



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

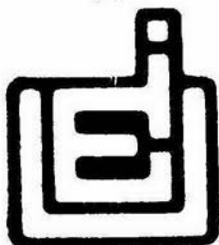
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

BO 1261/96
Ej. 3

Efecto de bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Prosopis laevigata* H. & B. (FABACEAE) a partir de explantes nodales.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JUAN OROZCO VILLAFUERTE



LOS REYES IZTACALA, EDO. MEX.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Este trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de Fitoquímica, del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Bajo la dirección del Dr. Francisco Cruz Sosa.

Agradezco públicamente al CONACyT el financiamiento parcial de este trabajo, bajo el convenio No. 2115- 30452. Dicho trabajo formo parte del proyecto de investigación "Propiedades Funcionales, Obtención, Aplicación y Disponibilidad de la Goma de Mezquite y Micropropagación de Especies Seleccionadas". El cual tuvo como responsable al Dr. Jaime Vernon Carter.

A Dios.

Gracias por todo.

A mis padres.

Por su cariño y confianza.
Gracias por dejarme ser.

A mis hermanos.

Gracias por apoyarme y creer en mí todo este tiempo.

A todos mis sobrinos.

Por favor. No sean como su tío.

A Teresa

Por permitirme formar parte de su vida.
Te mereces un reconocimiento por aguantarme tanto tiempo.

A todos mis colegas y amigos biólogos.

Gracias por su amistad. Ojalá que esos momentos de sano esparcimiento se repitan con más regularidad.

Al Dr. Francisco Cruz Sosa.

Por darme la oportunidad de colaborar con el.

Gracias por considerarme un integrante de su grupo de investigación.

A todos los miembros del laboratorio de Fitoquímica, en especial a JA, JC, JCH, JF, JM, y JS.

Al Dr. Ernesto Aguirre Leon y al M. en C. José Angel Lechuga Corchado.

Gracias por sus atinadas y oportunas observaciones.

Al Dr. Jaime Vernon Carter.

Gracias por brindarme su confianza y amistad.

A la Dra. Emma Moran Luques.

Gran parte de esta tesis es reflejo de sus enseñanzas. Gracias.

Quiero agradecer de manera especial a los profesores que integraron la Comisión Dictaminadora del presente trabajo de tesis:

Dr. Ernesto Aguirre Leon.

Biol. Juan Gerardo Ortiz Montiel.

Biol. Antonia Trujillo Hernandez.

Dr. Francisco Cruz Sosa.

M. en C. Eduardo Barrera Escorcía.

INDICE

	Paginas
Resumen	1
Abreviaturas utilizadas	2
Introducción	3
Justificación	9
Antecedentes	12
Objetivos	28
Hipótesis	29
Plan de trabajo	30
Materiales y Métodos	31
Resultados y Discusión	37
Conclusiones	46
Literatura Citada	47
Apéndice A	51
Apéndice B	52

RESUMEN

El aprovechamiento integral de nuestros recursos naturales no siempre es el más adecuado, a veces por intereses económicos que están por encima de la conservación del medioambiente o bien por el desconocimiento de sus formas de explotación. Este es el caso de los árboles de mezquite, de los cuales se pueden obtener beneficios prácticamente de todas sus partes (tronco, semillas, flores, exudado (goma), etc.), así como satisfactores de otro tipo como la nitrificación de suelos pobres y la conservación del suelo debido a sus raíces tan profundas. El empleo de técnicas alternativas de cultivo, como la micropropagación, permite obtener clones de un determinado fenotipo, mejorar genéticamente a una especie de interés, además de que teóricamente a partir de una sola planta se pueden generar un número "n" de las mismas. El objetivo de este trabajo fue el evaluar los efectos de la combinación de 3 reguladores de crecimiento vegetal (BAP, ANA y AIB) sobre el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Prosopis laevigata*, tomando como explantes segmentos nodales. Se utilizó medio MS suplementado con 3.0 % de sacarosa, 1.6 g/L de glutamina, 50.0 mg/L de ácido ascórbico, 100.0 mg/L de ácido cítrico y diferentes concentraciones (1.0, 5.0 y 10.0 mg/L) de BAP, ANA y AIB, probándose en total 18 tratamientos diferentes. Esto pretende establecer las bases para una eventual micropropagación de la especie. Los resultados más favorables (4 brotes promedio por segmento nodal) fueron registrados por el medio de cultivo suplementado con 5.0 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de ANA. Así mismo, se plantea la hipótesis de que la BAP por si sola promueve la proliferación de los brotes. También se discuten las influencias de los diferentes recipientes de cultivo utilizados.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Acido 3-indolacético
AIB	Acido 3-indolbutírico
ANA	Acido α -naftalenacético
BAP	N 6-bencilaminopurina
C	N 6-furfuril aminopurina o cinetina
MS	Murashige y Skoog

INTRODUCCION

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también un organismo en su totalidad es única en plantas, no puede encontrarse un fenómeno similar en animales superiores. Podemos definir el cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con las cuales podemos ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (Abdelnour y Vincent, 1994). El cultivo de tejidos vegetales se utiliza a menudo como un sistema "modelo" para el estudio de aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales de las plantas. Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales son también un conjunto de tecnologías que ofrecen amplias perspectivas a los países en desarrollo, gracias a su gran potencial como un medio de propagación de cultivos económicamente importantes o de cultivos con un potencial a futuro sobre bases o fines económicos. Lo anterior deriva, de las diversas ventajas que ofrecen tales técnicas, entre las cuales destacan el gran número de plántulas que pueden ser obtenidas a partir de un solo explante, la obtención de plantas resistentes a enfermedades, plagas, herbicidas, y a diferentes condiciones de

estrés ambiental. De la misma manera el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* permiten incrementar la productividad vegetal, además de poder trabajar en la micropropagación durante cualquier época del año, independientemente de las condiciones ambientales, ya que la única condición es contar con un adecuado número de plantas madre (Evans y Flick, 1981; Gautheret, 1985; Robert y Loyola, 1985; Ochoa, 1985; Torres, 1989).

El éxito del cultivo de tejidos vegetales esta fuertemente influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados, y por otros factores ambientales. En general, los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes: 1) sales inorgánicas (macro y micronutrientes), 2) vitaminas, 3) reguladores de crecimiento vegetal, 4) aminoácidos, 5) carbohidratos, 6) agua, 7) agentes solidificantes y 8) suplementos no definidos (López, 1985).

De acuerdo al material vegetal utilizado, suele dividirse la técnica de cultivo de tejidos en cinco clases: 1) cultivo de callos, 2) cultivo de células en suspensión, 3) cultivo de órganos, 4) cultivo de meristemos y morfogénesis para el propósito de propagación y 5) cultivo de protoplastos (Moya, 1992).

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* deben seguirse tres principios básicos: 1) la parte vegetal o explante debe ser aislada del resto del cuerpo de la planta, 2) el explante debe ser colocado en un ambiente apropiado a través

de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuados y 3) debe mantenerse en condiciones de asepsia (Moya, 1992).

Cuando las células, tejidos u órganos se cultivan en condiciones adecuadas es posible lograr la rediferenciación celular y generar estructuras y órganos *de novo*. Tal proceso, llamado morfogénesis, puede conducir a la generación de plantas completas. Es posible que al cultivar el material vegetal en medios sintéticos no se produzcan estructuras o tejidos con una clara diferenciación, u organización, cuando esto sucede se forman masas celulares amorfas llamadas callos (Santos y Ochoa, 1992).

Para poder obtener plántulas vía cultivo de tejidos, se pueden seguir dos grandes rutas: la organogénesis y la embriogénesis, la primera ha sido ampliamente explotada en una gran cantidad de especies, en tanto la segunda, aún cuando en forma creciente se ha explorado, no cuenta todavía con un número de especies elevado comparada con la organogénesis (Ammirato, 1985; Zimmerman y Barnhill, 1991).

