

8 302827
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

MICROPROPAGACION DE ESPARRAGO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
CECILIA FLORES DIAZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E :

CAPITULO	I	INTRODUCCION	1
CAPITULO	II	OBJETIVO	2
CAPITULO	III	GENERALIDADES	3
CAPITULO	IV	MATERIAL Y METODOS	33
CAPITULO	V	RESULTADOS FINALES	54
CAPITULO	VI	DISCUSION	70
CAPITULO	VII	CONCLUSIONES	72
CAPITULO	VIII	BIBLIOGRAFIA	74

I. INTRODUCCION.

El estudio del cultivo de espárrago por técnicas de micro propagación abre las puertas a una nueva economía mundial y nacional. Sobre todo a nivel nacional, donde ya no será necesario importar "plantas madre" porque será posible producirlas.

Por otra parte se podrá ver acentuada la producción, porque no será necesario poner cinco o más semillas para obtener una planta, y todavía así correr el riesgo de que el embrión muera, ya sea por condiciones ambientales desfavorables o por agentes contaminantes. Bastará con sembrar el tejido apropiado en el medio adecuado.

En el terreno de consumo comercial, muchas especies que resultan caras, entre ellas el espárrago, podrán reducir sus costos.

El estudio mismo de los requerimientos nutricionales y ambientales de la planta, hará posible que cualquier especie se cultive en cualquier parte, y no solo eso, sino que también pueda supervisarse y enriquecerse el vegetal para dar mejores rendimientos en cuanto a alimentación humana y animal se destina, pudiendo traer un incremento intelectual de los pueblos.

II. OBJETIVO.

Establecer las condiciones hormonales que favorecen la proliferación y diferenciación del espárrago cultivado "IN - VITRO"; estas condiciones se refieren a diferentes concentraciones de ANA (ácido naftalen acético) con KIN (cinetina), o bien, ANA en combinación con 6-BAP (6-bencilaminopurina) .

III. GENERALIDADES.

Las hormonas de las plantas o fitohormonas, son reguladores producidos por las mismas plantas, que en bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de éstas. Por lo común las hormonas se desplazan en el interior de las plantas, de un lugar de producción a un sitio de acción.

Las hormonas de las plantas están divididas en 5 grupos:

1.- Las AUXINAS incluyen el ácido indol acético, el ácido fenoxiacético (sintético), el 2,4-D (el ácido 2,4-diclorofenoxiacético). (Ver figura 1).

2.-Las GIBERELINAS: Son compuestos de ácidos o esteroides y comprenden 40 estructuras diferentes. (Ver figura 2).

3.-Las CITOCININAS: Todas tienen substituído su N⁶ por compuestos de adenosina. (Ver figura 3).

4.- El ACIDO ABSCISICO que representa a este grupo es un derivado de unidades isoprenoides como son las giberelinas. (Ver figura 4).

5.-El ETILENO que es la más simple de las hormonas de las plantas, es un gas y como tal es fácilmente expansible de sus órganos de producción para órganos de sensibilidad. (Ver figura 5).

Son interesantes las 5 clases de hormonas, dos de ellas son generadas por la biosíntesis del ácido mevalónico.

El etileno es producido por el metabolismo de la metionina; y el ácido indol acético es producido por la remoción del carbono y el nitrógeno del triptofano.

Las citocininas, en términos de síntesis, son probablemente las hormonas más complejas. Posiblemente son producidas por el rompimiento o descomposición del RNA de transferencia (RNAt). Dentro del RNAt intacto, la mitad de la adenosina es modificada por la adición de un grupo isoprenoide; subsecuentemente el RNAt es probablemente degradado, cediendo a Isopentil adenosina (IPA), la citocinina endógena.

Desafortunadamente las hormonas de las plantas y sus acciones no han sido bien entendidas, y el principal obstáculo a esto es que dichas hormonas tienen la propiedad de extenderse y completar sus efectos sobre su propia acción y la de otras. Muchos de los descubrimientos de los efectos de las hormonas sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas y la síntesis de enzimas específicas llevaron a pensar que el mecanismo de acción de las hormonas podía involucrar el control de la producción de RNA mensajero (RNAm) y la síntesis de enzimas.

A fines de los años 60 se encontró que las hormonas de las plantas mediaban un efecto sobre el crecimiento celular - en pocos minutos. Esto implica una respuesta rápida al mecanismo de acción de la hormona; consecuentemente esos efectos no podían ser mediados por el cambio de velocidad o tipo de síntesis de los ácidos nucleicos o de proteínas específicas.

Esto queda claro en hormonas animales, ya que éstas pri-

mere interactúan con la célula animal por unión con un receptor de sitio local de algún tipo dentro de la célula.

Los bioquímicos y fisiólogos en plantas están empezando a considerar que muchas de las hormonas de plantas comparadas con las hormonas animales involucran en su unión a agentes receptores, éstos regresan amplificadamente la acción de la hormona y así de ese modo dan cambios específicos en la síntesis de ácidos nucleicos, en la síntesis de proteínas, en la actividad enzimática y posiblemente otras respuestas fisiológicas tales como cambios en la permeabilidad de las membranas.

Se ha puesto énfasis sobre los lugares de unión o interacción dentro de la célula entre hormona y receptor específico, esto puede regular el crecimiento y desarrollo de las células de plantas.

Cuando una hormona es aplicada para dar una respuesta en el sistema plantular, esto provoca un cambio específico que puede ser medido bioquímicamente o por sus efectos fisiológicos.

Dos aspectos diferentes de los efectos medidos son involucrados:

- a) El cambio dentro del metabolismo.
- b) Y los pasos que conducen el efecto fisiológico.

Usualmente la interacción molecular en sus sitios de unión entre hormona y receptor se refieren al mecanismo de acción, aunque éste pueda depender de otros factores.

Esto es posible para los mecanismos hormonales dentro de un sistema plantular para inducir una serie de respuestas fisiológicas que pueden ser completamente diferentes en un segundo sistema plantular. Esta diferencia en el modo de acción

pueda deberse a que en un segundo sistema existan otras hormonas, otros componentes biológicos u otras estructuras y diferencias citológicas.

ACCION DE LAS AUXINAS.

Entre los reguladores de crecimiento de las plantas uno de los más estudiados han sido las auxinas. Esta clase de hormonas se sabe que promueven el alargamiento o elongación celular, proceso que requiere extensión de la pared celular.

En 1940 la mayoría de los estudios sobre auxinas estaban enfocados al estudio de la pared celular, ya que se creía que estas hormonas modificaban dicha pared para permitir la expansión celular, o que tal vez, hacían a la pared más elástica - por medio de hidrólisis .

En 1953 se publicó un reporte que mostraba que la auxina endógena, ácido indol acético (IAA) afectaba el RNA y DNA de las plantas. Dicha auxina incrementa el contenido del ácido nucleico dicho incremento es debido a que la auxina induce el crecimiento de tejido, lo cual es óptimo para el alargamiento celular. Siguiendo este descubrimiento, muchas investigaciones se enfocaron al mecanismo por el cual la auxina incrementaba la síntesis de ácido nucleico. Gran parte de este descubrimiento fué empezado por West y Key en 1960 en Illinois, ellos demostraron que la auxina sintética, el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), producía cambios morfológicos y fisiológicos en algunas partes del maíz y el haba. Después de ser tratados con el 2,4-D entre las 15 y las 24 horas, fué percibido un alargamiento celular e incremento en el tamaño de los núcleos, también se registró un incremento del RNA y en mayor cantidad del RNA ribosomal.

Key e Ingle (1934) demostraron que la auxina controla la

síntesis de ácidos nucleicos y el RNA ribosomal, y el tipo de RNA mensajero.

Los subsecuentes experimentos de O'Brien (1968) mostraron que la auxina causa un incremento en la cromatina directa de la síntesis de RNA, en el tratamiento de habas con auxina.

Fué de interés notar que esta auxina, inductora de la síntesis de RNA produjo un tipo de RNA diferente al RNA control, diferente en cuanto al tamaño de sus moléculas las cuales fueron más grandes. Siguiendo esta área de descubrimientos (Hardin y Cherry, 1972) mostraron que la 2,4-D incrementó la actividad de la RNA polimerasa. Este experimento abrió la interrogante si la auxina producía cambios a factores ligados al citoplasma o a la membrana y así ellos pudieran enaltecer la actividad de la RNA polimerasa.

Hardin (1972) hipotetizó el siguiente mecanismo de acción de las auxinas: la auxina se une al sitio receptor, de estructura semejante a ella, localizado en la membrana plasmática. El receptor es entonces liberado, penetra al núcleo donde regula la actividad de la RNA polimerasa.

El incremento en la actividad de la RNA polimerasa hace que haya un incremento en la síntesis de RNAs, y éste a su vez hace que se incremente la síntesis de proteínas específicas en sus lugares de origen dentro de la célula.

La interrogante es saber si la auxina en su primera acción se une o reacciona con el receptor, o si penetra solamente con el receptor y empieza a actuar en sitios posteriores.

El metabolismo celular se lleva a cabo una vez que la auxina ha resaltado al receptor molecular y a su sitio de acción en la célula. El cambio en la síntesis de ácidos nucleicos

produce una actividad incrementada de varias enzimas asociadas.

REGULACION DE LA PARED CELULAR.

Cuando la pared celular se alarga se lleva a cabo un incremento en masa y en volumen.

El peso seco del material de la pared celular se incrementa debido al alargamiento celular, sin embargo, el espesor y la densidad de dicha pared permanecen constantes.

Parece ser que la síntesis de la pared celular es fundamental durante la elongación celular. Por muchos años se ha pensado que la auxina incrementa dicha elongación promoviendo la síntesis de la pared celular.

La auxina para permitir el incremento de la extensión de la pared celular debe regular la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de dicha pared, liberándolas, y así ellas catalizan el rompimiento entre varias uniones de microfibrillas de la pared.

Los tejidos de plantas que responden a la auxina incrementando su elongación celular, también presentan un incremento en las células liberadas de la pared. Sin embargo hay que tener en cuenta que la cinética de inducción de la auxina varía considerablemente de tejido a tejido, y de concentración a concentración. Por ejemplo al crecimiento en la oscuridad de coleptilos de maíz registran un proceso de liberación de su pared muy lento, en una concentración de 10^{-4} M de la auxina. Sin embargo el mismo tejido en concentraciones de 10^{-2} M -

de la auxina, tiene un alargamiento total entre 2 a 6 horas.

Es de interés hacer notar que el rango de la elongación de la pared celular así como la medida del incremento de la sección alargada es mucho mayor que el incremento en la extensión (a lo ancho) de la pared. Así, cambios considerables dentro de la extensión de la pared celular causados por la auxina, pueden afectar el crecimiento de una manera diferente.

En algunos tejidos vegetales la velocidad de crecimiento es constante, y la extensión total de la pared cambia. En otros tejidos la velocidad de crecimiento no es constante por lo que la extensión de la pared, por algunos períodos de tiempo permanece constante.

Actualmente se cree que la auxina provoca un cambio bioquímico en la pared, quizás por rompimiento o modificación en las uniones de la cadena de polisacáridos de la pared. Estos cambios en la pared son entonces transferidos hacia dentro provocando una presión que produce la elongación.

Es relevante discutir como afecta la auxina las uniones dentro de la pared celular, y cuáles son los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la elongación celular, observando el efecto de la auxina sobre varias enzimas asociadas a la pared celular.

