

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA, PARA LA
OBTENCION DE CALLO IN VITRO EN TRES MALEZAS
COMUNES (Amaranthus spinosus L, A. retroflexus L, y
Parthenium hysterophorus L), BASICO PARA ENSAYOS
ALELOPATICOS CON FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris L.).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

OSCAR GARZA MORALES

MARIN, N. L.

JUNIO DE 1992

25813
.16
G372
C. 1



1080062437

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA, PARA LA
OBTENCION DE CALLO IN VITRO EN TRES MALEZAS
COMUNES (Amaranthus spinosus L, A. retroflexus L, y
Parthenium hysterophorus L), BASICO PARA ENSAYOS
ALELOPATICOS CON FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris L.).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA
PRESENTA

OSCAR GARZA MORALES

MARIN, N. L.

JUNIO DE 1992

11077 *e*

T
SB613
M6
G372


Biblioteca Central
Magna Solidaridad
F. Tesis
FONDO
TESIS LICENCIATURA

040.581
FA2
1992
C.5

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA, PARA LA OBTENCION DE CALLO
IN VITRO EN TRES MALEZAS COMUNES (Amaranthus spinosus L, A.
retroflexus L, y Parthenium hysterophorus L), BASICO PARA
ENSAYOS ALELOPATICOS CON FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris L.).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

OSCAR GARZA MORALES

MARIN, N. L.

JUNIO DE 1992.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

FACULTAD DE AGRONOMIA

TESIS ELABORADA POR OSCAR GARZA MORALES, ACEPTADA Y APROBADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

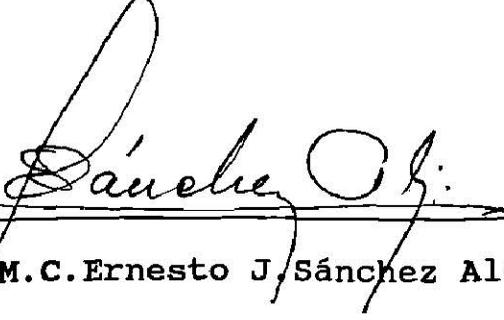
COMITE SUPERVISOR DE TESIS



Ing. M. Sc. José Elías Treviño Ramírez
Asesor Principal



Ing.M.C.Omar G.Alvarado Gómez
Asesor Auxiliar



Ing.M.C.Ernesto J.Sánchez Alejo
Asesor Auxiliar

DEDICATORIA

A MIS PADRES :

SR. HEBERTO GARZA HINOJOSA

SRA. MARIA DE LA PAZ MORALES DE GARZA

**Con todo cariño y respeto, gracias por darme su apoyo
para la terminación de mi carrera.**

AGRADECIMIENTOS

AL ING. M.Sc. JOSE ELIAS TREVIÑO RAMIREZ, asesor principal.

Por sus enseñanzas y su dedicación para que el trabajo llegara a su culminación.

A LOS INGENIEROS M.C. OMAR G. ALVARADO GOMEZ Y ERNESTO SANCHEZ ALEJO, asesores auxiliares.

Por el interés y ayuda brindada, en las revisiones realizadas.

A LA BIOL. M.C. ESPERANZA MAGALLANES, asesor externo.

Mi más sincero agradecimiento por su paciencia y entrega, para llevar acabo este trabajo.

AL DR. XORGE A. DOMINGUEZ. Gracias por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo en el departamento de química del I.T.E.S.M.

AL ING. M.C. APOLINAR AGUILLON. Le agradezco su desinteresada ayuda y por lograr realizar el convenio con el I.T.E.S.M.

INDICE

Pág.