La micropropagación es la técnica que ha logrado una rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en ornamentales y aún en leñosas. Esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se puede citar:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo: cuando se usan métodos de propagación convencionales, un esqueje produce una planta y una semilla produce una planta; sin embargo, un explante teóricamente puede producir un número infinito de plantas.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable.
- Mayor control sanitario del material que se propaga.
- Facilidad de transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos.

Debido a que la micropropagación se refiere a un fenómeno de reproducción asexual, el riesgo de tener "variantes" fenotípicas o genéticas es bajo. Sin embargo, eso puede suceder cuando no se domina el proceso *in vitro*. Las plantas que vienen de un mismo meristemo, ápice, o estaca son llamadas "clones", es decir, son copias genéticamente idénticas entre ellas e idénticas a la planta madre (Abdelnour y Vincent, 1994).

manipulación de las condiciones fisiológicas del explante, el medio de cultivo y las condiciones ambientales. ¿Por qué solo con ciertas manipulaciones o condiciones se puede lograr la regeneración de las plantas? Para contestar esta pregunta, es necesario entender cuales eventos bioquímicos están asociados o se requieren para que ocurra la regeneración de plantas *in vitro* (Cadmó y Villalobos, 1985).

JUSTIFICACION

El empleo de las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la propagación masiva de diferentes especies con interés comercial, biotecnológico y ecológico cada día va tomando más fuerza, debido a las ventajas que ofrecen estas metodologías con respecto a las convencionales. Dentro de este contexto, estas técnicas ofrecen una alternativa real de micropropagación para una planta como *P. laevigata*, por las siguientes razones:

- Todas las partes constituyentes de los árboles de mezquite prácticamente tienen un uso generalizado (madera, flores, semillas, raíces, etc.), lo que los convierte en un recurso natural muy importante (combustible, medicinal, alimenticio, artesanal, agropecuario, etc.).
- Los árboles de mezquite producen una resina o exudado semejante a la goma arábica, de ahí que sea susceptible su utilización en la industria alimenticia como un sustituto más económico.
- El mezquite forma parte del equilibrio ecológico de los desiertos mexicanos, ya que cuenta con un sistema de raíces profundas, que participan en la conservación del suelo y del agua. Además, por ser una leguminosa contribuye a nitrogenar el suelo. Sin embargo, continuamente se efectúan talas indiscriminadas, por lo que es necesario implementar un plan de

reforestación, siendo el cultivo de tejidos vegetales una alternativa a considerar.

- El cultivo de tejidos vegetales ha sido empleado con éxito en las investigaciones de fisiología vegetal (Street, 1977), bioquímica, genética y en las investigaciones sobre los procesos de diferenciación celular y tisular (Sánchez, 1985). Lo anterior se debe a que el cultivo de tejidos vegetales hace posible disponer de sistemas experimentales reproducibles y cuantificables, lo que simplifica la experimentación en biología vegetal.
- Durante los últimos años el germoplasma vegetal, al igual que otros recursos naturales, se está perdiendo en forma alarmante, en muchos casos antes de percatarnos de su existencia, su potencial y su valor real. La destrucción de los hábitat, la selección natural, los agentes bióticos y paradójicamente, el abandono de las variedades tradicionales en favor de las nuevas variedades mejoradas, han sido los factores involucrados en esta erosión genética. Recordemos que el germoplasma vegetal es un recurso irrenovable y que es vital para la seguridad alimentaria de la humanidad y por ende para un desarrollo sustentable. Debido a esta erosión genética acelerada de las especies vegetales se ha despertado gran interés por desarrollar métodos eficientes para conservar el germoplasma, esto es, preservar con la mayor integridad posible toda la variabilidad disponible en una especie dada. Idealmente la diversidad vegetal debería conservarse *in situ* coexistiendo con otros organismos vivos en su ambiente natural. Sin embargo, diferentes experiencias señalan que a fin de garantizar la existencia del recurso, se

requiere de otros métodos de preservación. Como resultado, se han desarrollado sistemas de conservación *ex situ*. Estos métodos dependerán del tipo de propagación de la especie en particular y/o el tipo de semilla que presentan. Siendo estos: 1) los bancos de semilla; 2) las colecciones de campo y 3) la conservación *in vitro*, a mediano plazo y a largo plazo o crioconservación (Abdelnour y Vincent, 1994).

ANTECEDENTES

Prosopis laevigata

Prosopis laevigata (H. & B.) Johnston. Es un árbol, a veces hasta de 12 m de altura, aunque generalmente menor; tronco hasta de 1 m de diámetro, por lo general de 30 a 60 cm; corteza gruesa, de color café-negruzco, algo fisurada; copa más ancha que alta; ramas glabras o pilosas, armadas de espinas estipulares de 1 a 4 cm de largo; hojas pecioladas con 1 a 3 pares de pinnas, cada una con 10 a 20 pares de folíolos sésiles, oblongos o linear-oblongos, de 5 a 15 mm de largo por 1 a 2 mm de ancho, ápice obtuso, margen entero, base obtusa, glabros o ligeramente pubescentes; flores dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo; flores blanco-amarillentas; sésiles o casi sésiles; cáliz de 1 mm, glabro o puberulento; corola de 2.5 a 3 mm de largo, pétalos agudos, tumentulosos en el margen y en el interior; estambres de 4 a 5 mm de largo; legumbre linear, algo falcada, de 7 a 20 cm de largo por 8 a 15 mm de ancho, comprimida, glabra, de color café-amarillento, a veces rojizo, algo constreñida entre las semillas; éstas oblongas, comprimidas de 8 a 10 mm de largo, de color blanco-amarillento. A *P. laevigata* se le conoce con el nombre común de "mezquite". Se encuentran en el fondo del Valle de México y en las laderas bajas, entre 2250 y 2400 m de altitud en sitios con pastizal y matorral. Fuera del Valle de México se conoce de Durango, San Luis Potosí y Tamaulipas a Oaxaca. Esta planta fue conocida como *P. juliflora* (Swartz) D.C., nombre que, según Johnston debe ser asignado a la especie que se distribuye a lo largo de

la costa del Pacífico desde Sinaloa a Centroamérica, Colombia y Venezuela, así como en las Antillas (Rzedowski, 1979).

- De acuerdo al sistema de clasificación de Cronquist, *Prosopis laevigata* tiene el siguiente lugar dentro de la sistemática vegetal:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledoneas)
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Genero	<i>Prosopis</i>

Jones y Luchsinger, 1986.

El mezquite como recurso natural

El mezquite es una planta originaria de México y elemento característico de las zonas áridas de Norte América, aunque su distribución se ha extendido hasta algunas regiones áridas y semiáridas de Centro y Sud-América. En México es abundante en los Estados del norte y centro, así como en las planicies costeras en donde se establece en condiciones áridas y semiáridas. En muchos lugares de nuestro país esta planta ha sido considerada como maleza indeseable y es combatida en algunas regiones, debido a que se le atribuye una gran agresividad y competencia con especies forrajeras. El mezquite es una planta que desde la antigüedad constituyó una fuente de obtención de diversos

productos para los pobladores de las zonas áridas de Norte América. En la actualidad se siguen obteniendo algunos beneficios pero en escala reducida. La madera se puede utilizar para fabricar postes, durmientes, mangos de herramientas, muebles, pisos de parquet, arados, carreteras y en algunos lugares como en Texas, para el adoquinado de las calles. Es excelente combustible y fuente de carbón vegetal. En el Estado de Guanajuato se utiliza para la fabricación de hormas para calzado. La corteza ha sido utilizada para curtiduría regional. La corteza de la raíz se ha utilizado en cocción para curar heridas, como vomitivo y purgante; cuando es fermentada se obtiene una bebida sustituto del pulque. También se ha usado en cocimientos para curación de disentería o para algunas afecciones de los ojos. El jugo de las hojas, se dice curativo para algunas enfermedades oculares y de su cocción se obtiene bálsamo de mezquite, para este tipo de afecciones (Anónimo, 1976; Rzedowski, 1988).