ACCION DE LA AUXINA SOBRE LAS ENZIMAS ASOCIADAS

A LA PARED CELULAR.

El efecto más marcado de la auxina a altas concentraciones de IAA fué la inducción sobre la formación de enzimas tales como la celulasa, poligalacturonasas y otras hidrolasas, en cotiledones de chícharo (Dakto y MacIachlan, 1963).

Se llevó a cabo otro experimento para reafirmar el anterior. Se ensayó sobre una preparación ribosomal, in vitro, de células de chícharo tratadas con IAA. (Davis y MacIachlan - 1969), y el resultado fué positivo.

Se observó también, que la auxina no solo estimula la síntesis de celulasa sino de glucan sintetasa.

Masuda y Yamamoto (1970) aislaron la enzima fungal β -1,3 glucanasa de un cultivo de Sclerotinia Libertans y demostraron que dicha enzima induce una elongación rápida de la pared celular en segmentos aislados de coleóptilos de avena.

En otros estudios Masuda (1970) comparó la actividad de la β -1,3 endoglucanasa con las actividades de la exoglucanasa, en células de coleóptilos de avena, se encontró que la exoglucanasa aumentó la elongación y extensión de la pared.

Pero estos efectos no fueron sumados a los efectos del IAA, además se requirió una incubación de 3 horas mínimas para el engrandecimiento de la elongación.

La endoglucanasa definitivamente no produjo efectos de elongación de la pared celular.

La acción de la auxina sobre la xiloglucanasa soluble .

puede ser ensayado con relativa facilidad y precisión. Se ha registrado una activación de dicha enzima entre los 15 a 30-minutos después de exponer el tejido al IAA. Se ha que éste es uno de los efectos metabólicos más rápidos de la auxina.

Este efecto de la auxina persiste aún bajo una inhibición osmótica completa de elongación causada por un inhibidor metabólico que se sabe bloquea la elongación, este inhibidor es el manitol.

Parece ser que la xiloglucanasa esta implicada en la acción de la pared celular, ella dirige la elongación en la célula de chícharo. Según un modelo reciente de la estructura de la pared celular, la xiloglucanasa sirve de unión entre la matriz de polisacáridos y las microfibrillas de celulosa. (Bauer 1973).

REGULACION DEL MATERIAL GENETICO

POR LAS AUXINAS.

Después del descubrimiento del RNAm fué sugerido que la regulación genética por la acción auxínica requería un control específico a través de la síntesis del RNAm.

Usando inhibidores de la síntesis del RNA, Key e Ingle - (1964) notaron que el tratamiento de hipocótilos de habas con el 5-fluorouracil (5-FU) inhibía la síntesis de RNA en un 80% mientras que el proceso de crecimiento procedía normalmente.

Estudios anteriores sobre fracciones de ácidos nucleicos en hipocótilos de habas llevados a cabo en columnas de Kieselguhr con albúmina metilada marcada, mostraron que el 5-FU i-

nhibía la incorporación de la adenosina difosfato dentro del RNA ribosomal, pero no en el RNA en el cual si hubo cierta adhesión. Experimentos adicionales con soya mostraron que el -5-FU no afectaba del todo la unión de la adenosina al RNA, cuya síntesis es favorecida por la 2,4-D.

Sen y Roychoudury (1965) mostraron que el núcleo aislado de células de leche de coco respondieron a la auxina produciendo más RNA in vitro. En base a estas observaciones se propuso que la auxina afcta directamente al núcleo regulando la información genética. El DNA patrón expuesto a la auxina se modifica y ya modificado se transcribe al RNA.

Para probar esta hipótesis Cherry (1967) mostró que en núcleos aislados de células de cotiledón de cacahuate in vitro, no respondieron a la 2,4-D a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-7} M. observó que 1 de cada 10 tentativas el núcleo in vitro respondía a la hormona produciendo más RNA.

Así se demostró que la auxina no tiene efecto sobre el núcleo aislado, in vitro, para producir RNA.

Posteriormente se hicieron otras investigaciones, se estudio sobre núcleos aislados de semillas de haba pretratadas con la 2,4-D, estos núcleos sintetizaron el doble de ácido nucléico. Sin embargo experimentos de O'Brien (1968) mostraron que la cromatina aislada de hipocótilos de haba no respondieron in vitro al 2,4-D.

En todos los experimentos los tejidos necesitaron ser tratados con un regulador de crecimiento y transcurridas 2 horas de su aplicación se pudo percibir algún efecto sobre la cromatina aislada directa de la síntesis del RNA. Sin embargo en otros experimentos se pudo observar algún efecto de la hormona

a los 30 min. Así se llegó a la conclusión de que el incremento progresivo en la síntesis de RNA de la cromatina directa es una función del tiempo.

De esos experimentos también se sugirió que un mejor rendimiento de la auxina fué el resultado de una RNA polimerasa más activa precediendo un incremento en la actividad del DNA-patrón, o que tal vez ambos efectos se lleven a cabo indistintamente.

Experimentos posteriores en la presencia de la RNA polimerasa de la *E. Coli* y las plantas tratadas con 2,4-D, la cromatina de ambas regulada, permitieron la síntesis de cantidades similares de RNA en saturación con la polimerasa.

Se concluyó que primeramente la auxina promueve la RNA-polimerasa endógena, y después promueve la actividad de la cromatina patrón.

Cuando se hizo posible solubilizar la RNA polimerasa de la cromatina (Hardin y Cherry, 1972) dos aspectos importantes fueron notados:

a) No había sido posible mostrar que la adición de auxina in vitro, solubilizara a la RNA polimerasa, o que la cromatina incrementara la velocidad en la síntesis de RNA. (Hardin 1970).

b) Que de los muchos experimentos efectuados, parece que el tratamiento de plantas sensibles a la auxina da una mayor-producción de RNA polimerasa (Hardin y Cherry, 1972).

La RNA polimerasa es la enzima que se cree está presente en el nucleólo dirigiendo la síntesis de RNA y la transcripción del RNA ribosomal para el ribosoma.

Este dato coincide con el hecho de que grandes incremen-

tos se registran del RNA ribosomal y de ribosomas después del tratamiento con auxina. Sin embargo son inconsistentes con la idea de que la auxina incrementa la actividad de la RNA polimerasa, la cual transcribe la secuencia única del DNA al RNA mensajero.

ACCION DE LAS AUXINAS SOBRE
LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

La auxina actúa rápidamente sobre las membranas celulares, regulando la salida de materiales activos de crecimiento atravesando la membrana plasmática y la pared celular.

Hipotéticamente el transporte y la acción de la auxina sobre el crecimiento involucra interacciones con algunos-transportadores o acarreadores de iones localizados en la membrana plasmática. El receptor local específico de la auxina debe estar localizado en la membrana plasmática, ya que la hormona cambia la permeabilidad o algunas propiedades físicas de la membrana.

Con esta hipótesis, Lembi (1971) empezó estudiar los sitios reptoeres en la membrana plasmática para la auxina. Para ello empleo un fuerte inhibidor competitivo del transporte, el ácido naftalen ftálmico (NPA) marcado, ya que es el más parecido a la auxina y así lucharía por el sitio receptor de la auxina. Pudo observar, en granos de maíz, que hubo gran cantidad de NPA unido a la membrana plasmática, pero también lo hubo de la auxina. Así pudo comprobar que el IAA tiene sitios -receptores específicos.

Hertel (1972) siguiendo esta línea de investigación tam-

bién detectó, en granos de maíz, uniones específicas para el IAA y ANA (ácido naftalen acético). Después de ensayar varias concentraciones para que se llevaran a cabo las uniones, descubrió que se registraban uniones constantes de dichas auxinas en el rango de 10^{-8} a 10^{-5} M. La especificidad de la unión como un fenómeno de auxina, fué indicado por las semejanzas entre ANA e IAA, ya que ambas son transportadas y son activas en el crecimiento. Sin embargo no pudo explicar porque la 2,4-D, auxina muy activa, compitió relativamente sin fuerza con la IAA o ANA.

Hardin (1972) propuso que el mecanismo de acción de la auxina se llevaba a cabo de la siguiente manera: La auxina nativa IAA o la 2,4-D (sintética), provocan cambios de conformación en la membrana plasmática, causando la liberación de un receptor dentro del citoplasma. Este receptor pudiera ser o no el agente de unión con el que la auxina interactúa. Después el receptor liberado de la membrana plasmática regresa al citoplasma y viajando por él, llega al núcleo, donde la auxina incrementa la actividad de la RNA polimerasa.

De una publicación reciente (Shyamala y Gorski, 1969; Jensen 1968) se ha podido establecer cierta analogía de este mecanismo de acción con el mecanismo de acción de hormonas en sistemas animales. Hay interacción entre la hormona y el receptor, después juntos emigran dentro del núcleo donde es controlada la síntesis de ácido nucleico.

En esta línea de investigación Hardin (1972) aisló protoplastos de haba, la adición de membrana plasmática a la RNA polimerasa del haba causó incremento en la síntesis de RNA in vitro.

Posteriormente se demostró que el pretratamiento de la membrana con 2,4-D en una concentración de 10^{-7} M incrementa grandemente la actividad de la RNA polimerasa. Esto se verificó al hacer una centrifugación y el sobrenadante mostró -- contener RNA polimerasa estimulada.

La liberación química de la RNA polimerasa parece ser es pecífica de la auxina.

Se hicieron otros estudios para ver cuál de las múlti -- ples RNA polimerasas era estimulada y se encontró que la adición de membrana plasmática a una preparación semipurificada de RNA polimerasa, y esta adición enaltecíó a la polimerasa -- sensible, α -amanitina.

Por analogías de estudios con la RNA polimerasa animal, -- esos datos implican que la auxina incrementa la RNA polimerasa nucléoplasmática, enzima que se sabe que transcribe la información del DNA dentro del RNAm. Si esto es cierto, enton-- ces cuando la enzima es sensible a la auxina, ésta última de gpués de liberar al receptor, puede regular la transcripción -- de la secuencia única del DNA a través del control de una en-- zima específica.

RESUMEN.

Los estudios de la acción de las auxinas sobre células de plantas, en los últimos años ha traído un cambio en las ideas que se tenían sobre el concepto del gen y sobre la acción de la auxina con "respuestas rápidas". También se ha abierto un área nueva de investigación por la acción de la auxina sobre sus receptores membranales y otros organelos, ya que conduce respuestas rápidas sobre el crecimiento, y respuestas largas en cuanto a la modificación en la síntesis de ácido nucleico y la síntesis de proteína.

La unión de la auxina con los sitios receptores en la membrana plasmática ha estimulado el interés dentro del concepto de "FUERZA DE LA HORMONA", ya que dicha fuerza provoca cambios de conformación en la estructura de la membrana. Además la membrana se torna más permeable, causando un incremento de iones a través de ésta. Si la hormona localiza un receptor sobre la membrana se forma un complejo hormona-receptor membranar ocasionando un cambio en la conformación de ésta, al tener una conformación diferente la membrana el receptor se libera de ella por haber cambiado su forma.

Se ha propuesto que el receptor se mueve hasta llegar al núcleo de la célula y una vez ahí incrementa la actividad de la RNA polimerasa. Esta enzima a su vez induce la síntesis del RNAm, el cual codifica las proteínas y esto da como resultado que la auxina acelere el crecimiento.