LISTA DE CUADROS.....	vii
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales.....	4
2.2 El cultivo de callo y sus aplicaciones.....	5
2.3 Factores que influyen en el cultivo de callo.....	9
2.3.1 El explante.....	10
2.3.2 El medio de cultivo.....	12
2.3.3 Las condiciones de incubación.....	20
2.4 La alelopatía y su importancia en la agricultura...22	
2.5 Aplicaciones del cultivo de callo en estudios de alelopatía	24
2.5.1 Antecedentes del cultivo de callo, en las especies de estudio.....	24
2.5.2 Antecedentes de efectos alelopáticos, en las especies de estudio.....	25
2.5.3 Potencial de la técnica en estudios de alelopatía.....	28
III. MATERIALES Y METODOS.....	30

3.1	Material de campo.....	30
3.1.1	Malezas.....	30
3.1.2	Frijol.....	31
3.2	Material de laboratorio.....	31
3.3	Metodología desarrollada.....	31
3.3.1	Colecta de material vegetal.....	31
3.3.2	Preparación de medios de cultivo.....	32
3.3.3	Esterilización superficial.....	33
3.3.4	Excisión, siembra e incubación.....	34
3.3.5	Descripción de experimentos	35
3.3.6	Medición de variables.....	39
3.3.7	Análisis estadístico	40
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
4.1	Experimento 1.....	41
4.2	Experimento 2.....	43
4.3	Experimento 3.....	44
4.4	Experimento 4.....	45
4.5	Experimento 5.....	46
4.6	Experimento 6.....	46
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
VI.	RESUMEN.....	51
VII.	SUMMARY.....	54
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	56
IX.	APENDICE.....	62

LISTA DE CUADROS .

Cuadro 1A	Equipo y material de cristalería utilizado en la realización de los experimentos.....	62
Cuadro 2A	Reactivos utilizados en la preparación de los medios de cultivo.....	63
Cuadro 3A	Proporciones y sustancias para elaborar las soluciones stock del medio de cultivo según Murashige y Skoog (MS), enriquecido.....	64
Cuadro 4A	Pasos sucesivos para elaborar un litro de medio de cultivo (MS) a partir de las soluciones stock.....	65
Cuadro 5A	Peso fresco de callos de <u>A. spinosus</u> provenientes de explantes de tres tamaños en dos medios de cultivo, a los 60 días después de la siembra.....	66
Cuadro 6A	Análisis de varianza para la variable peso fresco de callos de <u>A. spinosus</u> cultivados a diferentes tamaños de explante y en diferentes medios.....	67
Cuadro 7A	Comparación de medias de tratamientos (medios de cultivo y tamaños de explante) en callos de <u>A. spinosus</u>	67

Cuadro 8A Peso fresco de callos de A. retroflexus provenientes de explantes de hoja y tallo de tres tamaños.....68

Cuadro 9A Análisis de varianza en callos de A. retroflexus (procedencia y tamaño de explante).....69

Cuadro 10A Comparación de medias de tratamientos (procedencia y tamaño de explante) en callos de A. retroflexus69

Cuadro 11A Producción de callos de A. retroflexus y A. spinosus, a partir de explantes provenientes de semilla germinada in vitro70

Cuadro 12A Análisis de varianza para la variable peso fresco de callo de A. spinosus y A. retroflexus.....70

Cuadro 13A Comparación de medias de tratamientos, en callos de A. spinosus y A. retroflexus71

Cuadro 14A Peso fresco (g) de la producción de callos P. hysterophorus, en un medio MS + 2,4-D (3mg/l), con explantes provenientes de segmentos de hoja de tres tamaños y de tallo de dos tamaños

durante 70 días, en completa obscuridad.....	72
 Cuadro 15A Análisis de varianza para la variable peso fresco de callos de <u>P. hystero</u> phorus, cultivados a diferentes tamaños de explante.....	73
 Cuadro 16A Comparación de medias de tratamientos (procedencia y tamaño de explante), de callos de <u>P. hystero</u> phorus.....	73
 Cuadro 17A Producción de callos (g) a partir de plántulas y raíz obtenidas por semilla germinada <u>in vitro</u> en un medio MS +2,4-D(3mg/l) a los 60 días de la siembra.....	74
 Cuadro 18A Análisis de varianza para la variable peso fresco de callo de <u>P.hystero</u> phorus, provenientes de segmentos de plántulas y de raíz.....	75
 Cuadro 19A Comparación de medias para la variable peso fresco (g), de callo de <u>P. hystero</u> phorus, provenientes de segmentos de plántulas y de raíz.....	75
 Cuadro 20A Peso y área de callos de <u>A. spinosus</u> y <u>P. vulgaris</u> , establecidos juntos T1 e individuales T2.....	76