El mezquite exuda de su tronco una resina amarillina semejante a la goma arábiga empleada para obtener mucílago y para la fabricación de dulces. Los análisis químicos realizados a la goma establecen que es una sal neutra de un polisacárido ácido altamente ramificado y constituido por residuos de L-arabinosa, D-galactosa, ácido 4-O-metil-D-glucourónico y L-ramnosa en una relación molar 2:4:1:1 (Aspinall y Whitehead, 1970).

Las flores del mezquite , son frecuentadas por gran cantidad de avispas y abejas que producen miel de gran calidad. Se sabe que algunos indígenas de Norte América las consumían como alimento y en cocción, como vomitivo y purgante. La semilla constituye un alimento importante para la fauna local como la codorniz, el guajolote, ardillas, etc., y de su cocimiento se obtiene una melaza, debido al importante contenido de azúcares. El fruto tuvo un importante papel en la alimentación de algunos pueblos indígenas; los chichimecas hacían harina de los frutos secos con la que preparaban tortas o pasteles, conocidos ahora como "mezquitamales"; también hacían el "mezquiatole" (Anónimo, 1976; Figueiredo, 1990). Figura 1.

Cultivo de tejidos vegetales en plantas del género *Prosopis*

A pesar de la importancia del mezquite, se ha incrementado la tala indiscriminada de los bosques para su utilización como carbón o para el uso agrícola del suelo, por lo que es necesario desarrollar un plan de reforestación basado en métodos tradicionales de cultivo y en el desarrollo de biotecnologías para la propagación de individuos sobreproductores de goma o de rápido crecimiento. Diversas técnicas de micropropagación se han empleado con éxito en plantas leñosas (micropropagación por explantes nodales, cultivo de callos embriogénicos, etc.), obteniendo la propagación masiva de plantas en condiciones controladas, libres de patógenos y con las características genéticas deseadas (Woods, 1985; García y Galindo, 1986).

Existen actualmente en la literatura trabajos sobre micropropagación de especies del género *Prosopis*, siendo la técnica más socorrida la del cultivo de segmentos nodales, en medio MS como medio de establecimiento y multiplicación; así como la utilización de AIB para la inducción de raíces adventicias.

Yashpal y Arya (1984), propagaron *P. cineraria* mediante el cultivo de yemas. En este trabajo se utilizó un espectro muy amplio de reguladores de cultivo vegetal, destacando la implementación de ANA, AIA y AIB, en ausencia de citocininas (tabla 1).

Tabone, *et al* (1986), tomando como explantes yemas laterales, cultivaron *P. alba*, encontrando que una combinación de 0.67 mg/L de BAP y 0.29 mg/L de AIA favorece la proliferación y desarrollo de las yemas.

Arya y Shekhawat (1986), micropropagaron plantas de *P. cineraria*, obteniendo en sus experimentos que la combinación más favorable para el desarrollo de los explantes (yemas axilares y terminales) fue la que comprendía 0.05 mg/L de cinetina y 3.0 mg/L de AIA. También encuentran que al sustituir la cinetina por 2-4 mg/L de 2,4-D se producen raíces adventicias en los explantes y que al utilizar una concentración mayor de 4.0 mg/L de ANA en combinación con cualesquier concentración de 2,4-D se induce la formación de callo.

En 1989, Batchelor y sus colaboradores a partir de explantes nodales micropropagaron plantas de *P. cineraria*, *P. tamarugo*, *P. chilensis*, *P. alba* y *P. juliflora* (Tabla 2).

Balboa y Arce (1991) utilizando segmentos nodales como explantes y medio MS suplementado con 5.0 mg/L y 10.0 mg/L de cisteína, lograron micropropagar *P. chilensis*.

Implementando una técnica diferente al cultivo de segmentos nodales, Woods (1985) utilizó como explantes los hipocotilos, las raíces y los brotes terminales de plantulas de *P. alba*, todas provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Como resultado de sus experimentos señala que los hipocotilos en su totalidad formaron callo al igual que las raíces, por otra parte logró establecer el cultivo de brotes, sin embargo, al iniciar la fase de multiplicación, esta tuvo un resultado negativo (Woods, 1985. En Wickens, *et al.*, 1985)

Propagación *in vitro* de plantas leñosas

Para multiplicar plantas *in vitro* por formación de órganos o embriones adventicios, en principio es necesario que aquellos sean capaces de regeneración. La capacidad de regeneración esta determinada por el genotipo, las condiciones ambientales (suministro de nutrientes, reguladores y condiciones físicas), y el estado de desarrollo de la planta. Debido a que las plantas que se usan generalmente para la multiplicación vegetativa son adultas, se debería intentar antes de su uso, sobre todo en las especies leñosas, revertirlas al estado juvenil. Esta puede ser conseguida a veces por: cultivo de meristemas, la obtención de esquejes a partir de otros esquejes (este método también se usa *in vivo*), el injerto de un meristemo o ápice del vástago sobre un

patrón (plántula), el aislamiento a partir de zonas que son aún juveniles, una poda severa que estimule la producción de vástagos juveniles laterales. Si se encuentran problemas cuando se usa material vegetal adulto, para la reproducción vegetativa *in vitro*, se puede desarrollar un modelo utilizando plántulas (material juvenil), desarrolladas a partir de semillas.

La dormancia, especialmente en las plantas leñosas frecuentemente presenta problemas. Para romper la dormancia se precisa de una buena comprensión de los problemas asociados con la misma o con su ruptura. Las formas de romper este estado fisiológico de las plantas, después del aislamiento *in vitro*, son: los tratamientos con baja temperatura (0-5°C), día largo (16 horas luz por día), y baja temperatura seguida por días largos. En algunos casos las giberelinas y/o citocininas pueden estimular la ruptura de la dormancia de las yemas.

Una de las diferencias más notables, entre las especies herbáceas y leñosas es que estas últimas son mucho más difíciles de clonar *in vitro*. Las razones de que esto ocurra son: 1) Las especies leñosas tienen una capacidad regenerativa relativamente débil, si se comparan con las especies herbáceas. 2) La investigación con árboles y arbustos se inicio más tarde. 3) La inducción del rejuvenecimiento es por lo general extremadamente difícil en las plantas leñosas. 4) La velocidad de multiplicación es mucho más baja en las especies leñosas que en las herbáceas. 5) La dormancia juega un papel en el caso de árboles y arbustos, ya que las yemas pueden no abrirse y no tiene lugar el alargamiento de los tallos. 6) La topósis juega un papel más importante en las especies leñosas. 7) Las especies leñosas son más propensas a ser afectadas

por la excreción de sustancias tóxicas en los medios nutritivos. 8) La esterilización es más difícil en las especies leñosas, que generalmente crecen en el exterior. 9) Los árboles y arbustos por lo general sólo pueden ser seleccionados para el clonado, cuando son adultos. Debido a que el material adulto es normalmente muy difícil, si no imposible de propagar *in vitro*, los problemas que surgen son muchas veces insuperables. 10) La variación genética en los árboles suele ser más grande que en los cultivos agrícolas, dando lugar a resultados variables. 11) Habitualmente no se dispone de material de invernadero en el caso de las especies leñosas, teniéndose que tomar los explantes de árboles desarrollados en el campo. También existe una variación considerable en los explantes, debido a las diferentes condiciones de crecimiento y a las variaciones anuales del clima (Pierik, 1990).