Se ha visto que un número considerable de enzimas son afectadas por la auxina, entre ellas están: las hidrolasas, -

particularmente la celulasa y otras enzimas asociadas con la degradación y la síntesis de la pared celular. Sin embargo la acción sobre esas enzimas es un efecto secundario, ya que esto no interfiere con el primer mecanismo de acción de la auxina.

En esencia las auxinas controlan una multitud de respuestas fisiológicas y bioquímicas dentro de las plantas.

El primer sitio de acción de la hormona está localizado en la membrana plasmática, ya sea dentro o en la superficie.

El cambio a este nivel en particular, ya sea de función o de estructura de la liberación de un factor que se mueve dentro del núcleo, ocasiona un control sobre la actividad de la RNA polimerasa, lo que conduce a una modificación en la síntesis del RNA dentro del gen, que puede quizás, no ser transcrito del todo, y así se ocasiona un cambio en la transcripción del DNA. De este modo podría inducir a la síntesis de nuevas proteínas, dándose un cambio en el potencial de crecimiento. (Véase figura 6).

CITOCININAS.

El término citocinina ha sido aceptado universalmente como nombre genérico para sustancias que promueven la división celular y ponen en acción funciones regulatorias de crecimiento.

Las pruebas y síntesis de compuestos para la actividad de citocininas empieza con el descubrimiento de la cinetina, 6-furfuril-amino-purina (6-BAP).

Hoy en día existen más de 100 citocininas conocidas, entre sintéticas y naturales.

Los requerimientos estructurales para una actividad alta en las citocininas generalmente incluyen una molécula de adenina con un anillo de purina intacto y con un substituyente de tamaño moderado en el N⁶.

Una excepción para el requerimiento en el N⁶ es la difenil-urea y sus derivados. Ciertamente otras sustancias que carecen de un anillo de purina como la 8-azacinetina, la 6-bencilamino-8-azapurina y la 6-(3-metil-2-butenilamino)-8-azapurina solo presentan un 10% de actividad.

La substitución del N⁶ de la adenina por O o S dió como resultado un 90% más bajo en la actividad de promoción de crecimiento en el tabaco.

Las citocininas juegan un papel importante en todas las fases de desarrollo de la planta, desde la división celular hasta la formación de flores y frutos. Afectan el metabolismo incluyendo las actividades de enzimas y la biosíntesis de factores de crecimiento. También influyen la biogénesis de los -

organelos y los fluidos asimilados y los nutrientes dentro de la planta.

Las citocininas retardan la vejez y pueden proteger a la planta contra las circunstancias adversas del medio ambiente, como por ejemplo la violencia del agua.

Estos efectos tan diversos provienen de algunas funciones anabólicas primarias de las citocininas, y que todavía no han sido bien elucidadas.

Las citocininas han sido encontradas dentro de las moléculas del RNAt en gran número de organismos incluyendo bacterias, levaduras, plantas y animales. (Cherry y Anderson, 1971).

La citocinina natural, isopentil adenina (IPA), se localiza junto al anticodon, además el grupo isopentil es requerido por el RNAt específico para realizar eficientemente la sintesis de proteínas.

Resultados recientes mostraron que la citocinina dentro del RNAt puede tener una importante función regulatoria en la síntesis de proteínas.

En las semillas de haba (Anderson y Cherry, 1969) la aplicación de la citocinina 6-benciladenina produjo un incremento en los niveles de dos especies de leucil-RNAt. Aunque no obstante la relación de las citocininas y el RNAt puede no ser directamente asociada con la acción primaria de las citocininas sobre la actividad celular, y el control de la síntesis de proteínas por medio de la alteración del RNAt. Puede pensarse que la acción última de la hormona es vencer un mecanismo regulatorio en el crecimiento y en la morfogénesis.

ACCION DE LAS CITOCININAS
EN LAS ENZIMAS.

Las citocininas han mostrado tener influencia en la actividad de gran número de enzimas. Así por ejemplo, promueven la actividad de la tiramina metilferasa en raíces de embriones de cebada durante la germinación, (Mann 1963; Steinhart, 1964). Se ensayo la actividad de las citocininas con otras 4 enzimas pero no mostraron ninguna reacción.

La acción selectiva sobre la tiramina metilferasa está relacionada con el estado de desarrollo de las semillas, y no a una afinidad específica de la citocinina por la enzima.

Otras sustancias como las auxinas y la lisina también estimulan la actividad de la tiramina metilferasa, pero son menos efectivas.

Un efecto análogo de la cinetina promoviendo la síntesis de alcaloides en las raíces del Lúpulo fué reportado por S---koog y Armstrong en 1970.

La inducción de la actividad de la α -amilasa en semillas de cebada es un efecto muy conocido de las giberelinas. Este efecto es logrado en el trigo pero por el tratamiento con citocininas, (Boothby y Wright, 1962). Sin embargo este efecto es mucho menos marcado en el trigo que el efecto de las giberelinas en la cebada. En las semillas de cebada las citocininas no pueden reemplazar a las giberelinas, pero las citocinina puede neutralizar la inhibición que cause el ácido abscísico sobre la acción de las giberelinas. (Khan 1969).

La estimulación de la actividad de la α -amilasa en hipoc

cótilos aislados de chícharo, es estimulada por las citocininas pero no por las giberelinas o las auxinas. (Chum, 1967).

En las semillas de calabasa las citocininas, y no las giberelinas, promovieron la formación de la enzima isocitrato liasa y la actividad de la proteinasa en los cotiledones.

La síntesis de deoxisoflavonas en tejido de callo de haba es promovida por las citocininas y las auxinas, (Miller - 1969). La rapidez de la respuesta y de la detección de compuestos sugiere que el sistema podría ser útil como un bioensayo para las citocininas.

La velocidad de la síntesis de ribulosa-difosfato-carboxilasa y NADP dependen de la gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa, estudiadas en semillas de arroz parecen estar bajo el control de las citocininas. (Felerabend , 1969). La cinetina no afectó dichas enzimas hasta después de 96 horas de empezada la germinación. La actividad de la ácido-6-fosfogluconico-deshidrogenasa, localizada en el citoplasma, fué promovida también por la cinetina durante sus estados tempranos de germinación.

Con estos estudios se concluyó que probablemente las citocininas no están involucradas directamente en la información genética, aunque el nivel de citocininas puede determinar a los genes apropiados.

LAS CITOCININAS Y LA SÍNTESIS DEL ACIDO NUCLEICO.

Los primeros estudios con tejido de médula de tabaco mojado

traron que una porción de células tetraploides podía ser estimulada por tratamiento con cinetina para llevar a cabo la mitosis y aguantar la citocinesis sin la incorporación de timidina. Así el efecto de la cinetina sobre la división celular no fué asociado con la síntesis de DNA.

En cultivos de Lemna la 6-BAP invierte el efecto del ácido abscísico inhibiendo el crecimiento y la síntesis de ácido nucléico. (Overbuk, 1967).

La síntesis de DNA en respuesta a la cinetina; parece ser más rápida que la síntesis de RNA.

En ramas auxiliares de tabaco, inhibidas en el ápice, tratadas con 6-bencilaminopurina inician la síntesis de DNA y el crecimiento, (Skoog y Armstrong, 1970). Algunos inhibidores de crecimiento semejantes a la cloromicetina y la 6-azauracil separan los dos procesos, inhiben el crecimiento pero no la acción de la citocinina sobre la síntesis de DNA. Sin embargo, en vista de los primeros trabajos, parece que los efectos de la citocinina sobre la síntesis de DNA son indirectos.

En un estudio detallado sobre la tuberización, Palmer y Smith (1969), han mostrado que en estolones aislados de papa las citocininas inhiben la elongación del estolón e inducen la formación del tubérculo.

Otros factores que inhiben la elongación, pueden responder a las citocininas incrementando la elongación, pero por sí mismos no son factores inductivos.

Otros estudios sobre las citocininas sugieren que éstas actúan sobre la síntesis de proteínas, pero no están asociadas directamente con el DNA o con la síntesis de RNA. (Skoog y Armstrong, 1970).

Preparaciones del núcleo aislado de leche de coco e incubado con cinetina mostró una incorporación en mayor cantidad de los precursores de las proteínas y del RNA. (Datta y Sen, 1965).

Los efectos de la cinetina sobre la síntesis de RNA en un sistema in vitro conteniendo cromatina purificada y RNA - polimerasa de E.Coli han sido estudiados por Matthysse y Phillips, 1969. En presencia de una fracción de proteína, la cinetina estimuló la síntesis de RNA. Un efecto similar de guxina fué también mediado por una fracción de proteína.

Los efectos de la citocinina en este sistema no han sido estudiados con mucho detalle, sin embargo, Pellenberg (1969) ha observado que in vitro, uniendo la cinetina a la cromatina de epicótilos de chícharo causó una leve disminución en el punto de fusión del complejo núcleo-proteína.

LAS CITOCININAS EN EL RNAt.

Se ha sugerido que las citocininas endógenas de alguna manera ejercen su acción por estar incorporadas al RNAt. (Skoog y Armstrong, 1969). Por ejemplo, Fox y Chen (1967), reportaron la incorporación de la benciladenina, citocinina gtética, al RNAt en tejido de calle.

Richmond (1970) estudió la incorporación de bencil adenina marcada dentro del RNA de hojas viejas, pero no encontró gvidencias de incorporación. Sin embargo con otros investigadores bajo condiciones similares, la cinetina fué incorporada dentro del RNA. Recientemente Walker (1974) ha mostrado -

que la benciladenina, doblemente marcada, es incorporada dentro del RNAt en una frecuencia de una por 10^4 moléculas.

Chen y Hall (1969) han mostrado que la citocinina del tejido de callo de tabaco contiene el sistema que concta al grupo DELTA² isopentil al residuo apropiado dentro del RNAt. En el caso de tejido de callo crecido en presencia de benciladenina radiactiva, el RNAt todavía contuvo sus complementos derivados de la isopentil adenina y con todo esto la benciladenina fué incorporada dentro del RNAt. En general, varias purinas análogas pueden ser incorporadas dentro del RNA, del todo, de una forma no específica. Es muy posible que la incorporación ocurra dentro de fracciones del RNA y del RNAt, pero no se ha podido clasificar estrictamente en que fracciones exactamente del RNA, ya que no se desecha la posibilidad de error debido a la contaminación por otras fracciones del mismo RNA.

Para establecer si la incorporación de derivados de adenosina substituidos en el N⁶ dentro del RNAt tiene un significado biológico, sería necesario fraccionar el RNAt e identificar el material incorporado en una localización específica en la secuencia del RNAt.

MODELO PARA LA ACCION DE LAS CITOCININAS.