Cuadro 21A Análisis de varianza para la variable peso fresco (g), en callos de P. vulgaris, provenientes del bio-ensayo y el testigo.....77

Cuadro 22A Análisis de varianza para la variable área (cm²) en callos de P. vulgaris, provenientes del bio-ensayo y el testigo.....77

Cuadro 23A Comparación de medias para la variable peso fresco (g) de callos, de P. vulgaris provenientes del bio-ensayo y el testigo.....78

Cuadro 24A Comparación de medias para la variable área, de callos de P. vulgaris provenientes del bio-ensayo y el testigo.....78

I. INTRODUCCION.

La importancia del control de malezas en la producción mundial de alimentos, está firmemente sustentada. Una producción económicamente rentable y de calidad, depende del control de malezas, este hecho es reconocido particularmente en las naciones agrícolamente desarrolladas. Para muchas de estas naciones que tratan de alcanzar el autoabastecimiento de productos agrícolas, las pérdidas que causan las malezas han ido en aumento, retrasando el logro de tales objetivos (Robbins, 1969).

Para desarrollar las actividades agrícolas, el hombre ha luchado desde los comienzos de la agricultura, con ciertas especies vegetales nocivas frecuentemente prolíficas y persistentes, que dificultan las operaciones agrícolas, aumentan el trabajo, hacen subir los costos y reducen los rendimientos, tales plantas nocivas reciben el nombre de malas hierbas; para su control se han agrupado en métodos mecánicos, basados en la competencia, los biológicos, y los químicos (Robbins, 1969).

El control de malezas eficiente y económico, es desde hace mucho un problema difícil para muchos productores, no obstante, la aparición de los herbicidas químicos resolvió

parte del problema y, de hecho está considerada como uno de los avances más grandes de la agricultura. Sin embargo, estos productos químicos no son el remedio definitivo que inicialmente parecía ser, pues su uso incorrecto puede dañar gravemente el ambiente causando contaminación e intoxicación del hombre (Bowen y Bernard, 1988)

El concepto alelopático consistente en la inhibición del crecimiento de una planta por otra, puede ser considerado un método de control de maleza, aún y cuando todavía no tenga uso comercial aparente. Este método, puede representar una alternativa a los métodos de control convencionales a mediano plazo, considerando los conocimientos que a la fecha se tienen sobre el efecto alelopático de algunas plantas como la hierba amargosa, epazote, polen de maíz, etc. Con el surgimiento de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales y sus aplicaciones en la agricultura, se puede dar solución integral a la problemática existente de malezas en el campo, también la extracción de sustancias vegetales de plantas, se puede llevar a cabo ahorrando tiempo y recursos, esto llevaría a la elaboración final de compuestos bio-degradables, que servirán para dar inicio al desarrollo de nuevos bio-insecticidas y bio-herbicidas, en donde el agricultor se vería grandemente beneficiado con el uso de estos compuestos, puesto que traería menores inversiones en el control de malezas, y además son menores los riesgos de contaminación de residuos químicos para

el consumidor. Es por eso que en el presente trabajo, se pretende dar inicio a esta investigación para que en un futuro se haga realidad el empleo de estos compuestos.

Tomando como base lo anterior, se persiguieron los siguientes objetivos en este trabajo:

1) Desarrollar una metodología para la formación de callos de tres especies de malezas y frijol común.

2) Probar la alelopatía in vitro entre callos de frijol (Phaseolus vulgaris) y callos de quelite (Amaranthus spinosus).

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales.

La técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, cualquier parte de una planta bajo condiciones artificiales controladas de luminosidad, humedad y temperatura (Street, 1974).

Entre las técnicas mas utilizadas están el cultivo de callo, células en suspensión, cultivo de ápices y meristemas, estas pueden ser aplicadas en la multiplicación rápida de cultivares valiosos, la producción de plantas libres de virus, la producción de nuevas variedades resistentes o tolerantes a enfermedades, salinidad, sequía, herbicidas, la preservación de germoplasma, y la síntesis de productos químicos (Street, 1974).