Cultivo *in vitro* de plantas leguminosas

Al tratar de usar las diferentes técnicas del cultivo *in vitro* en miembros de la familia Leguminosae, se han encontrado serias dificultades. Se ha reportado que las leguminosas perennes, usualmente usadas como plantas forrajeras, se desarrollan mejor *in vitro*, que las leguminosas cuyas semillas se emplean como alimento humano. Las investigaciones recientes se han orientado hacia el cultivo de células y protoplastos, donde no únicamente se explota el potencial para producir un número extenso de plantas en un lapso de tiempo relativamente corto, si no también proveen de una oportunidad de manipular

genéticamente a las plantas para mejorarlas con fines económicos. La producción de plantas *in vitro* ha sido reportada en un número limitado de especies de leguminosas y por tal motivo en la Royal Botanic Garden, Kew, de donde se encuentran en desarrollo varios proyectos de investigación referidos a la regeneración *in vitro* de plantas leguminosas (Woods, 1985. En Wickens, *et al.*, 1985).

Cultivo de segmentos nodales

Con este nombre se conoce al aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más socorrido de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro*. Cuando se obtienen un número suficientemente grande de vástagos, éstos son enraizados, realizándose finalmente la transferencia al suelo (Pierik, 1990).

Reguladores del crecimiento vegetal

Se conoce como reguladores del crecimiento vegetal a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes que en pequeñas cantidades estimulan,

inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico asociado al crecimiento en las plantas (Barba, 1987). El crecimiento de las plantas es un proceso dinámico, complejo y rigurosamente controlado, en el cual los reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel preponderante tanto en el organismo completo como en los niveles de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973). La mayor parte de las actividades fisiológicas de las plantas a todos los niveles se desarrollan por influencia de los reguladores de crecimiento vegetal, estas sustancias son activas a concentraciones muy bajas y ejercen sus efectos tanto en el lugar de síntesis como en otras partes de la planta, presentan un espectro de acción muy amplio y diverso. Se conocen promotores del crecimiento como: las auxinas, las giberelinas y las citocininas; inhibidores como el ácido abscísico; y el etileno, al cual se le han asignado tanto actividades promotoras como inhibidoras (Bidwell, 1979). El dominio de las técnicas del cultivo *in vitro* radica, en los equilibrios entre los reguladores de crecimiento vegetal y, entre ellos, los dos más importantes que juegan un papel fundamental en la organogénesis, son las auxinas y las citocininas. En forma esquemática se puede admitir, que el comportamiento fisiológico de un explante en cultivo sea el siguiente:

- si la proporción auxina/citocinina es alta, habrá un funcionamiento de tipo rizógeno;
- si la relación auxina/citocinina es débil, el explante evolucionará hacia un funcionamiento caulógeno;
- si la relación es equilibrada, se tendrá un comportamiento calógeno (Vidalie, 1986).

Estudios bioquímicos empleando cultivo de tejidos vegetales

Las aportaciones del cultivo de tejidos vegetales en estudios bioquímicos para elucidar las incógnitas de las ciencias vegetales, son extremadamente numerosas (Tabla 3), (Cadmó y Villalobos, 1985). De ahí que el cultivo de tejidos vegetales se utilice a menudo como un sistema "modelo" para el estudio de aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales de las plantas. Por todo lo anterior, el presente trabajo tiene como uno de sus objetivos el de contribuir al conocimiento del comportamiento *in vitro* de las especies arbóreas, como *P. laevigata*.

Efecto de los diferentes recipientes de cultivo en la micropropagación

Las plantas crecen en condiciones naturales que les permiten disipar los productos secundarios provenientes del suelo hacia la atmósfera. El sistema de cultivo de tejidos carece de esta peculiaridad, por lo que el uso de recipientes de cultivo con sus diferentes tipos de tapas, además de prevenir la contaminación por microorganismos, retardar la desecación, interrumpen el flujo de estos productos secundarios hacia fuera del cultivo. Estos productos son consecuencia del desarrollo y crecimiento de la planta que se cultiva. Esta interrupción puede tener una gran variedad de consecuencias, tanto dañinas como benéficas, esto último va a depender de la especie con la que se trabaje, el tipo de cultivo, la composición del medio de cultivo usado y el tipo de

recipiente de cultivo a utilizar (tamaño, forma, área, material de que este fabricado, tipo de tapa y sello).

Todos los factores mencionados con anterioridad se verán reflejados en el desarrollo y crecimiento de los cultivos. Por ejemplo: la acumulación de etileno inhibe la formación de la tuberización en cultivos de papa; el etanol inhibe la embriogénesis somática en cítricos; la reducción de las condiciones de aeración modifican la diferenciación y crecimiento de segmentos de hipocótilos de soya durante la inducción de callos; el uso de parafilm para sellar los recipientes de cultivo provoca necrosis en cultivos de papa; al emplear recipientes de cultivo largos y de un área alta promueve el número y tamaño de brotes de *Vitis vinifera*; etc...(Kavanagh, *et al.*, 1991. En Bajaj, 1991).

Tabla 1. Efecto de diferentes auxinas (ANA, AIA y AIB) en cultivos de yemas de *P. cineraria*, cultivadas en medio MS suplementado con 0.05 mg/L de cinetina.

Auxina	Concentración mg/L	Peso		
		promedio de callos (g /6 replicas)	Brotes (B) o Número	Raíces (R) Longitud (mm)
ANA	0, 0.01, 0.1	---	---	---
	1.0	---	---	---
	2.0	0.40	R3	10
	3.0	0.42	R2	5
	4.0	0.32	B1	50
	5.0	0.30	B1	52
	6.0	0.26	B1	17
AIA	0, 0.01, 0.1	---	---	---
	1.0	0.35	B1	40
	2.0	0.26	B1	50
	3.0	0.05	B3	58
	4.0	0.14	B1	61
	5.0	0.24	B1	83
	6.0	0.25	B1	125
AIB	0, 0.01, 0.1	---	---	---
	1.0	0.46	R6	15
	2.0	0.35	R6	25
	3.0	0.25	R8	30
	4.0	0.23	R10	55
	5.0	0.23	R15	72
	6.0	0.20	R16	83

Tomado de Yashpal y Arya, 1984.

Tabla 2. Sumario de las diferentes combinaciones de hormonas para la iniciación de raíces, proliferación y crecimiento de brotes de *P. chilensis*, *P. cineraria* y *P. juliflora*.

	C (mg/L)						BA (mg/L)					
	0.05	1	3	5	10	15	0.05	1	3	5	10	15
<i>P. chilensis</i>												
AIB	1	---	---	---			---	---	M			
(mg/L)	3	RS	---	---			RS	---	---			
	15	---	R	---			---	S	---			
ANA	1	---	---	---	---	---	---	S	---	---	M	M
(mg/L)	3	---	---	---			---		S			
	5				S	---				M	M	M
	10				S	---				M	M	---
	15	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---
AIA	1									---	---	M
(mg/L)	5									---	M	---
	15								S	---		M
<i>P. cineraria</i>												
AIB	1	R	R	---								
(mg/L)	3	R	---	---				S	---			
	15	R	R				---	---	---			
ANA	1		---	---	---	---	---	---	---	S	---	---
(mg/L)	3		---	S				---	---			
	5				---	---					M	---
	10				---	---					---	---
	15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AIA	1										---	---
(mg/L)	5										---	---
	15										---	M
<i>P. juliflora</i>												
AIB	1	R	---	---				---	---			
(mg/L)	3	R	---	---			---	---	---			
	15	RS	---	---			---	---	---			
ANA	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
(mg/L)	3	---	---	---			---	---	---			
	5				---	---				---	---	---
	10				---	---				---	---	---
	15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AIA	1										---	---
(mg/L)	5										---	---
	15										---	---

R = >50% de explantes enraizados; M = Promedio > 1.5 brotes por explante nodal; Promedio > 2 nudos por brote regenerado; - = Combinaciones probadas cuyos valores son menores a los registrados por los parámetros antes mencionados.

Tomado de Batchelor, *et al.*, 1989.

Tabla 3. Ejemplos de estudios bioquímicos usando cultivo de tejidos vegetales.

