65				
-,-	MS	20	80				
-,-	B5	100					
IAA	Mdauc	15	65	65	78		
IAA	MS	3	97				
IAA	B5	100					
BAP	Mdauc	9	91	78			
BAP	MS	5	95	67			
BAP	B5	100					
2-4,D	Mdauc	13	87	64	78		
2-4,D	MS	10	90	87			
2-4,D	B5	32	68				



TABLA No.11

PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO DE CALLOS DE APICE EN LOS DIFERENTES MEDIOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS:

R.deC.	MEDIO	-	*	**	***	****	*****
-.-	Mdauc	15	85	81			
-.-	MS	100					
-.-	B5	25	75				
IAA	Mdauc	6	94	89	81	81	
IAA	MS	10	90				
IAA	B5	8	92	83			
BAP	Mdauc	8	92	87	85		
BAP	MS	12	88	85			
BAP	B5	4	96	92			
2-4, D	Mdauc	18	82	74			
2-4, D	MS	7	93	79			
2-4, D	B5	9	91	87			

TABLA No.12

PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO DE CALLOS DE HOJA EN LOS DIFERENTES MEDIOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS:

R.deC.	MEDIOS	-	*	**	***	****	*****
-,-	Mdauc	13	87				
-,-	MS	100					
-,-	B5	9	91				
IAA	Mdauc	12	83	74	70		
IAA	MS	10	90	87			
IAA	B5	6	94	90			
BAP	Mdauc	9	91	85			
BAP	MS	10	90	83			
BAP	B5	3	97	92			
2-4,D	Mdauc	8	92	89	87		
2-4,D	MS	9	91	86			
2-4,D	B5	5	95	93			

TABLA No.13

PORCENTAJE DEL CRECIMIENTO DE CALLOS DE PETALO EN LOS DIFERENTES MEDIOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS:

R.deC.	MEDIOS	-	*	**	***	****	*****
-,-	Mdauc	15	85				
-,-	MS	6	92	90			
-,-	B5	7	93	89			
IAA	Mdauc	10	90	87			
IAA	MS	4	96	94	90		
IAA	B5	3	97				
BAP	Mdauc	6	94				
BAP	MS	3	97	96	96	94	
BAP	B5	5	95	92	89		
2-4,D	Mdauc	5	95	93			
2-4,D	MS	2	98	94	94	94	92
2-4,D	B5	7	93				

Con los resultados observados en los experimentos realizados se puede marcar claramente el desarrollo de los explantes que presentaron brotes y raíces en el medio y con la concentración de regulador de crecimiento que lo optimizó, por lo que se presenta la TABLA No.14

TABLA No.14

PORCENTAJE DE LA PRODUCCION DE BROTES Y RAICES:

EXPLANTE	MEDIO	R.deC.	%	PRODUCCION
TALLO	B5	BAP	29.6	BROTES
APICE	B5	BAP	100.0	BROTES
APICE	MS	IAA	58.7	BROTES
TALLO	MS	-.-	14.7	RAIZ
TALLO	MS	IAA	12.5	RAIZ

## CONCLUSIONES

Las semillas del frijol Canavalia ensiformis fueron sembradas con el propósito de producir plantas madres para el cultivo "in vitro". Las características esperadas de las plantas madres eran: tamaño de la planta, número de vainas, etc., como se pueden observar en la Tabla No.3.

Como los resultados del anexo 1 indican, la densidad de población fue muy alta. Es necesario un mejor control de las densidades de población. Se sugiere disminuir de 7 a 3.5 semillas/m<sup>2</sup>, ya que el desarrollo foliar ocasiona que la iluminación no sea uniforme en todas las plantas adultas. Con una menor densidad de población esto se evitaría y promovería un mejor desarrollo a fin de obtener plantas madres de mejor calidad.

De las plantas madres se obtuvieron explantes de tallos, hojas, pétalos, pecíolos y ápices. Los explantes se sembraron en condiciones estériles en 3 diferentes medios de cultivo: Mdauc (16), MS (11), B5 (24), los cuales incluían distintos reguladores de crecimiento (IAA, BAP, 2-4,D y sin regulador de crecimiento).

Como se observa en los resultados, el explante de pétalos cultivados en el medio MS utilizando como regulador de crecimiento la auxina 2-4,D (la cual promueve la expansión celular (23)) presentó mejor crecimiento de callos comparado con los explantes de tallo, hoja, ápice y pecíolos en los cuales hubo un menor crecimiento al sembrarse en las mismas condiciones experimentales. La formación de callo a partir de pétalo fue al cabo de 30 días aproximadamente, cuando los restantes tardaron en presentarse 45 días después de su siembra. como se indica en la Tabla No.5.