De acuerdo a Loyola y Reyes (1985) el cultivo de tejidos en general es un sistema de detalles, la mayoría de las veces no se puede ni extrapolar, ni trabajar con aproximaciones de los factores físicos y químicos que intervienen para un determinado propósito. Los cambios en las dosificaciones del medio, del fotoperíodo, de la temperatura, del pH, entre otras cosas, pueden ocasionar alteraciones morfológicas, retraso de crecimiento, etc.

2.2 El cultivo de callo y sus aplicaciones.

Un callo se define como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos ó tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando éstas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que dá origen a una masa amorfa de tejido. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras otros forman tejidos esponjosos, con una gran cantidad de espacios intercelulares (Barba, 1987).

Según Dodds y Roberts (1984) las respuestas cuantitativas y cualitativas del crecimiento del callo en cultivo involucran un sinergismo estrecho y complejo entre el origen del tejido usado para la primera inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa.

Hussey (1980) estableció que para la inducción de callos una auxina generalmente es requerida y algunas veces en combinación con una citocinina. El 2,4-D es un compuesto altamente activo y es la más efectiva auxina sintética para promover callos.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo, es la totipotencialidad de sus

células para formar ó desarrollar, brotes, raíces, embriones, etc; los cuales pueden formar plantas completas (Dodds y Roberts, 1984), sin embargo Hussey (1980) señaló que no todas las especies producen callos totipotentes, indicando que la ventaja real de los callos consiste en la comparativa facilidad con la que grandes cantidades de tejidos pueden ser reunidos antes de la formación de plantas.

Según Barba (1987), por lo general el callo toma de 3 a 8 semanas para alcanzar el tamaño suficiente para efectuar un subcultivo, transfiriéndose a medio nuevo con una frecuencia que varía de 2 a 6 semanas, ya que la falta de transferencia lleva al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido.

Sánchez (1985) mencionó que durante los subcultivos de éstos callos iniciales se establece en realidad una selección celular, el medio y las condiciones actúan como sistema selectivo en el cultivo y se favorece la multiplicación de algunos de los tipos celulares, que rápidamente se hacen dominantes en el sistema, constituyéndose así -líneas Celulares-. Lo anterior contrasta con lo registrado con Barba (1987) de que un callo homogéneo, consistente en un tipo celular, raramente se encuentra, ya que debido a estudios microscópicos han demostrado que los tejidos del tipo calloso generalmente son heterogéneos en su composición celular, es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares.

Hussey (1980) y Dodds y Roberts (1984) coinciden en indicar que algunos callos, especialmente de crecimiento rápido, inducidos de tejidos con altas concentraciones de hormonas, sufren un daño o modificación de la citología nuclear de las células en cultivo, provocan células genéticamente aberrantes, inestabilidad cromosómica; así los callos propagados en serie, típicamente acumulan una alta proporción de poliploidía.

Los callos y cultivos en suspensión pueden ser genética y fisiológicamente diferentes de como son las plantas completas. Ya que los tejidos de las plantas, cuando son propagados vegetativamente, son normalmente mosaicos genéticos en cuanto a varias características, como la resistencia a enfermedades, a tener mayor vigor que la planta madre, etc. (Day, 1980).

El crecimiento y multiplicación de un callo son tan intensos que provocan, el gasto de los nutrientes del medio, además, debido a la evaporación el medio sólido se deshidrata; en el caso del medio líquido, aumenta la concentración de sus constituyentes por el mismo efecto; también la acumulación de metabolitos de desecho celular, puede llegar a ser tan alta que se vuelven tóxicos para el tejido (Barba, 1987).

Los callos subcultivados muchas veces (callos viejos) pierden a través del tiempo su capacidad morfogénica;

posiblemente ésta pérdida es causada por el incremento de anomalías cromosómicas (Conger et. al, 1980 citado por Barba 1987), por lo que debe ser frecuente, la renovación del material biológico del que se obtenga el callo.

Dodds y Roberts (1984) han descrito algunas observaciones tempranas en la formación de heridas del callo. El estímulo implicado en la producción de callos con llagas se da con las hormonas endogénas auxinas y citoquininas.

El material vegetal típicamente cultivado incluye cambium vascular, parénquima de depósito, periciclo de raíces, cotiledones, mesófilo de hojas y tejido provascular (Yeoman y Maclead, 1977 citados por Bidwell 1979).