Las citocininas son encontradas en el RNAt de animales--microorganismos y plantas (Cherry, 1973). Además, en esos casos donde la secuencia de los nucleótidos es conocida, la citocinina natural, isopentil adenosina (IPA), o una forma modi

ficada, es encontrada junto al anticodon. Hasta el momento parece que todas las especies de RNAt conteniendo IPA reconocen los tripletes de codon, los cuales empiezan con Uracilo, (U), - (Skoog y Armstrong, 1970). Así, el circuito anticodon de una citocinina conteniendo RNA podría ser uno de al menos 16 secuencias de codon del siguiente tipo: A---IPA. Por eliminación la terminal necesaria y los codons de fenilalanina, parece que el IPA conteniendo RNAt podría ser confinado a menos de 10 codons. Podría ser que el IPA adyacente al anticodon de esas especies de RNAt juega algún papel en el reconocimiento del RNAm-RNAt-ribosomal, y que esas especies de RNAt son requeridas para la translación de algunos RNAs dentro de proteínas específicas. Basados en estas especulaciones es posible elaborar ideas sobre el mecanismo de acción de las citocininas en plantas. De estas observaciones parece ser que la citocinina no está incorporada al RNAt como unidad precursora, y el grupo isopentenilo proviene del ácido mevalónico, (Chen y Hall, 1969), más bien parece ser que las citocininas no tienen efecto sobre la síntesis del RNAt conteniendo IPA. Además un gran número de productos químicos, incluyendo varios isómeros de IPA, cinetina, 6-benciladenina, y aún la difenilurea, tienen actividades biológicas citocinéticas, pero dichas citocininas no participan en la síntesis del RNAt.

Entonces surge la pregunta: ¿Cuál es el mecanismo de acción de las citocininas?

El modelo presentado en la figura 7 está basado en la especulación de que nucleasas específicas rompen la ligadura fosfórica del IPA conteniendo el RNAt. El IPA podría proporcionar el enlace único entre la enzima y el RNAt. La acción -

de la nucleasa podría destruir la función del RNAt y dejar el campo libre para que actúe la citocinina.

Las citocininas, incluyendo la 6-benciladenina y la difenilurea, añadidas exógenamente a las plantas o a cultivos de tejidos podrían dilatar la vejez protejiendo a la citocinina conteniendo las especies de RNAt. Esta protección podría por la citocinina exógenamente añadida uniendo a la nucleasa e inhibiendo competitivamente su acción. Alternativamente la citocinina podría unir a otros agentes que a su vez volverían a prevenir un incremento en la actividad de la nucleasa, la cual podría destruir a la citocinina conteniendo el RNAt. -

Sin embargo el tejido tratado con citocina podría retener sus IPA conteniendo las especies de RNAt y continuar la síntesis de proteínas esenciales tanta como suficiente citocinina libre estuviera presente dentro del tejido. Trabajos de investigación de Locy (1974) proporcionan evidencias sugestivas de una nucleasa específica del RNAt. Hemos encontrado que cloroplastos de haba contienen una nucleasa que degrada específicamente una de los tres tirosiles del RNAt.

Hasta el momento no tenemos ninguna evidencia de que las citocininas controlen la actividad de la RNAt nucleasa.

Todo este modelo es hipotético, sin embargo proporciona una base sobre la cual investigar el mecanismo de acción de las citocininas, a nivel molecular.

La figura 7 es un modelo de acción de la citocinina basado en el hecho de ser conocidas las RNAt nucleasas específicas. Esto sugiere que la citocinina libre protege a la citocinina conteniendo a los RNAt por inhibición de la actividad de la nucleasa.

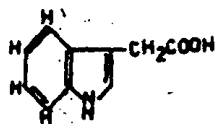
RESUMEN.

Las citocininas incrementan la actividad de gran número de enzimas, aunque no de una manera directa, también incrementan la cantidad producida de DNA en muchos tejidos, y la velocidad de la síntesis de RNA en tejidos viejos. Sin embargo - muchos estudios señalan que los efectos de la citocinina sobre la síntesis de ácidos nucleicos probablemente no se deben a un efecto directo sobre el DNA contenido en el gen. Por algunos años hubo gran alboroto por el hecho de encontrar a la citocinina natural en algunas especies de RNAt.

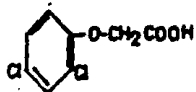
Años después se presentaron datos que mostraban la incorporación de la 6-benciladenina, citocinina sintética, directamente sobre el RNAt. Estudios posteriores refutaron esto al comprobar que dicha citocinina no era incorporada dentro del RNAt sino en otras formas más pesadas del RNA.

El modelo presentado sugiere que las citocininas libres actúan como agentes de protección de las moléculas de RNAt - que contienen a la citocinina natural, dichas moléculas se encuentran en el interior de células de plantas. Este modelo - también sugiere que existen nucleasas específicas que degradan solo ciertas especies de RNAt. La citocinina libre inhibe a su vez a las nucleasas ya sea por un producto de inhibición o por algún otro mecanismo que evita que la enzima ataque a los RNAt que contienen a la citocinina natural.

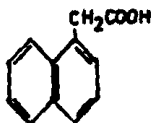
En la actualidad existe poca evidencia que sostenga a este modelo.



ACIDO INDOLACETICO
(IAA)



ACIDO 2,4-DICLOROFENOXI-
ACETICO.
(2,4-D)



ACIDO NAFTALENACETICO
(NAA)

FIG. 1. Estructuras de algunas AUXINAS.



GIBBERELINO.

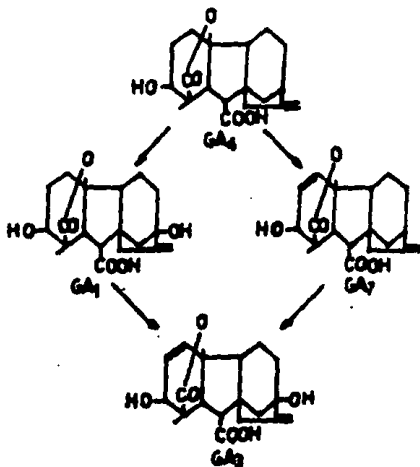


FIG. 2. Conversión de GA4 e GIBBERELINA común.

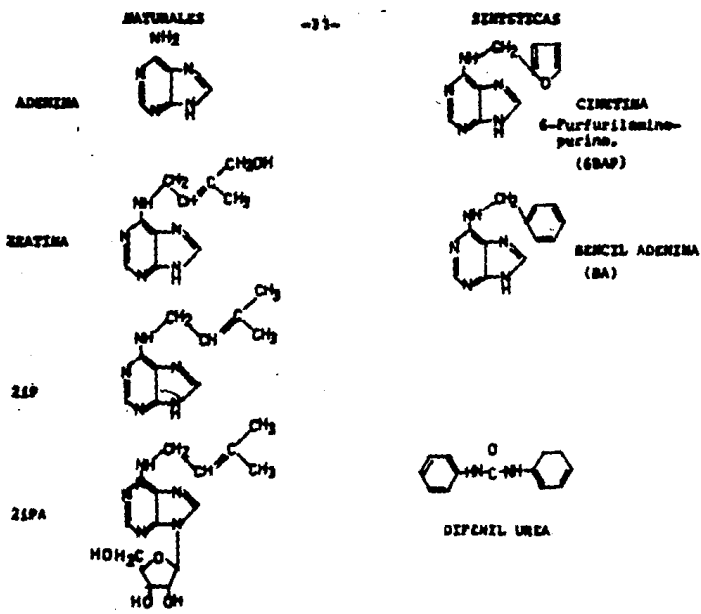


FIG. 3. Estructura de algunas CITOQUINAS NATURALES Y SINTÉTICAS.

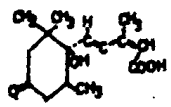


FIG. 4. Estructura del ACIDO ABSISICO.

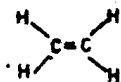


FIG. 5 . Estructura del etileno.

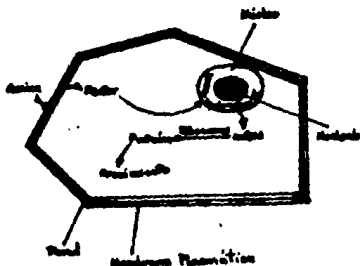


FIG. 6. Modelo hipotético de la acción de la auxina en la célula vegetal.

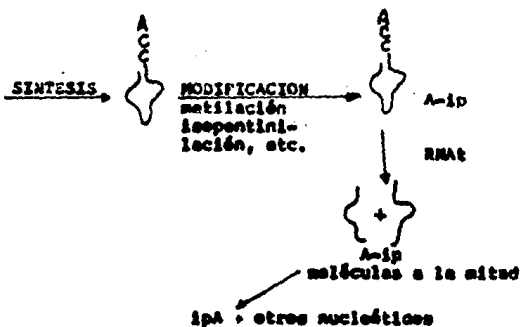


FIG. 7. Mecanismo de acción de las citocininas a nivel molecular.

IV. MATERIAL Y METODOS.

MEDIO DE CULTIVO: El medio de cultivo para la siembra -
del espárrago por micropropagación fué el siguiente:

CONCENTRACION	mg/lt.
NH_4NO_3	1650.000
KNO_3	1900.000
CaCl_2	440.000
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.830
KH_2PO_4	170.000
H_3BO_3	6.170
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	17.000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.600
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
Na_2EDTA	37.300
Sacarosa	30 000.000
Inositol	10.000
Tiamina	0.100
Piridoxina	0.500
Glicina	5.000
Sulfato de adenina	125.000
Acido nicotínico	0.500
Agar-agar	8 000.000
pH	5.000

Este medio contiene elementos básicos recomendados por Murashige y Skoog (macroelementos, microelementos, vitaminas, azúcares, aminoácidos e inositol), además se le adiciona otro elemento recomendado por Start y Cummings: sulfato de adenina que actúa como factor sinérgico en la división celular a una concentración de 125 mg/lit.

MEDIO DE CRECIMIENTO Y ENRAIZAMIENTO.

Para este medio se recomienda sólo el empleo de los elementos mencionados anteriormente ajustando el pH a 5.7, el ajuste se realiza con HCl 0.1N y KOH 0.1N .

El esterilizado de los medios se hace en autoclave a una temperatura de 120°C y a 1.5 Kg/cm² de presión por un tiempo de 15 minutos.

La siembra se realiza en condiciones estériles, dentro de una campana de flujo laminar, y todo el material utilizado para la manipulación de los tejidos debe igualmente estar esterilizado.

CONDICIONES DEL CUARTO DE CRECIMIENTO.

El cuarto de crecimiento para la etapa de proliferación y diferenciación se mantuvo a una intensidad luminosa de 1000 lux y un fotoperíodo de 16 horas y 8 horas de oscuridad.

La temperatura del cuarto fue de 23°C ± 2°C.

Las lámparas fluorescentes de 40 watts a 120 volts del -
cuarto emiten luz blanca fría del tipo comercial, así el in-
cremento de la temperatura en el período de iluminación es ra
lativamente bajo en comparación con el incremento alcanzado -
con focos de filamento incandescente.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño experimental se llevo a cabo en dos partes.

1a. PARTE. El objetivo de esta parte era fraccionar la planta en todas sus partes posibles y sembrarlas en diferentes posiciones, para poder saber como debía sembrarse y que parte de la planta podría satisfacer los objetivos del investigador.

El otro objetivo de esta primera parte era ensayar el rango de concentración adecuado para la hormona ANA (ácido naftalen acético), para la micropopagación de espárrago.

En esta primera prueba todo fué empírico ya que no se había recopilado literatura.

Se emplearon concentraciones en progresiones logarítmicas, para tener rangos amplios de estudio, ANA (ácido naftalen acético) con KIN (cinetina).