Estudio bioquímico	Ejemplo de cultivos empleados	Referencias (Citadas en: Cadmo y Villalobos, 1985).
A. Eventos bioquímicos asociados con la regeneración de plantas o micropropagación <i>in vitro</i> .		
1. Organogénesis <i>de novo</i> .	Callos de tabaco	Leung y Thorpe (1985)
2. Embriogénesis somática	Callos de <i>Papaver orientalis</i>	Hara <i>et al.</i> (1985)
B. Metabolismo primario en relación a:		
1. Crecimiento en cultivo de células vegetales	Callos de tabaco	Obata-Sasamoto <i>et al.</i> (1984)
2. Estudio y producción de mutantes deficientes de metabolitos	Protoplastos de mesófilo de petunia	Steffen y Schieder (1984)
C. Metabolismo secundario		
1. Regulación	Cultivo en suspensión de <i>Mucuna puriens</i>	Winchers <i>et al.</i> (1985)
2. Biotransformación de productos útiles por cultivo de tejidos	Callos de crisantemo y folíolos de cineraria	Kuch <i>et al.</i> (1985)
D. Metabolismo de reguladores de crecimiento	Células en suspensión de pera	Balanque y Pech (1985)
E. Enzimología		
1. Mecanismo molecular de inducción de enzimas y represión en células vegetales	Células en suspensión de perejil	Kuhn <i>et al.</i> (1984)
2. Localización subcelular en enzimas	Protoplastos de tomate	Waterneck <i>et al.</i> (1985)
F. Bioquímica de la pared celular	Suspensiones sincronizadas de <i>Catharanthus roseus</i>	Amino <i>et al.</i> (1985)
G. Retención y transporte de sustancias orgánicas e inorgánicas	Protoplastos aislados de cotiledones de soya	Lin (1985)
H. Ingeniería genética de plantas	Protoplastos de tabaco	Frioozabady y Galbraith (1984)
I. Estudio en líneas de células variantes: Mecanismos bioquímicos para resistencia a salinidad, toxinas, etc.	Células en suspensión de <i>Datura innoxia</i>	Jackson <i>et al.</i> (1984)

Tomado de Cadmo y Villalobos, 1985.

Falta página

N° 27

OBJETIVO GENERAL

Establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de explantes nodales de *P. laevigata* con fines de propagación.

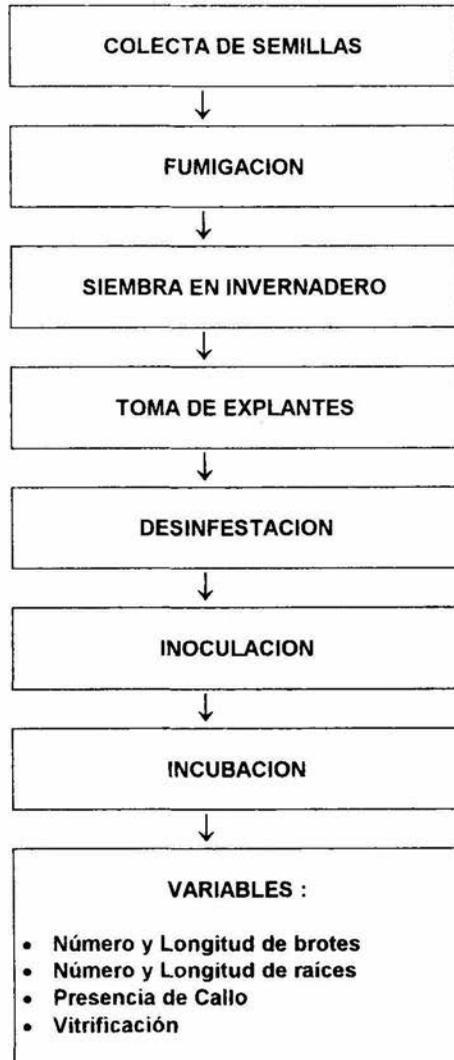
OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto organogénico de bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB), en explantes nodales de *P. laevigata*.
- Probar el potencial de explantes nodales para el establecimiento de cultivos *in vitro* de *P. laevigata*.
- Evaluar la influencia de dos diferentes recipientes de cultivo sobre los eventos organogénicos que pudieran sucitarse durante los estudios.
- Contribuir al conocimiento del comportamiento de especies arbóreas bajo condiciones *in vitro*.

HIPOTESIS

- Existirá una concentración óptima de bencilaminopurina, ácido naftalenacético y ácido indolbutírico que promueva satisfactoriamente la organogénesis en explantes nodales de *P. laevigata*.
- La utilización de dos diferentes recipientes de cultivo podría tener alguna consecuencia significativa con respecto al desarrollo de los procesos organogénicos que resulten de los diferentes tratamientos estudiados.

PLAN DE TRABAJO



MATERIALES Y METODOS

Zona de colecta

- La zona de colecta comprendió los Ejidos de San Bartolo y Llanos de la Angostura, ambos pertenecientes al municipio de Río Verde, San Luis Potosí. La ubicación geográfica de ambos ejidos es 100° 8' 4" altitud W, 22° 14' 10" latitud N y 100° 2' 53" altitud W, 22° 18' 30" latitud N respectivamente.
- Se realizaron cuatro colectas; en Octubre de 1994 y en Marzo, Mayo y Octubre de 1995.
- Se colectaron semillas (legumbres) procedentes de árboles cuyas ramas o troncos principales presentarán una cantidad considerable de goma.
- Simultáneamente a la colecta de semillas, se colectaron también algunos ejemplares de herbario para su posterior determinación taxonómica.

Determinación taxonómica de la especie

- Con la colaboración de la Biol. Ma. Edith López Villafranco (Herbario, UNAM Campus Iztacala), se determinó la identidad botánica del material colectado, siendo ésta *Prosopis laevigata* H. & B. (Rzedowski, 1979). Los ejemplares fueron depositados en abril de 1995 en el Herbario de la UNAM Campus Iztacala y tienen el número de registro 25081.

Establecimiento de plantas madre

- Se retiraron las semillas de sus legumbres para posteriormente ser fumigadas en una atmósfera de éter durante 24 h, con el fin de proteger a los embriones de larvas de insectos. Una vez fumigadas, se sembraron en

macetas de plástico (5 semillas por maceta) con una mezcla de tierra negra y de hoja (1:1). Las macetas se colocaron en un invernadero donde se regaron 2 veces por semana de manera capilar.

- Después de tres meses de germinadas las semillas, se podó cada una de las plantas, con el fin de eliminar la dominancia apical y provocar una mayor ramificación. Las podas se realizaron durante dos meses más para generar el material suficiente que se utilizó en los experimentos de cultivo *in vitro*.

Establecimiento de cultivos *in vitro*

1.- Selección y desinfestación de explantes.

Se utilizaron explantes nodales (figura 1), provenientes del tallo de plantas de mezquite, cultivadas en invernadero con una edad promedio de 6 meses. Los explantes contaron con dos nudos cada uno, se lavaron con detergente y agua corriente, posteriormente se sumergieron en una solución de etanol al 70% por 1 min. Una vez drenado el etanol, los explantes se volvieron a desinfestar en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 100%, durante 10 min. Después se procedió a enjuagar los explantes con agua destilada esterilizada por 5 ocasiones.

2.- Medios de cultivo, inoculación e incubación.

- Terminada la desinfestación, se cortaron los extremos de los explantes para eliminar el tejido dañado por la solución de hipoclorito de sodio. Posteriormente se colocaron en una solución antioxidante durante 15 min.

Esta solución estuvo compuesta de 50 mg/L de ácido ascórbico + 100 mg/L de ácido cítrico (Batchelor *et al.*, 1989).