En relación con la anatomía celular, hay una variación considerable en medida a la diferenciación celular. Un callo homogéneo consistente enteramente en células parenquimáticas es raramente encontrado, aunque algunas excepciones han sido reportadas en cultivos de células de agave y rosas (Narayamswamy, 1977 citado por Wilkins, 1985).

El uso de cultivos callosos con propósito de investigación, en cultivos prolongados presentan deficiencias cromosómicas, mutaciones de genes y endoreduplicación resultante de la poliploidía, la tasa en la cual éstos cambios

ocurren varía con la composición del ambiente, la madurez del cultivo, y las especies involucradas (Sunderland, 1977 citado por Hussey, 1980).

Las características generales del crecimiento de un callo incluye una relación compleja, entre el material vegetal usado para iniciar el callo, la composición del medio y las condiciones del ambiente durante el período de incubación, algunos crecimientos de callos son densamente lignificados y duros de textura, mientras que otros se separan fácilmente a estos se les llama cultivos "friables", los callos pueden aparecer amarillentos, blancos, verdes ó pigmentados, la pigmentación puede ser uniforme por todo el callo, ó algunas regiones pueden permanecer no pigmentadas (Alfermann y Reinhard, 1971 citados por Augé, 1982).

2.3 Factores que influyen en el cultivo de callo.

Es muy amplia la gama de factores que afectan la sobrevivencia y el crecimiento de los cultivos de callos, pero hay tres que son las más importantes: El explante, el medio de cultivo y las condiciones de incubación.

2.3.1 El explante.

Murashige (1974) consideró cinco puntos importantes para el tipo de tejido a usarse en el cultivo in vitro :

- A) El órgano que va a servir como fuente de tejido.
- B) Edad fisiológica del órgano.
- C) La época en la cual es extraído el explante.
- D) Tamaño del explante.
- E) Cualidades de la planta de donde será extraído el explante.

Según la etapa y la edad de la planta madre o donadora, las reacciones de los explantes pueden variar en gran medida. En forma general, se puede admitir que las plantas jóvenes son las que proporcionan los explantes más reactivos, ya que la potencialidad disminuye con la edad. En el transcurso de la fase juvenil, a partir de tejidos tomados muestran buenas reacciones, mientras que al envejecer la potencialidad disminuye. Se ha observado que al alcanzar la edad productora, todavía es posible lograr buenas reacciones a partir de tejidos tomados de los mismos órganos reproductores (Augé, 1982).

Los explantes formados de tejidos diferenciados, como los fragmentos de tallos, raíces, hojas, flores, frutos, etc; en los que el cultivo deberá provocar un retroceso total para volver a dar a las células la capacidad de dividirse, en primer lugar, y luego un poder organógeno. En estos explantes, y

según las especies, se ha demostrado que todas las partes de una planta son susceptibles de seguir el proceso de desdiferenciación con una nueva organización, pero la diferencia y variación entre especies es grande (Augé, 1982).

Entre otras características asociadas con el explante, la frecuencia de sobrevivencia de éste, así como su razón de desarrollo hacia una estructura con capacidad de ser subcultivada ha sido relacionada directamente a su tamaño inicial. Para explantes extremadamente pequeños, la probabilidad de su sobrevivencia y desarrollo in vitro son muy pobres. Sin embargo; la probabilidad de aislar un tejido limpio, esto es, un explante libre de microorganismos, esta inversamente relacionado con su tamaño así, mayor tamaño mayor probabilidad hay de contaminación (Murashige, 1974 y Beelen 1984).

Mientras más grande sea el explante, más determinantes son los equilibrios endógenos del explante. Así un explante pequeño será orientado con mayor facilidad por las sustancias que contenga, el medio donde se encuentre (Augé, 1982).

Murashige (1974) y Street (1974) señalan que el explante es un fragmento extraído de la planta donadora, con el propósito de cultivarlo asépticamente. Cuando más pequeño sea, menos probabilidad hay de contaminación del medio, pero también

existen menores probabilidades de "prendimiento" ó desarrollo. El grado de inmersión en el medio, cuanto más es inmerso el explante, menos oxígeno recibirá. Los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación, que los tejidos viejos.