CINETINA (mg/lt)	ANA mg/lt	0.09	0.30	3.00
	0.01	1	2	3
	0.10	4	5	6
	1.00	7	8	9

De cada concentración se hicieron varias pruebas, con to dos los explantes posibles y así se sembraron: meristemas apicales, meristemas laterales o yemas, tallos colocados en posición vertical, tallos colocados en posición horizontal (longitudinalmente), callos con brote de esturión extirpado, callos con brote de esturión no extirpado, esturiones completos sin calle, tejido de esturión cortados transversalmente, y callos sin brotes.

Todos estos cortes se obtuvieron de tejido de corona de espárrago micropropagados en medios de cultivo para otras especies, pero sin contener hormonas.

En cada concentración se efectuaron tres ensayos con siete muestras cada uno con el siguiente número de tejidos:

CONCENTRACION # 1 : ANA= 0.09 mg/lt. KIN= 0.01 mg/lt.

- A.- 5 meristemas apicales.
- B.- 5 tallos colocados en posición longitudinal.
- C.- 5 tallos colocados en posición vertical.
- D.- 5 callos con brote de esturión no extirpado.
- E.- 5 callos.
- F.- 5 yemas o brotes laterales.
- G.- 5 tejidos de esturión.

CONCENTRACION # 2 : ANA = 0.03 mg/lt KIN = 0.01 mg/lt.

- A.- 5 meristemas apicales.
- B.- 5 tallos colocados en posición vertical.
- C.- 5 tallos colocados horizontalmente.
- D.- 5 callos.
- E.- 5 callos con brotes de tallos.
- F.- 5 meristemas laterales.

G.- 5 meristemas laterales.

CONCENTRACION # 3 : ANA = 3.0 mg/lt. KIN = 0.01 mg/lt.

A.- 5 meristemas apicales.

B.- 5 tallos colocados verticalmente.

C.- 5 callos con brote de esturión no extirpado.

D.- 5 callos.

E.- 5 callos con brote de tallo extirpado.

F.- 5 yemas o meristemas laterales.

G.- 5 callos con brotes de esturión extirpado.

CONCENTRACION # 4 : ANA = 0.09 mg/lt. KIN = 0.1 mg/lt.

A.- 5 meristemas apicales.

B.- 5 callos con brote de esturión extirpado.

C.- 5 tallos colocados horizontalmente.

D.- 5 callos.

E.- 5 tallos colocados verticalmente.

F.- 5 meristemas laterales.

G.- 5 meristemas apicales.

CONCENTRACION # 5 : ANA = 0.3mg/lt. KIN = 0.1 mg/lt.

A.- 5 meristemas apicales.

B.- 5 tallos colocados en posición vertical.

C.- 5 callos.

D.- 5 callos con brotes de esturión.

E.- 5 callos con brote de esturión extirpado.

F.- 5 meristemas apicales.

G.- 5 meristemas laterales.

CONCENTRACION # 6 : ANA = 3.0 mg/lt. KIN = 1.0 mg/lt.

- A.- 5 meristemas apicales.
- B.- 5 tallos colocados verticalmente.
- C.- 5 callos con brotes de esturión extirpado.
- D.- 5 meristemas apicales.
- E.- 5 meristemas laterales.
- F.- 5 callos con brotes de esturión no extirpados.

CONCENTRACION # 7 : ANA = 0.09 mg/lt. KIN = 1.0 mg/lt.

- A.- 5 meristemas apicales.
- B.- 5 meristemas laterales.
- C.- 5 callos con brotes de esturión.
- D.- 5 tallos en posición horizontal.
- E.- 5 callos con brotes de tallos extirpados.
- F.- 5 tallos colocados verticalmente.
- G.- 5 meristemas apicales.

CONCENTRACION # 8 : ANA = 0.3 mg/lt. KIN = 1.0 mg/lt.

- A.- 5 meristemas apicales.
- B.- 5 callos con brotes de tallo extirpado.
- C.- 5 callos con brotes de esturión extirpado.
- D.- 5 meristemas laterales.
- E.- 5 callos.
- F.- 5 tallos colocados horizontalmente.
- G.- 5 meristemas apicales.

CONCENTRACION # 9 : ANA = 3.0 mg/lt. KIN = 1.0 mg/lt.

A.- 5 meristemas apicales.

B.- 5 tallos en posición horizontal.

C.- 5 calles con brotes de esturión extirpado.

D.- 5 tallos colocados verticalmente.

E.- 5 calles con brote de esturión.

F.- 5 calles con brotes de tallos extirpados.

G.- 5 meristemas apicales.

V. RESULTADOS DEL 1^{er} CUADRO.

La observación de estas pruebas se llevó a cabo a los 151 días o 5 meses o 20 semanas de siembra.

La mejor concentración para el ácido naftalen acético, (ANA), fué de 0.09 mg/lit y para la cinetina, (KIN), es de 0.1 mg/lit.

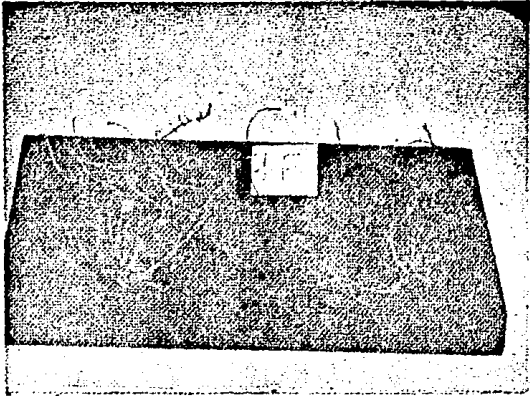
La segunda observación fué que el calle sin brotes no da ba proliferación de brotes ni raíces.

La tercera observación es que los meristemas apicales son el mejor tejido para la micropropagación de espárrago.

A continuación se presentan algunas fotografías de lo más relevante de esta primera prueba.

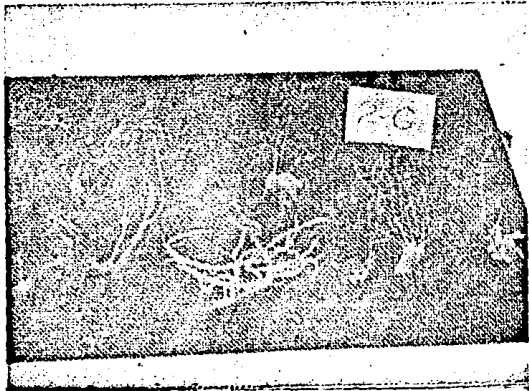
CONCENTRACION # 1 : ANA = 0.09 mg/lit KIN = 0.01 mg/lit

En esta concentración pocos fueron los explantes que se desarrollaron, solo los meristemas apicales y laterales, ya que los demás no crecieron. Los meristemas desarrollaron tallos abundantes y muy largos pero raíces cortas y muy escasas.



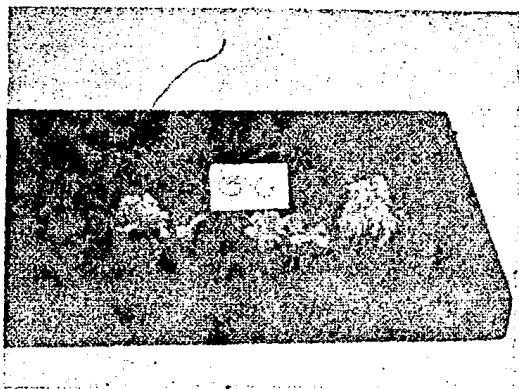
CONCENTRACION # 1.

CONCENTRACION # 2 : ANA = 0.3 mg/lt KIN = 0.01 mg/lt., no todos los tejidos daban raíz, y los que daban, sus raíces resultaron demasiado delgadas. Además los tallos que proliferaron fueron demasiado delgados y sus puntas se secaban.



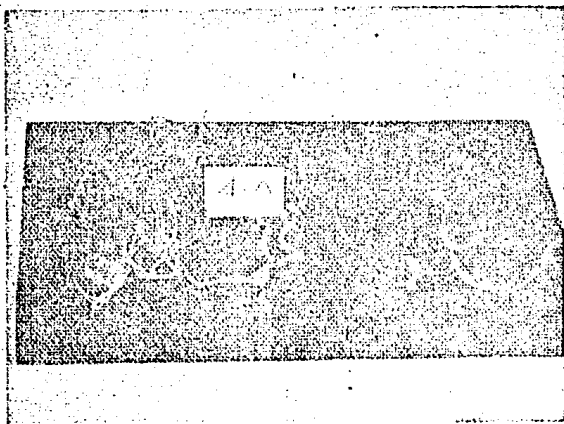
CONCENTRACION # 2.

CONCENTRACION # 3 : ANA = 3.0 mg/lt KIN = 0.01 mg/lt., es-- la concentración que dió los peores resultados, solamente desarrolló raíces cortas y muy gruesas, la proliferación y diferenciación fueron nulas. Otra observación sobre esta concentración es que todos los explantes de cualquier tejido, desarrollaron igual, solo raíces.



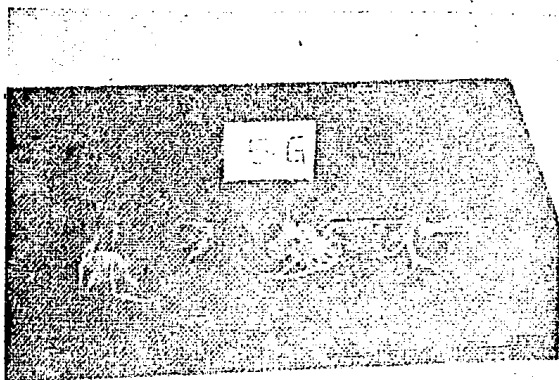
CONCENTRACION # 3.

CONCENTRACION # 4 : ANA = 0.09 mg/lt KIN = 0.1 mg/lt., en esta concentración hay resultados satisfactorios ya que hay una proliferación y diferenciación plantular muy aceptable, y de buen tamaño. Se observa raíz de buen grosor, ni tan delgada ni tan ancha. Todos los explantes presentan tamaño regular. Hay aparición de callo, de tallos de buen grosor y abundantes y también hay desarrollo de meristemas laterales.



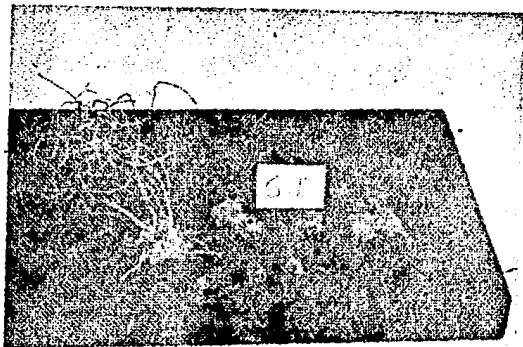
CONCENTRACION # 4.

CONCENTRACION # 5 : ANA = 0.3 mg/lit KIN = 0.1 mg/lit, tuvo a bundancia de raíces, pero más cortas y delgadas que la con centración # 4, hay una diferenciación casi nula, y la brotación apical fué raquílica.



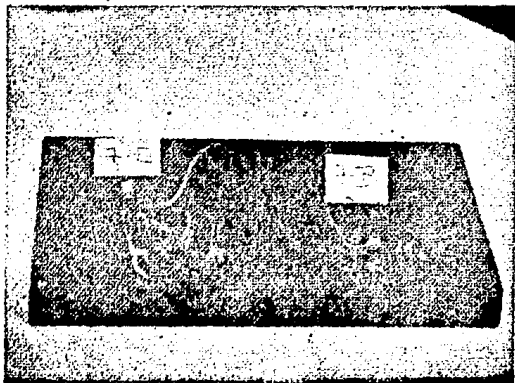
CONCENTRACION # 5.