- Posteriormente los explantes se inocularon en medio de cultivo MS (Sigma-5519, apéndice 1) suplementado con sacarosa (3.0 %), glutamina (1.6 g/L), ácido ascórbico (50 mg/L), ácido cítrico (100 mg/L), agar (0.8 %) y diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB), probándose en total 18 tratamientos diferentes (Batchelor *et al.*, 1989). El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.7-5.8, esterilizándose a 121°C durante 15 min.
- Se utilizaron 2 diferentes recipientes de cultivo, frascos tipo gerber y tubos de cultivo (25 x 150 mm), ambos con tapas de plástico (Sigma), colocando un explante por recipiente. La incubación se llevó a cabo a 25° C ± 3° C, la iluminación fue por lámparas fluorescentes, bajo un fotoperiodo de 16 h y una radiación de 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, equivalentes aproximadamente a 2000 lux de intensidad luminosa (Arditti y Ernst, 1993).

Tratamientos

- Se probó una citocinina (bencilaminopurina, BAP) en tres diferentes concentraciones, en combinación con dos auxinas (ácido naftalenacético, ANA y ácido indolbutírico, AIB), también en tres diferentes concentraciones respectivamente (tablas 4 y 5); en total se trabajaron 18 tratamientos, más

dos lotes testigo carentes de reguladores de crecimiento (Batchelor, *et al.*, 1989).

- Los diferentes tratamientos constaron de 20 unidades experimentales (se consideró una unidad experimental a cada uno de los explantes).

Variables

- A los 35 días de incubación se procedió a medir las siguientes variables, siendo estas tanto cualitativas como cuantitativas:

- 1.- Número de brotes
- 2.- Longitud de los brotes
- 3.- Número de raíces.
- 4.- Presencia de callo
- 5.- Vitrificación

Tabla 4. Combinaciones de BAP y ANA.

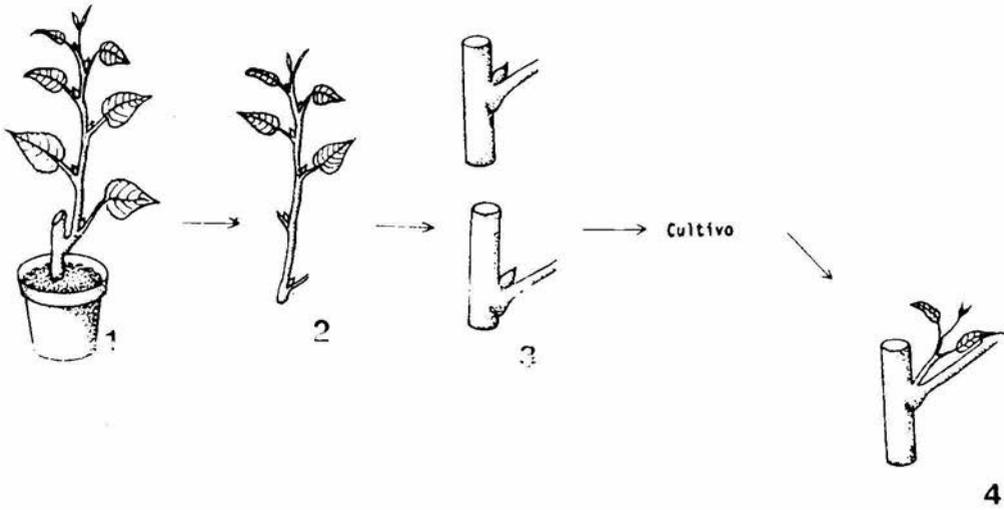
BAP (mg/L)	ANA (mg/L)		
	1.0	5.0	10.0
1.0	A	B	C
5.0	E	D	F
10.0	G	H	I

* Lote Testigo (BAP 0.0 mg/L y ANA 0.0 mg/L).

Tabla 5. Combinaciones de BAP y AIB.

BAP (mg/L)	AIB (mg/L)		
	1.0	5.0	10.0
1.0	J	K	L
5.0	M	N	O
10.0	P	Q	R

*Lote Testigo (BAP 0.0 mg/L y AIB 0.0 mg/L).



Modificado de Pollard y Walker, 1990.

Figura 1. Preparación de explantes nodales.

RESULTADOS Y DISCUSION

Formación de callo

En todos los tratamientos probados hubo formación de callo, incluyendo los lotes testigo. El porcentaje de explantes con presencia de callo fue del 83 %, disminuyendo hasta un 67 % en los cultivos en frasco suplementados con 10.0 mg/L de BAP. Exceptuando estos tratamientos, se puede afirmar que el porcentaje de explantes con callo fue uniforme (tablas 6 y 7). Estos resultados son similares a los encontrados por Yashpal y Arya (1984), en donde al combinar cinetina con AIB, ANA y AIA, observan que la formación de callo es recurrente en cada una de las combinaciones probadas, esto se presenta al cultivar yemas de *P. cineraria*.

Tabla 6. Porcentaje de explantes nodales con formación de callo, después de 35 días de incubación (frascos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	60	100	80
5.0	90	100	60
10.0	100	100	45
AIB			
1.0	80	90	55
5.0	75	80	75
10.0	100	65	90

Las cifras presentadas son el resultado de 20 observaciones.

Tabla 7. Porcentaje de explantes con formación de callo, después de 35 días de incubación (tubos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	50	100	95
5.0	85	90	90
10.0	100	100	100
AIB			
1.0	95	95	80
5.0	85	90	50
10.0	90	85	90

Las cifras presentadas son el resultado de 20 observaciones.

Número de brotes

Con el fin de observar si el número de brotes promedio (tablas 8 y 9) registrado por cada una de las combinaciones de BAP, ANA y AIB fueron o no estadísticamente diferentes, se realizó un análisis de varianza de tres factores (apéndice 2), el cual indicó que dichos promedios eran significativamente diferentes, por lo que se sometieron a la prueba de Tuckey [$F(9,760)=3.63$; $p < .0002$]. Esto mostró que las combinaciones de 5.0 y 10.0 mg/L de BAP con 1.0 mg/L de ANA (siendo tubos los recipientes de cultivo), son estadísticamente diferentes a las 17 combinaciones restantes (incluyendo los resultados encontrados en tubos y frascos), teniendo cuatro y tres brotes en promedio por segmento nodal, respectivamente. Estas diferencias podrían resultar obvias si se considera que el promedio de brotes generados por la

gran mayoría de los tratamientos fue de uno por explante. La prueba de Tuckey también indicó que los dos tratamientos señalados anteriormente, no son diferentes entre sí, lo cual quiere decir que desde el punto de vista estadístico, ambos tratamientos resultan adecuados para el establecimiento de las dos primeras fases de la micropropagación para *P. laevigata*. Sin embargo, desde el punto de vista económico; los medios de cultivo suplementados con 10.0 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de ANA forman tres brotes en promedio por explante nodal; teóricamente estos tres brotes podrían generar un número "n" de plantas; al utilizar el mismo medio de cultivo suplementado con 5.0 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de ANA, se obtienen cuatro brotes en promedio. Este brote adicional podría representar un 25 % adicional de plantas generadas. Es por ello que para fines de micropropagación, resulta más atractivo trabajar con 5.0 y 1.0 mg/L de BAP y ANA respectivamente.

Las citocininas tienen un papel claro en la organogénesis, en la que brindan una estimulación considerable en la formación y emergencia de yemas; en contraste, son antagónicas en la rizogénesis; además de tener un efecto antagónico de la dominancia apical. Por lo tanto resulta obvio que la presencia de AIB no haya favorecido la emergencia de brotes (tablas 8 y 9). Yashpal y Arya (1984), reportaron la misma tendencia en *P. cineraria*. De la misma manera se muestra que una concentración por arriba de 1.0 mg/L de ANA, y por abajo de 5.0 mg/L de BAP forman un promedio menor a 2 brotes por explante. Esto indica, que probablemente la citocinina utilizada (BAP) sea la variable que promueva la emergencia de los brotes, y no la interacción de ésta con el ANA. En este trabajo no se realizaron experimentos con otras citocininas, por lo que se deben realizar investigaciones posteriores utilizando diferentes citocininas con el fin de confirmar o rechazar la aseveración

anterior. Sin embargo, dichos resultados coinciden con los publicados por Tabone et al. (1986), en los que señalan que posiblemente la clave para la estimulación de brotes en *P. alba* sea la presencia de 10.0 mg/L de BAP en el medio de cultivo.