Los explantes de tallo en el mismo medio de cultivo y utilizando la auxina IAA en lugar de la auxina 2-4,D originaron una formación "exuberante" de raíces presentandose también aunque en menor cantidad, este desarrollo en el medio que no tenia regulador de crecimiento. Los demás explantes no presentaron este tipo de desarrollo.

En el medio de cultivo E5 el desarrollo de callos a partir del mismo tipo de explantes utilizados en el medio M3 fue comparativamente menor, como se observa en la Tabla No.7. Sin embargo los explantes de ápices y tallos en presencia de la citocinina BAP (promueve la división celular y organiza el tejido de los callos (23)), originaron la formación de brotes, no obteniendo el mismo efecto al utilizar el medio M3. Por lo tanto, el medio M3 en el caso de Canavalia ensiformis se puede utilizar con el objeto de formación de callos y raíces, cuando el medio de cultivo E5 es más conveniente para la formación de brotes.

A pesar de que los avances logrados son parciales, el trabajo aquí presentado sienta las bases del cultivo de tejidos en Canavalia ensiformis en nuestro país. Con el propósito de optimizar la técnica de cultivo "in vitro" en esta especie y lograr su micropropagación son necesarios futuros trabajos en ésta área.

La micropropagación, en ejemplos específicos como este es rentable, ya que al incrementar la biomasa la utilidad reside en la extracción de compuestos orgánicos de importancia industrial ó farmacéutica (17) como en este caso la fabricación de reactivos de diagnóstico; Canavalia ensiformis sintetiza grandes cantidades de ureasa (9,14) la cual se emplea en la fabricación de reactivos de diagnóstico clínico, así como de forraje para la alimentación de ganado (en pequeñas cantidades) ó como abono verde.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- R. Augé.G. Beachesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, R. Minier, J. CL. Morand, Y. Oudin, H. Vidalie; La Culture "in vitro " et ses aplicaciones horticoles; Paris, Francia; J. B. Bailliere; 1982.
- 2.- R. G. S. Bidwell; Fisiología Vegetal; Kingston, Ontario Canada; Agt Editor S. A.; 1983.
- 3.- A. B. Bogdan.; Tropical Pasthes and Fodder Plants; Tropical Agriculture Series; New York, E.U.; 1977; 330.
- 4.- B. V. Conger, ; Cloning Agricultural Plants Via " in vitro" Techniques; C. R. C.-Press, Inc.; Knosville, Tennessee E.U.; 1981; 142-143, 150
- 5.- Arthur Cronquist : Introducción a la Botanica; México 22, D.F.; Compañia Editorial Continental, S. A.; 1980.
- 6.- Jhon H. Dodds , Lorin W. Roberts; Experiments in Plant Tissue Culture; Cambridge University Press, E.U.; 1982
- 7.- D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada; Handbook of Plant Cell Culture; New York, E.U.; Macmillan; 1983.
- 8.- O. L. Gamburg , T. Murashige, T. A. Thorpe and I. K. Vasil; Plant Tissue Culture Media; In Vitro; 1976; Vol.12 No.7 pag: 473-478.
- 9.- Margaret Gill . R. Muñoz; The Ensiling of Mixtures of Cane and Forage; Tropical Animals Production; 1981; Vol.6 pag: 154-158.

- 10.- G. F. Herrera ; Efecto de la Densidad de Población Sobre el Rendimiento de Semilla de *C. ensiformis*; Producción Animal Triopical; 1983; Vol.8 pag: 166-169.
- 11.- Murashige , Skoog; Formulas de Murashige and Skoog, Mezcla Basica de Sales Inorganicas; Physiol. Plantarum; 1962; pag:i-8
- 12.- Toshio Murashige ; Plant Propagation Through Tissue Cultures; Plant Physiol; Riverside, California E.U.; 1974 ; Vol.25 pag: 135-166.
- 13.- H. Obata - Sasamoto , Victor M. Villalobos , Trevor A. Thorpe; 14 C-Metabolism in Cultured Cotiledon Explantes of Radiata Pine; Physiol Plant; 1984; Vol.61 pag: 490-496.
- 14.- B. Pound , F. Doñé , G. Peralta; Efecto de frecuencias de Corte en la Producción de semilla y Forraje de *C. ensiformis*; Producción Animal Tropical; 1982; Vol.7 pag: 278-282.
- 15.- Rodolfo Quintero Ramirez; Prospectiva de la Biotecnología en México; México,D.F.; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; 1985.
- 16.- J. Reinert , M. M. Yeoman; Plant Cell and Tissue Culture; Alemania; Springer-Verlag; 1982.
- 17.- Manuel M. Robert, Victor Manuel Loyola; El Cultivo de Tejidos Vegetales en México; Ciudad Universitaria México D. F. ; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; 1985.
- 18.- T. K. Skott ; Hormonal Regulation of Development II; Alemania; Springer-Verlag; 1984; Vol.10
- 19.- E. Jhon Staba ; Plant Tissue Culture as a Soucre of Biochemicals; Boca Ratón, Florida; C.R.C. Press; 1980.