CONCENTRACION # 6 : ANA = 3.0 mg/lt KIN = 0.1 mg/lt, muestra poca desarrollo en la raíz, y los ápices de los tallos -
tienden a secarse. En otros tejidos ni siquiera hay desarrollo de tallos.

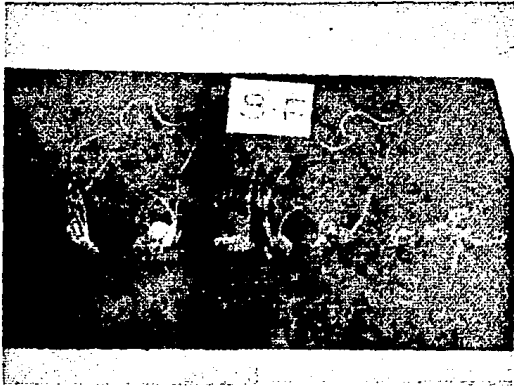


CONCENTRACION # 6.

CONCENTRACION # 7 : ANA 0.09 mg/lt KIN = 1.0 mg/lt., hubo poca brotación apical y de tallos, y estos últimos tienden a secarse hasta el ápice. La brotación de raíz es nula.

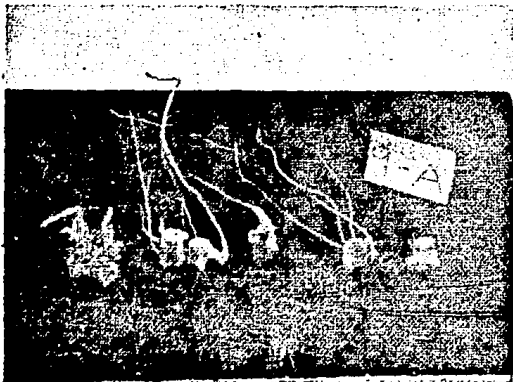


CONCENTRACION # 8 : ANA 0.3 mg/lt KIN = 1.0 mg/lt., la brotación de raíz es casi nula, la brotación de ápices es escasa y no desarrollan todos los brotes de tallo.



CONCENTRACION # 8

CONCENTRACION # 9 : ANA = 3.0 mg/lt. KIN = 1.0 mg/lt., la brotación apical es poca, mucho menos que en la 8, y no hay desarrollo de raíces.



2a. PARTE DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

Tiene como base los resultados de la 1a. parte experimental, estos son los resultados:

1.-Los tejidos que mejor proliferación y diferenciación ofrecen son:

a) Meristemas apicales, cuya forma es cónica, deben ser colocados sobre su base en el medio de agar, tocando el medio sin penetrarlo.

b) Porciones del tallo, colocados horizontalmente sobre el medio.

c) Esturiones, tienen la forma cilíndrica y deben ser colocados sobre su eje de crecimiento.

d) Tejido de esturión, que es el corte transversal del esturión y deben colocarse sobre el corte.

e) Callos con brote de esturión extirpado.

(VER FOTOGRAFÍAS CORRESPONDIENTES).

2.- En el rango de menores concentraciones de ANA, se obtienen los mejores resultados de proliferación plantular, por lo que se estudió dicha hormona en el siguiente rango para aproximarse a la concentración óptima: 0.03 mg/lit; 0.1 mg/lit.; y 0.3 mg/lit. .

Se ensayará ANA con EIN, y ANA con 6BAP (6-bencilamino-purina). La 6BAP se estudia porque sus efectos son similares a los de la cinetina.

La concentración recomendada para el 6 BAP, en otras especies vegetales es de 5.0 mg/lt., y su rango en escala logarítmica en cuanto a su menor concentración es de 0.5 mg/lt., y la mayor es de 50 mg/lt.. Esta última se descarta ya que concentraciones mayores de 20 mg/lt. en hormonas de plantas resultan inhibitorias para el desarrollo plantular, por lo que se escoge una concentración de 10 mg/lt., que es el doble de la concentración óptima para otras especies vegetales.

Así las concentraciones estudiadas serán las siguientes:

mg/lt	ANA	0.03	0.1	0.3
K	0.01	1	2	3
I	0.10	4	5	6
H	1.00	7	8	9

mg/lt	ANA	0.03	0.1	0.3
6-	0.5	1	2	3
B				
A	5.0	4	5	6
P				
	10.0	7	8	9

Para cada concentración se hicieron 10 muestras, conté —
siendo cada una las siguientes explantes:

a) 3 maristemas apicales por muestra.

b) 4 porciones de tallo colocados horizontalmente por -
muestra.

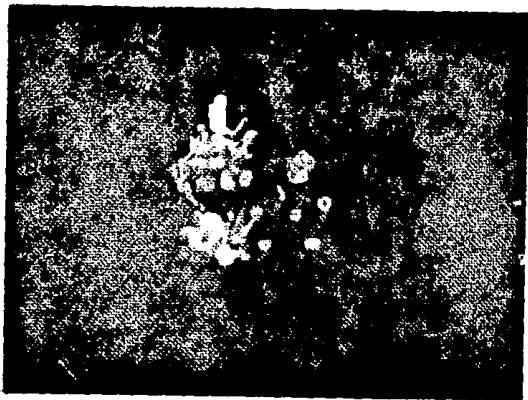
c) 3 esturiones por muestra.

d) 3 explantes de tejido de esturión por muestra.

e) 1 calle con esturiones extirpados por muestra.

PARTES SEBRADAS.

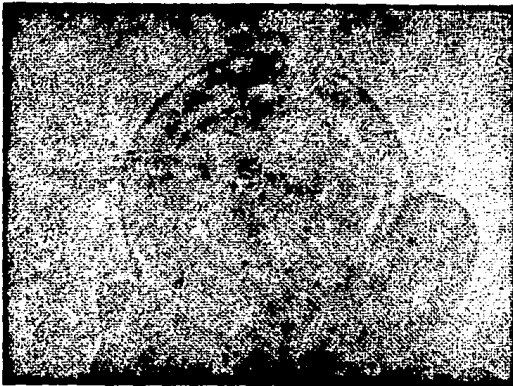
Se sembraron tejidos de esturión y esturiones completos. Las rodajas muestran el tejido de esturión. En el racimo del centro se aprecia el esturión completo. Y en la parte derecha superior de la fotografía se aprecia el callo con esturión ex tirpado.



Se sembraron también tallos, y horizontalmente colocados de manera que toda la superficie toque el medio, ya que este dará origen al calle, y posteriormente al esturión y a algunos tallos.



Los meristemas apicales o puntas, son la parte extrema - extrema superior de tallos, y los tejidos de espárrago que a corto plazo dan plántula completa con raíz, callo, esturión y tallo.



Tamaño original del espárrago.



En la siguiente fotografía se muestra la corona del espárrago de donde se sacaron los primeros explantes.



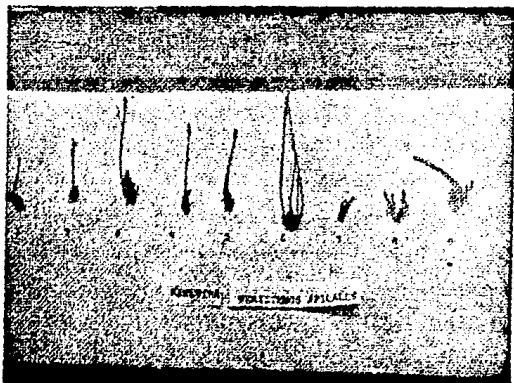
RESULTADOS FINALES DE ANA CON KIN.

El explante de meristema apical, con mayor diferencia — ción y proliferación se muestra en la concentración # 9, es — decir, ANA = 0.3 mg/lt. y KIN = 1.0 mg/lt.

Aunque la primera aparición de raíz fué en la concentra— ción # 4 : ANA = 0.03 mg/lt y KIN = 0.1 mg/lt.

Se puede escoger la concentración dependiendo de los ob— jetivos que se persigan, ya que si se quieren plántulas com— pletas a corto plazo se podría escoger la concentración # 9.

Si se quiere proliferación de tallos para tener explante de meristema apical y tallo se podría escoger la concentra— ción # 6.

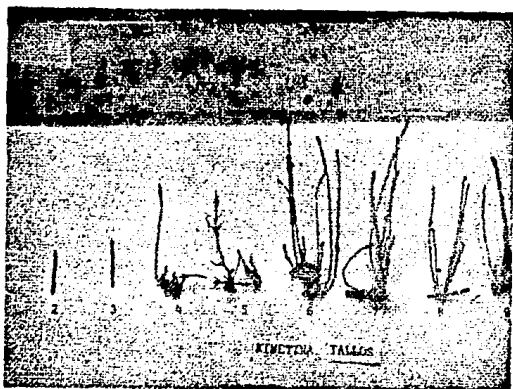


EXPLANTES DE TALLOS EN ANA CON KIN.

En los explantes de partes de tallos, su mayor proliferación se encuentra en la concentración # 6, o sea, ANA = 0.3 mg/lt. y KIN = 0.01 mg/lt., sin embargo, los tallos desarrollados son muy delgados y posteriormente se empiezan a secar y no resisten el trasplante.

También hay buena proliferación en la concentración # 7, o sea, ANA = 0.03 mg/lt. y KIN = 1.0 mg/lt. hay buena proliferación y grosor del tallo.

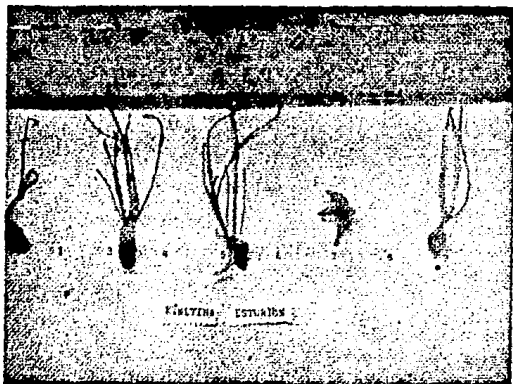
En la siembra de tallos hay el inconveniente de que no se desarrolla la plántula completa, solamente crece el tallo y el callo, pero carecen de raíces, que aparecen en períodos muy largos, y solo servirían para poder sacar más explantes de ellos, de meristemas apicales y tallos.

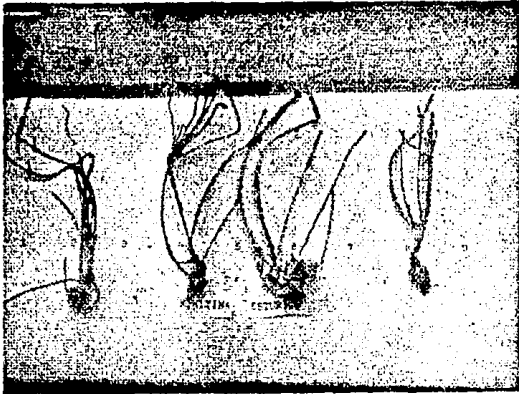


EXPLANTES DE ESTURION EN ANA CON KIN.

En el explante de esturión hay proliferación de tallos, y la concentración más inhibitoria es la # 7 : ANA = 0.03mg/lt. y KIN = 1.0 mg/lt..