Tabla 8. Número de brotes obtenidos, después de 35 días de incubación (frascos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	0.6 ± 1.14	0.65 ± 0.93	1.05 ± 1.27
5.0	0.2 ± 0.69	0.45 ± 1.19	0.7 ± 1.17
10.0	0.6 ± 1.18	0.75 ± 1.25	0.55 ± 1.31
AIB			
1.0	0.15 ± 0.36	0.25 ± 0.63	0.05 ± 0.22
5.0	0.15 ± 0.48	0.85 ± 1.34	0.0 ± 0.0
10.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Las cifras presentadas son el promedio de 20 observaciones.

Tabla 9. Número de brotes obtenidos, después de 35 días de incubación (tubos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	0.4 ± 0.68	4.05 ± 2.45	2.9 ± 2.1
5.0	0.75 ± 1.44	1.35 ± 2.2	0.9 ± 1.16
10.0	1.05 ± 2.06	.95 ± 1.50	0.85 ± 1.38
AIB			
1.0	0.2 ± 0.52	0.55 ± 0.94	0.65 ± 1.13
5.0	0.1 ± 0.30	1.25 ± 2.14	0.0 ± 0.0
10.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.55 ± 1.60

Las cifras presentadas son el promedio de 20 observaciones

Altura de brotes

En las tablas 10 y 11 se puede apreciar que la altura alcanzada por los brotes es muy heterogénea. Esta variabilidad en los registros se presenta en todos los tratamientos, tanto en frascos como en tubos, incluyendo los lotes testigo. Debido a la gran disparidad existente entre los datos, no es posible establecer alguna relación entre la altura de los brotes, las combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal utilizados y los diferentes recipientes de cultivo empleados.

Tabla 10. Altura de brotes obtenidos (cm), después de 35 días de incubación (frascos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	0.23 ± 0.11	0.35 ± 0.18	0.50 ± 0.02
5.0	0.6 ± 0.29	0.52 ± 0.41	0.27 ± 0.17
10.0	0.60 ± 0.31	0.45 ± 0.28	0.22 ± 0.42
AIB			
1.0	0.16 ± 0.57	0.16 ± 0.5	0.1 ± 0.1
5.0	0.16 ± 0.57	0.37 ± 0.24	0.0 ± 0.0
10.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Las cifras presentadas son el promedio de 20 observaciones.

Tabla 11. Altura de brotes obtenidos (cm), después de 35 días de incubación (tubos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	0.37 ± 0.1	0.76 ± 0.76	0.74 ± 0.41
5.0	0.57 ± 0.29	0.76 ± 0.74	0.28 ± 0.12
10.0	0.81 ± 0.37	0.4 ± 0.35	0.27 ± 0.16
AiB			
1.0	0.32 ± 0.45	0.41 ± 0.34	0.13 ± 0.63
5.0	0.15 ± 0.7	0.68 ± 0.4	0.0 ± 0.0
10.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.56 ± 2.3

Las cifras presentadas son el promedio de 20 observaciones.

Número de raíces

De manera general, según Skoog (Vidalie, 1986), la respuesta fisiológica de un explante cultivado *in vitro* puede ser la siguiente: si la proporción auxina/citocinina es alta, habrá un comportamiento rizógeno; si es débil, el explante tenderá a formar brotes adventicios y si es equilibrada, se tendrá probablemente formación de callo. De acuerdo a esto último, se esperaba que alguno de los tratamientos probados (específicamente los que contenían AiB) promoviera la formación de raíces adventicias. Sin embargo, ninguna de las combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal utilizadas en este trabajo promovió su formación. Contrariamente Batchelor *et al.* (1989), reportan la formación de raíces en explantes nodales de *P.*

cineraria, *P. chilensis* y *P. juliflora*, utilizando AIB y ANA en combinación con cinetina y BAP.

Vitrificación

El porcentaje de vitrificación en todos los cultivos fue inferior al 3 % (tablas 12 y 13). Esta cifra puede considerarse no significativa, ya que menos de un explante de los 20 que constaba cada tratamiento, fue susceptible de vitrificarse, por lo que se considera que al ser este resultado tan pobre, es probable que dicho fenómeno fisiológico se deba al azar y no a las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento utilizadas.

Tabla 12. Porcentaje de explantes vitrificados, después de 35 días de incubación (frascos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	0	0	0
5.0	5	5	15
10.0	0	10	10
AIB			
1.0	0	0	5
5.0	0	10	0
10.0	0	0	0

Las cifras presentadas son el resultado de 20 observaciones.

Tabla 13. Porcentaje de explantes vitrificados, después de 35 días de incubación (tubos).

Auxina mg/L	BAP mg/L		
	1.0	5.0	10.0
ANA			
1.0	0	0	5
5.0	0	10	5
10.0	0	0	10
AIB			
1.0	0	10	5
5.0	0	5	0
10.0	0	0	5

Las cifras presentadas son el resultado 20 observaciones.

Efecto de los diferentes recipientes de cultivo utilizados

El efecto de los tratamientos utilizados en este trabajo sobre los cultivos se vió reflejado, en la formación de callo y brotes, no así en la formación de raíces por la presencia de AIB. Se había planteado la hipótesis de que tales eventos se verían favorecidos o reprimidos por la influencia del recipiente de cultivo utilizado, ó de que éste no ejerciera ningún efecto, como sucedió en la formación de callo. En las tablas 8 y 9 se puede apreciar que los registros más altos en cuanto al número de brotes promedio corresponden a los cultivos en tubo suplementados con BAP y ANA; sin embargo, cuando la auxina es AIB, los resultados en ambos recipientes de cultivo no son significativamente diferentes, ocurriendo algo similar en los lotes testigo. Esto presupone que existe una interacción entre los recipientes de cultivo (tubos) y los reguladores de crecimiento vegetal (BAP y ANA).

Dentro de este mismo contexto, los brotes formados por los cultivos testigo tienen un desarrollo normal, es decir, presentan desarrollo de las hojas, las pinnas y los folíolos como ocurre *in vivo*, mientras que en los lotes experimentales el desarrollo de estas estructuras es muy pobre. Esta tendencia fue reportada con anterioridad por Tabone *et al.* (1986).

En la literatura referente al cultivo de tejidos del género *Prosopis*, solo existe un trabajo con la especie conocida como *P. juliflora* (Batchelor *et al.*, 1989). Esta especie suele confundirse con mucha frecuencia al momento de su determinación taxonómica con *P. laevigata*. Comparando esta investigación con el presente trabajo se tiene que para *P. juliflora* las combinaciones de BAP, ANA, AIA y AIB son totalmente negativas para las variables manejadas aquí (tabla 2), Contrastando notablemente con los resultados obtenidos para *P. laevigata* (tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11).

CONCLUSIONES

- 1.- La formación de callo fue generalizada en todos los tratamientos.
- 2.- El medio de cultivo suplementado con 5.0 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de ANA, con una formación promedio de 4 brotes por explante nodal; fue el más adecuado para el establecimiento de cultivos *in vitro* de *P. laevigata*.
- 3.- La proliferación de brotes se vió promovida por la presencia de BAP a concentraciones por arriba de 5.0 mg/L.
- 4.- Existe una interacción entre los reguladores de crecimiento vegetal (BAP y ANA), los recipientes de cultivo (tubos) y los explantes nodales, la cual se ve reflejada en el número de brotes obtenidos.
- 5.- De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que se han sentado las bases para el establecimiento de las dos primeras fases de la micropropagación de *P. laevigata*.