- 20.- Trevor A. Thorpe ; Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture; Calgary, Alberta Canada; Academic Press; 1981.
- 21.- Victor M. Villalobos , Edward C. Yeung, Melvin J. Oliver, Trevor A. Thorpe; Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of radiata pine cultured "in vitro"; Calgary Alberta Canada; Academic Press; 1984.
- 22.- Victor M. Villalobos Arambula ; Micropropagación de Especies Forestales; Chapingo, México México; 1985; pag: 2-13.
- 23.- Victor M. Villalobos Arambula ; Fundamentos Teorico-Practicos de Cultivo de Tejidos Vegetales; Centro de Genetica, Colegio de Postgraduados , Montecillos, México ; Primer Curso FAO-México de Micropropagación Vegetal; 1985.
- 24.- L. R. Wettter , F. Constabel; Plant Tissue Culture Methods; Ottawa, Ontario Canada; National Research Council of Canada; 1982.

## ANEXO

Efectos posibles de la densidad de siembra:

La densidad de siembra fue de 7.4 semillas/m<sup>2</sup> ( 50 cm. x 27 cm.), pero debido a la altura final de las plantas ( alrededor de 1 mt) y la expansión de sus hojas, esta distancia no fue suficiente, por lo que a algunas plantas les hizo falta luz.

Esto se puede ver en la repartición de las plantas que produjeron vainas, distinguiéndose tres tipos de frijoles, en cuanto su exposición al sol:

Grupo I.- frijoles a un lado de la tela. (provoco sombra)

Grupo II.- frijoles rodeados por otros frijoles.

Grupo III.- frijoles directamente expuestos al sol.

CATEGORIA	> No. de PLANTAS	> No. de PLANTAS	>	%	>
	> POR CATEGORIA	> CON VAINAS	>		>
I	> 25	> 3	>	12	>
II	> 50	> 24	>	48	>
III	> 15	> 9	>	60	>
TOTAL	> 70	> 36	>	52	>

Esta tabla muestra que la falta de luz fue un factor limitante sobre la floración en particular, causando la baja producción de plantas con vainas. Se puede pensar que bajando 2 veces la densidad de siembra no se tendrán problemas por la falta de luz.

## COMPOSICION DE ABONOS E INSECTICIDAS.

Molynoctin L : bacterias que fijan el nitrogeno, contiene 5.34 % de molibdeno.

Triple 17 : 17% de nitrogeno, 17% de fosforo, 17% de potasio.

Tierra de hojas: tabaco molido (contra plagas subterranas), tierra negra y humus, fungicida PCNB 75% y los siguientes micronutrientes:

Fe 2.8 %	Na 0.9 %	Ca 1.0 %
Mn 1.6 %	Cu 1.4 %	Mg 1.9 %
Zn 1.5 %	S 1.2 %	B 0.9 %
Co 0.1 %	Mo 0.005 %	
hormonas 0.002 %	vitaminas 0.4 %	

Urea : 46%

Superfosfato : 46%

Cloruro de potasio : 60 % de potasio

Guadalajara, Jal.

MARZO DE 1987

Dr. Carlos Astengo Osuna.  
Director de la Facultad de Ciencias.  
Universidad de Guadalajara.  
P R E S E N T E.

Por este conducto me permito informar a usted que fué revisada y corregida la tesis titulada: Propagación de *Canavalia ensiformis* por cultivo de tejidos vegetales e implementación del laboratorio, presentada por la pasante de Biología María del Carmen Bayardo Prieto.

No tengo inconveniente de que dicha tesis se imprima y ruego a usted tramitar ante quien corresponda el examen respectivo.

Sin otro particular aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración más distinguida.

ATENTAMENTE



BIOL. EDUARDO AVALOS GUZMAN  
DIRECTOR DE TESTS



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**Facultad de Ciencias**

Expediente .....

Número ..... 233/86

Srita. María del Carmen Bayardo Prieto  
P r e s e n t e .

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Propagación de Canavalia Ensiformis, por cultivo de tejidos vegetales e implementación de el Laboratorio" para obtener la Licenciatura en Biología -- con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido -- aceptado como Director de dicha Tesis el Biólogo Eduardo - Avalos Guzmán.

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Marzo 20 de 1986

El Director

  
Ing. Edmundo Ponçe Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El Biol. Eduardo Avalos Guzmán, Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente de la alumna.