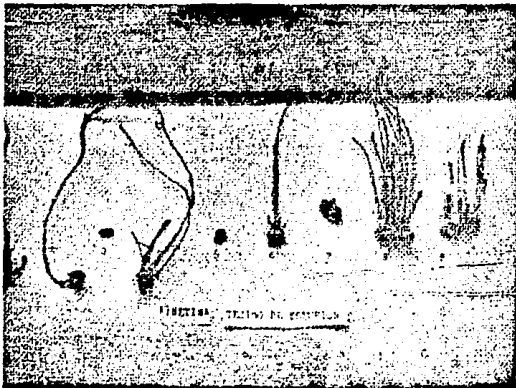
La mejor diferenciación y proliferación, se logra en la concentración # 6, porque muestra iniciación de raíces, al igual que buena proliferación del tallo con buen grosor, y poco calle. Sin embargo los esturiones desarrollan escasos esturiones, inconveniente desde el punto de vista comercial, ya que el esturión es el que se consume en la industria alimenticia.





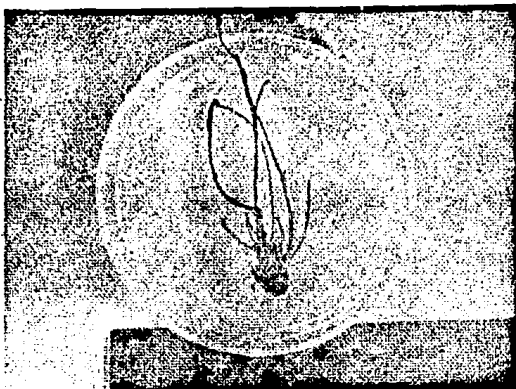
EXPLANTES DE TEJIDO DE ESTURION, ANA CON KIN.

Este explante da generalmente tallos, y depende del ancho y grosor del tejido estirpado para que dé más o menos tallos. La concentración óptima para este explante es la # 4 :- ANA = 0.03 mg/lt. y KIN = 0.1 mg/lt., en esta concentración - hay inducción a la raíz. Iguales resultados se dieron en esta concentración pero con meristemas apicales.



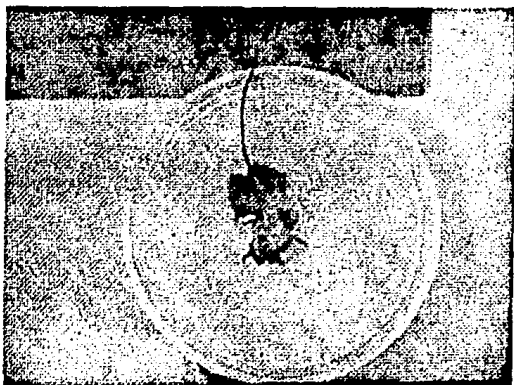
Explante de tejido de esturión en la concentración # 4 :

ANA CON KIN.



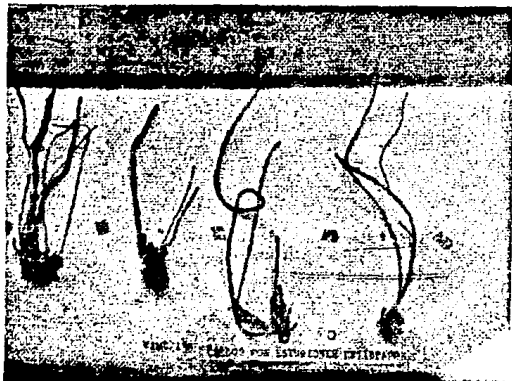
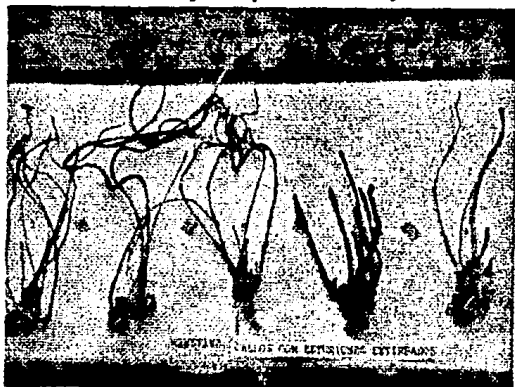
Explante de tejido de esturión en la concentración # 6 :

ANA con KIN.



EXPLANTES DE CALLO CON ESTURIONES EXTIRPADOS.

Este explante da buena proliferación de tallos, mejor que las de esturión sin callo. La mejor concentración para que haya aparición de raíces, junto con proliferación de tallo y de buen grosor es la # 3 : ANA = 0.3 mg/lt. y KIN = 0.01 mg/lt. Esta concentración es recomendable con este tipo de tejido para obtener buen número de meristemas apicales y de tallos. También hay aparición de esturiones en la concentración # 9 : ANA = 0.3 mg/lt. y KIN = 1.0 mg/lt.



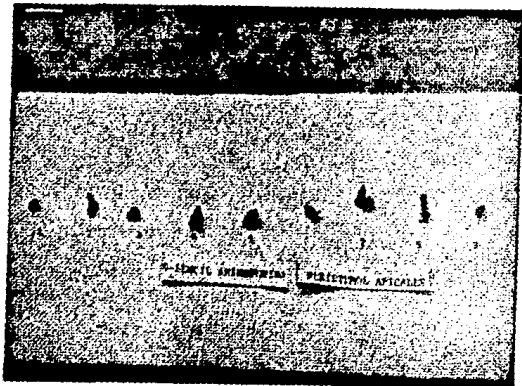
RESULTADOS FINALES DE ANA CON 6 BAP.

Tiempo de cultivo = 45 días.

EXPLANTES DE MERISTEMAS APICALES.

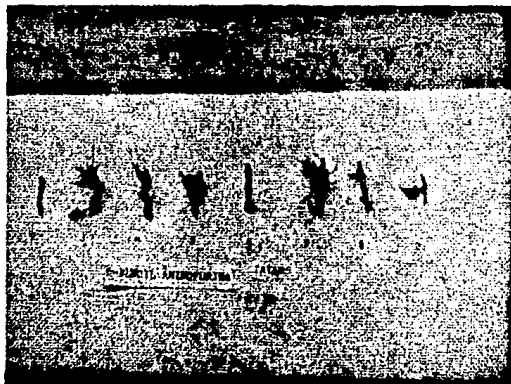
El desarrollo y diferenciación con el 6BAP es más lento que con cinetina.

Mientras que en concentraciones específicas de KIN los meristemas apicales desarrollan plántulas completas, en este mismo tejido con el 6BAP casi no hay desarrollo, y aún en un tiempo más largo no hay crecimientos notables ni diferenciación.

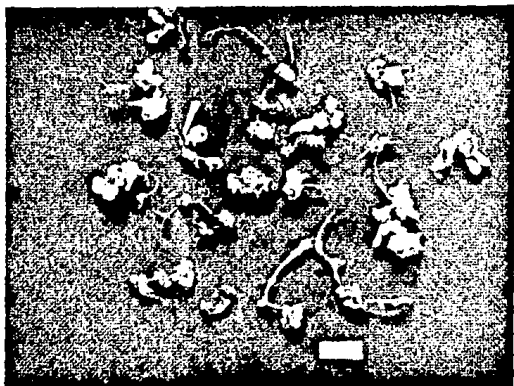


EXPLANTES DE TALLOS EN ANA CON 6 BAP.

La proliferación y diferenciación son más lentas que con la cinetina. En este explante con KIN se obtuvieron talles - largos, con el 6 BAP en la concentración de 10 mg/lit y ANA - 0.03 mg/lit. hay una marcada tendencia a brotes de esturión. A los 60 días los tallos con 6 BAP dan abundancia de esturiones.



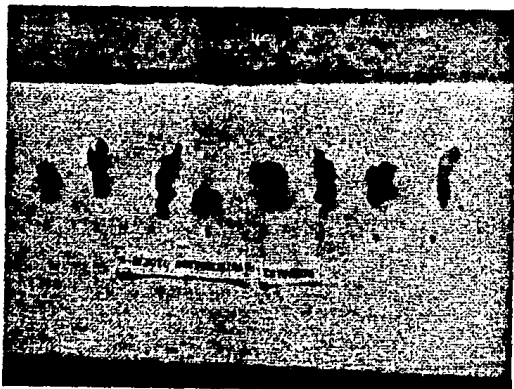
De los explantes de tallos con 6 BAP a los 45 días de -
sembrados, hay proliferación de esturiones, sin embargo toda-
vía en este tiempo no hay aparición de raíces.



EXPLANTES DE ESTURION CON 6 BAP.

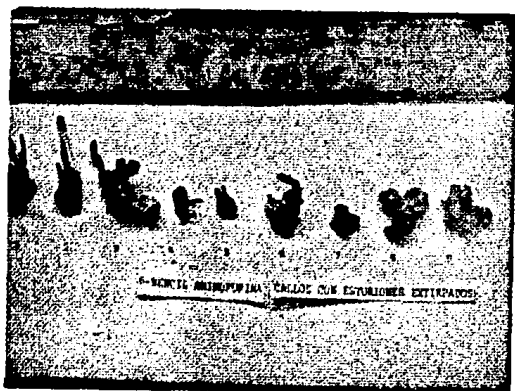
El esturión en 6 BAP solamente tuvo un mayor crecimiento y hay tendencia al brote de tallos.

La mejor concentración para el desarrollo es el # 6, donde hay mayor crecimiento y engrosamiento del esturión, la concentración es : ANA = 0.3 mg/lt. y 6 BAP = 5 mg/lt., sin embargo a los 60 días permanecen cortos aunque abundantes, no hay raíces, poco callo, muy poco tallo.

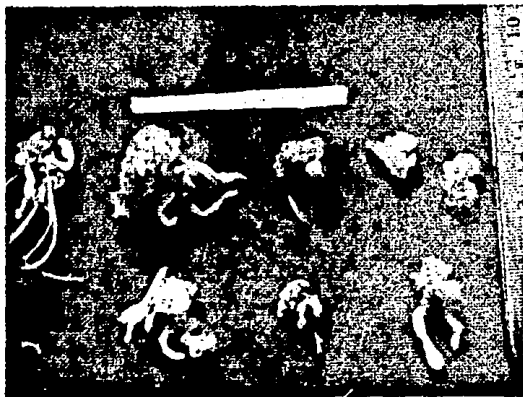


EXPLANTES DE CALLOS CON ESTURIONES EXTIRPADOS.

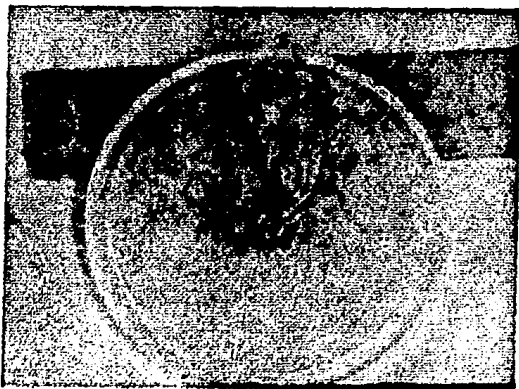
Con el 6 BAP este tipo de explantes da abundantes esturiones, anchos y largos, poca calle, y no hay aparición de raíces. La mejor concentración es la # 3 : ANA = 0.3 mg/lt. y 6BAP = 0.5 mg/lt. Este tipo de explante tiene ventaja sobre el explante de esturión simple, ya que tiene mayor desarrollo de esturiones y hay poca tendencia al desarrollo abundante de tallo, en este medio de 6 BAP, sin embargo este medio tiene desventajas con el de KIN, ya que a largo plazo (60 días), el esturión no es muy grande, se estanca en su crecimiento, mientras que con KIN ya hay aparición de raíz, tallo abundante, y formación de esturiones.