LITERATURA CITADA

- Abdelnour, E.A. y E.J. Vincent, 1994. **Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Ammirato, P.V., 1985. Patterns of development in tissue culture. In: **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. Henke, H. and Constantin, H. (Eds.). Plenum Press.
- Anónimo, 1976. El mezquite. INIREB. **Comunicado No. 6 Sobre Recursos Bióticos Potenciales del País**. Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos. A.C. Xalapa, Veracruz, México.
- Arditti, J. y Ernst, R. 1993. **Micropropagation of orchids**. John Wiley. New York.
- Arya, H.C. y Shekhawat, N.S., 1986. Clonal Multiplication of Tree Species in the Thar Desert Through Tissue Culture. *Forest Ecology and Management*. **16**: 201-208.
- Aspinall, G.O. y Whitehead, C.C., 1970. Mesquite gum. The 4-O-methyl glucurone galactan core. *Can. J. Chem.* **48**: 3840-3849.
- Balboa, O. y Arce, P., 1991. Seasonality in Rooting of *Prosopis chilensis* cuttings and *in vitro* Micropropagation. *Forest Ecology and Management*. **40**:163-173.
- Barba, A.A., 1987. Reguladores del crecimiento vegetal. En: **Cultivo de Tejidos Vegetales**. Hurtado, M.D. y Merino, M.M. (Eds.). Trillas, México.
- Batchelor, C.A., Yao, D., Kochler, M.J. y Harris, P.J. 1989. *In vitro* propagation of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*). *Ann. Sci. For.* **46** suppl., 110s-112s.
- Bidwell, R.G., 1979. **Fisiología Vegetal**. AGT. México.
- Cadmo, H.R. y Villalobos, V.M., 1985. **Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. FAO. México.
- Debergh, C.P. y Maene, L.J., 1981. A scheme comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*. **14**: 335-341.

- Evans, D.A. y Flick, C.E., 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: **Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture**. Thorpe, A.T. (Ed.). Academic Press, U.S.A.
- Figueiredo, A.A., 1990. Mesquite : History, Composition, and Food Uses. *Food Technology*. November. 118-128.
- García, M.E. y Galindo A.S., 1986. The Uses of Mesquite (*Prosopis* spp.) in the Highlands of San Luis Potosi, Mexico. *Forest Ecology and Management*. **16**: 49-56.
- Gautheret, R.J., 1985. History of plant tissue and cell culture: A personal account. In: **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. Vol. 2. Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation and Cryopreservation. Vasil, I.K. Academic Press. U.S.A.
- Jones, B.S. y Luchsinger, E.A., 1986. **Plant Systematics**. 2^{da} edición. McGraw-Hill. U.S.A.
- Kavanagh, k., Drew, A.P. y Maynard, C., 1991. The effect of the culture vessel on micropropagation. En: **Biotechnology in Agriculture and Forestry 17. High Tech. and Micropropagation I**. Bajaj, Y.P.S., Ed. Springer Verlag, Germany.
- López, P.C., 1985. Medios de cultivo. En: **Fundamentos Teóricos-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. Cadmo, H. R. y Villalobos, V.M. (Eds.). FAO. México.
- Moya, E.G., 1992. Establecimiento de callos y células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L., evaluando la producción de trigonelina y sapogeninas. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM-CAMPUS Iztacala, México.
- Ochoa, A.N., 1985. Establecimiento de cultivos *in vitro*. En: **Fundamentos Teóricos-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales**. Cadmo, H. R. y Villalobos, V.M. (Eds.). FAO. México.
- Pierik, R.L.M., 1990. **Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores**. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Pollard, J.W. y Walker, J.M., 1990. **Methods in Molecular Biology. 6 "Plant Cell and Tissue Culture"**. Humana Press. Clifton, New Jersey. U.S.A.

- Robert, M.L. y Loyola, V.M., 1985. **El Cultivo de Tejidos Vegetales en México**. CONACYT, México.
- Rzedowski, J., 1979. **Flora Fanerogámica del Valle de México**. Vol. I. Edit. Continental. México.
- Rzedowski, J., 1981. **Vegetación de México**. Limusa, México.
- Sánchez, J.E., 1985. El cultivo de tejidos vegetales en la investigación básica. En: **El Cultivo de Tejidos Vegetales en México**. Robert, M.L. y Loyola, V.M. (Comp.). CICY-CONACYT. México.
- Santos-Díaz, M.S. y Ochoa, A., 1992. Cultivo de tejidos vegetales y variación somaclonal. *Téc. Cienc. Agrop.*, **1**(1): 1-13.
- Street, H.E., 1977. Introduction. In: **Plant Tissue and Cell Culture**. Street, H.E. (Ed.). Botanical Monographs. vol. II, 2nd edn., Blackwell Scientific Pub. Great Britain.
- Tabone, T.J., Felker, P., Bingham, R.L., Reyes, I. y Loughrey, S., 1986. Techniques in the Shoot Multiplication of the Leguminous Tree *Prosopis alba* Clone B₂V₅₀. *Forest Ecology and Management*. **16**: 191-200.
- Torres, C.K., 1989. **Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops**. AVI. USA.
- Vidalie, H., 1986. **Cultivo in vitro**. Científica. México.
- Wareing, R.F. y Phillips, I.D., 1973. **The Control of Growth and Differentiation in Plants**. Pergamon press, LTD. Great Britain.
- Wickens, G.E., Gooding, J.R. y Field, D.V. (Eds.). 1985. **Plants for Arid Lands**. Proceedings of the Kew International Conference on Economic Plants for Arid Lands. Royal Botanic Garden, Kew, England.
- Woods, A., 1985. The potential for the *in vitro* propagation of a number of economically important plants for arid areas. En: **Plants for Arid Lands**. Wickens, G.E., Gooding, J.R. and Field, D.V. (Eds.). Proceedings of the Kew International Conference on Economic Plants for Arid Lands. Royal Botanic Garden, Kew, England.
- Yashpal, G. y Arya, C.H., 1984. Tissue Culture of Desert Tress: I. Clonal Multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. *J. Plant Physiol.* **115**: 183-189.

Zimmerman, R.H. y Barnhill, J.J., 1991. Commercial micropropagation in North American. In: **Micropropagation, Technology and Application**. Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

APENDICE A

Formulación del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

COMPONENTES	CONCENTRACION (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.0
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ 4H ₂ O	8.6
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CaCl ₂ 2H ₂ O	440.0
KI	0.83
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170.0
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.81
NA ₂ EDTA	37.31

Formulación del medio de cultivo MS (SIGMA - 5519).

COMPONENTES	CONCENTRACION (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.0
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ 4H ₂ O	8.6
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CaCl ₂ 2H ₂ O	440.0
KI	0.83
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170.0
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.81
NA ₂ EDTA	37.31
Glicina	2.0
Mio-inositol	100.0
Ac. nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	1.0

APENDICE B

Tabla de resultados para la prueba de ANOVA de 3 factores realizada.

ESTADISTICA GENERAL ANDEVA	Resumen de todos los factores; diseño: (anova1.sta) 1-RECIPIENTE, 2-HORMONA, 3-TRATAMIENTO					
Factor	df Factores	MS Factores	df Error	MS Error	F	Nivel-p
1	1*	29.64500*	760*	1.615263*	18.35305*	.000021*
2	1*	89.78000*	760*	1.615263*	55.58228*	.000000*
3	9*	15.79111*	760*	1.615263*	9.77619*	.000000*
12	1*	18.00000*	760*	1.615263*	11.14369*	.000884*
13	9*	8.48111*	760*	1.615263*	5.25061*	.000001*
23	9*	10.03278*	760*	1.615263*	6.21123*	.000000*
123	9*	5.86944*	760*	1.615263*	3.63374*	.000186*

* Diferencias significativas.

- Para la elaboración del análisis de varianza y la prueba Tuckey, se utilizó el software STATISTICA FOR WINDOWS 4.3 STATSOFT I.N.C. 1993.