Aquí se muestra el crecimiento de los esturiones a los--
60 días de sembrado en ANA con 6 BAP en la concentración # 5
6 BAP = 5.0 mg/lt. y ANA = 0.1 mg/lt.



Explante de esturión con GBAP. Abundante esturión, poco tallo, poco callo, ausencia de raíz.

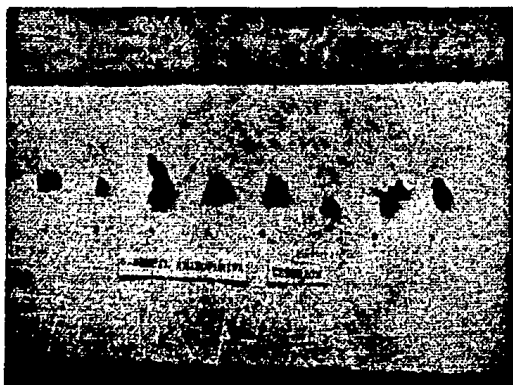


EXPLANTE DE TEJIDO DE ESTURION EN ANA CON 6BAP.

El crecimiento más notorio en este explante se da en la concentración # 4 : ANA = 0.03 mg/lt. y 6BAP = 5 mg/lt.

El crecimiento fué mas lento con el 6BAP que con KIN, la diferenciación es poca con el 6 BAP, y con la KIN es mejor.

Con el 6 BAP se tiende al engrosamiento del esturión solamente, mientras que con la KIN existe una marcada tendencia a la inducción de desarrollo del tallo y la raíz, y casi es nulo el desarrollo de esturión en la concentración # 4 de ANA con KIN, o sea, ANA = 0.03 mg/lt. y KIN = 0.1 mg/lt.



METODO FINAL DE CULTIVO DE ESPARRAGO.

MEDIO DE CULTIVO: El medio de cultivo óptimo para la micropropagación de espárrago con mayor proliferación y diferenciación, en el menor tiempo es el siguiente:

Explante: MERISTEMA APICAL.

CONCENTRACION DEL MEDIO	mg/lit.
NH_4NO_3	1 650.000
KNO_3	1 900.000
CaCl_2	440.000
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.830
KH_2PO_4	170.000
H_3BO_3	6.170
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	17.000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.000
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
Na_2EDTA	37.300
Sacacosa	30 000.000
Inositol	10.000
Tiamina	0.100
Piridexina	0.500
Glicina	5.000
Sulfato de adenina	125.000
Acido nicotínico	0.500
Agar-agar	8 000.000

CONCENTRACION

Acido naftalen acético (ANA)

0.030

Cinetina (KIN)

0.100

pH

5.7

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VI. DISCUSION.

1.- ¿ Por qué el ensayo de las diferentes concentraciones de ANA, KIN, y 6BAP?

La concentración de ANA se estudia en el rango de 0.9 , - 0.3 , y 3.0 mg/lt. ya que para especies vegetales es recomendada en una concentración de 0.1 mg/lt, pero no precisamente para el espárrago.

La 6 BAP para varias especies vegetales se recomienda en una concentración de 5 mg/lt. Estudiando esta hormona en su límite inferior en escala logarítmica es de 0.5 mg/lt., y su límite superior sería de 50 mg/lt. . Esta última concentración es muy alta en hormonas para aplicarse en plantas, ya que concentraciones mayores de 20 mg/lt. resultan inhibitorias en el crecimiento de plantas, por lo que se eligió la concentración de 10 mg/lt. como límite superior.

La KIN si se escoge en concentraciones de escala logarítmica a partir de la concentración recomendada que es de 0.1 mg/lt.. para algunas especies vegetales, el límite superior es de 1.0 mg/lt. y el menor es de 0.01 mg/lt.

2.- ¿ Por qué se extirpe el espárrago en todas sus partes posibles para sembrar ?

Para poder observar qué tejido de la planta respondían mejor a las hormonas teniendo mayor proliferación y mayor diferenciación.

3.- ¿ Por qué se hizo la primera observación de crecimiento a los 151 días en la primera siembra, y después en la segunda siembra se hizo a los 45 días.

La primera observación se hizo a los 151 días debido a que no teníamos un límite de tiempo preciso para el desarrollo, además había explantes, el de calle exactamente, que esperamos respondiesen a la hormona, pero no lo hicieron.

Esta primera parte nos dió los datos para saber en que tiempo se efectuaban los primeros brotes, y asífué como posteriormente la segunda observación se llevó a cabo a los 45 días, en este tiempo, como se aprecia en las fotografías ya existe un tamaño y una diferenciación apreciables, al igual que proliferación.

VII. CONCLUSIONES.

Las hormonas a las que mejor respondió el espárrago fueron:

Acido naftalen acético (ANA), aplicada junto con Cinetina (KIN) en la siguiente concentración: ANA = 0.03 mg/lit y KIN = 0.1 mg/lit. . A dicha concentración inducen una buena proliferación y diferenciación siempre y cuando se utilice el explante de meristema apical.

Puede haberse pensado en la concentración # 9 , ya que el tamaño de la raíz es mucho más apreciable que en la concentración # 4, con el mismo explante, pero la verdad es que raíces muy gruesas y poco largas al tiempo resultan contraproducentes, ya que no pueden penetrar el medio, ocasionando desnutrición a la planta y posteriormente la muerte.

Se puede concluir por las observaciones de desarrollo que la KIN en concentraciones mayores o iguales a 1.0 mg/lit. causan a medida que va aumentando la concentración, un engrosamiento gradual en los tejidos plantulares tendiendo a la inhibición total en proliferación y diferenciación.

La ANA produce buena proliferación y ayuda a la diferenciación a bajas concentraciones, de 0.09 a 0.03 mg/lit.; con concentraciones más altas empezando con 0.1 mg/lit. se observa inhibición al desarrollo plantular.

En cuanto al 6 BAP resulta poco recomendable en el cultivo de espárrago por micropropagación, ya que los resultados de su aplicación son : INHIBICION. Y aún dándole más tiempo de desarrollo, no pudo ofrecer resultados satisfactorios.

En lo referente al tejido sembrado con mejores resultados para formar plántulas completas, bien diferenciadas, de buen tamaño y grosor en todos sus tejidos, fué el explante de MERISTEMAS APICALES.

Ahora bien, podrían aprovecharse otros tejidos para obtener primeramente gran producción de meristemas apicales en el menor tiempo posible, y posteriormente hacer el explante de meristema apical y obtener plantas completas finalmente.

Otro tejido aprovechable es el esturión completo en la concentración # 4, ya que desarrolla gran cantidad de meristemas apicales, que como dijimos anteriormente, pueden ser resembrados y formar plantas completas. Esta concentración se refiere a ANA con KIN.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Erston V. Miller, "Fisiología vegetal"
Ed. Uteha S.A. , México D. F. 1981.
- 2.- A. Fahn, "Anatomía Vegetal".
Ed. H. Blume, Madrid, España. 1978.
- 3.- Hartcourt, Brace and Word, "Biología : Unidad, Diversi --
dad y Continuidad de los Seres Vivos"
John A. Moore, Edward F. Dehenhardt, Bentley Glass, Luke
Hallenbeck y colaboradores, traducido por Arturo Gómez -
Pompa, Gonzalo Halffter y colaboradores.
Ed. Cecsá, México 1970.
- 4.- Hudson T. Harmann, Dale E. Kester, "Propagación de Plan--
tas, principios y prácticas".
Ed. Cecsá, México D.F. 1977. 3a. Edición.
- 5.- G. O. Huterwal, "Hidroponia, Cultivo de plantas sin tie--
rra".
Ed. Albatros. Buenos Aires, 1979.
- 6.- Stephen A. Garrison, J. Howard Ellison, "Asparagus Start--
Up Slow But Goes ON and On; Rhubarb Also Takes Own Sweet--
Time",
United States Department of Agriculture. Agriculture In--
formation Bulletin 409.

- 7.- T. Murashige, M. N. Shabde, P. M. Hasegawa, F. H. Takatori, y J. B. Jones, "Propagation of Asparagus Trough sbot apex culture. I. Nutrient medium for formation of Plan -- tlets".
Journal of the American Society for Horticultural Science 1972 97 (2) : California University, Riverside. 158-161.
- 8.- F. C. Steward and Marion O. Mapes. "Morphogenesis and - Plant Propagation In Aseptic Cultures of Asparagus".
Botanical Gazette 1971 132 (1) : 70-79.
Cornell University, Ithaca, New York.
- 9.- Hom. Catley, Miklos Faust, Edward J. Ryder. "Horticu - ral Reviws".
Ed. Board Vol. 1 Westport, Connecticut 1979, pp 219-222.
- 10.- Yang, H. J. and W. J. Clore. "Improving the survival of aseptically-cultured asparagus plants in transplanting".
Hortscience 1974 Vol 9 (3) pp 235-236 Washington State - University, Irrigated Agriculture Research and Extension - Center, Prosser, USA.
- 11.- Yang and W.J. Clore. "In vitro reproductiveness of aspara - gus stem segments with branch shoots at a node".
Hortscience 1975 10 (4) pp 411-412 Irrigated Agriculture Research and Extension Center, Prosser, Washington, USA.
- 12.- Yang, H. J.; Clore W.J. "The development of complete - plants lets from moderately vigorous shoots of stock - plants of asparagus in vitro".
Hortscience (1974) 9 (2) pp 138-140. Washington State U - niversity Irrigated Agriculture Research and Extension - Center, Prosser, USA.

- 13.- Yang H. J.; Clore, W.J. "Obtaining Virus-free plants of--
Asparagus officinalis L. by Culturing Shoot Tips and Apical Meristems".
Hortscience (1976) 11 (5) pp 474-475. Department of Hortc
culture, Irrigated Agriculture Research and Extension Cent
ter, Prosser, USA.
- 14.- Yang, H. J.; Clore W.J. "Rapid Vegetative Propagation of
Asparagus Trough Lateral Beed Culture".
Hortscience, (1973) 8 (2) : pp 141- 142. Irrigated Agric
culture, Research and Extension Center, Prosser, Washingt
on USA.
- 15.- Takatōri, F. H. ; Stillman J.; Souther, F.; "Green Asparag
us"
California Agriculture (1974) 101 (2) 5 University of Cal
ifornia, Riverside, USA.
- 16.- Takatori, F. H.; Stillman, J.; Souther, F.; "Influence of
high density planting on yield and quality of green asparag
us".
California Agriculture (1975) 29 (6) 10-11 University
of California, Riverside, USA.
- 17.- Yang, H. J. ; "Tissue culture technique developed for aspa
ragus propagation".
Hortscience (1977) 12 (2) : 16-17 Washington State Un
iversity, Prosser, USA.
- 18.- Hall, R.H.; "Citokinins as a probe of developmental proce
sses".
Ann. Rev. Plant Physiology (1973) 24 ,415-44.