2.3.2 El medio de cultivo.

Para que un cultivo in vitro pueda sobrevivir y desarrollarse sin problemas, debe tener disponible al menos sus nutrientes esenciales y sus fuentes de energía. Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar como se muestra en el Cuadro 2A, donde aparecen la preparación de soluciones stock.

A lo largo del desarrollo y evolución de las técnicas de cultivo in vitro de tejidos vegetales, se ha realizado un número relativamente grande de investigaciones que buscan optimizar los ingredientes nutricionales de materiales específicos y se han formado varias mezclas de sales. Sin embargo, en los últimos años se aceptó que la fórmula desarrollada por Murashige y Skoog en 1962, cumple con los requisitos de supervivencia de la mayoría de los tejidos empleados (Dodds y Roberts, 1984).

La formación de raíces y brotes en los tejidos vegetales está regulado básicamente por el balance en el contenido disponible de dos grupos de hormonas, auxinas y citocininas, como lo proponen Skoog y Miller (1957), citados por Murashige (1974). Otras sustancias lo que hacen es modificar la efectividad de las hormonas (auxinas y citocininas). Este concepto para ser aplicable a todas las plantas y si no se ha generalizado para algunas especies, es debido solamente a efectos de factores colaterales, como explantes no apropiados, luz ó minerales (Murashige,1977).

Briefly citado por Weaver (1982), estableció que ambos grupos de hormonas son fundamentalmente las que regulan el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales in vitro y que los patrones de dirección del desarrollo están determinados por el balance de las dos sustancias fitorreguladoras en el medio de cultivo, de tal manera que un nivel relativamente alto de auxinas en combinación con uno es bajo de citocininas, promueve iniciación de raíces así mismo la relación inversa promoverá la iniciación de brotes. Esto puede atribuirse, como menciona Bidwell (1979), y Weaver (1982), al notable incremento del ADN, ARN y síntesis de proteínas.

Horgan (1985) y Wilkins (1985), comentan que este fenómeno puede observarse con algunas diferencias, en tejidos de muchas especies (pasando por callo ó no), manejando la

concentración relativa auxina/citocinina, y que la respuesta varía en un amplio rango según el genotipo específico, el medio de cultivo básico (sales minerales), y la parte de la planta donadora.

Dentro de un mismo tipo de fitorreguladores puede haber compuestos que inducen a respuestas muy específicas, como el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) dentro de las auxinas, que a diversas dosis causa desdiferenciación del tejido, formando una masa celular amorfa "callo" (Reinart y Bajaí 1977).

Smith y Murashige en 1970 citados por Dodds y Roberts (1984), mencionan que encontraron dificultades al usar medios de cultivo in vitro, y encontraron ciertas ventajas en la técnica desarrollada por Goodwin en 1966, la cual usa como dispositivo de soporte, puentes de papel filtro sobre los que son colocados los explantes dentro el recipiente de cultivo. La ventaja radica aparentemente, en que el explante está más en contacto con el medio fluido y éste, así como las raíces que se desarrollan después, tienen más facilidad para obtener los nutrientes y realizar el intercambio gaseoso.

Un medio de cultivo es una solución que en forma general se encuentra constituida por: (Villalobos, 1985).

1.- Sales inorgánicas:

A) **Macronutrientes:** Se requiere de una fuente continua de ciertas sustancias químicas inorgánicas, además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos son requeridos en grandes cantidades y son principalmente: N, P, Ca, Mg, S y K.

B) **Micronutrientes:** Los más elementales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo. La utilización de agentes quelatantes, los cuales son compuestos capaces de unir un ión metal con varias uniones químicas formando un anillo complejo, como por ejemplo el EDTA (Acido etilén-diamino-tetracético). Bajas concentraciones de EDTA estimulan el crecimiento, haciendo que el fierro este disponible en bajas cantidades.

2.- Compuestos orgánicos están constituidos por:

A) **Vitaminas:** Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en muy pequeñas cantidades. Las vitaminas utilizadas más frecuentemente son: Tiamina, Acido nicotínico, Acido pantoténico, Acido fólico, Riboflavina y Vitamina C.

El Mio-inositol, se denomina también meso-inositol ó inositol, no es una vitamina propiamente, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, probablemente participa en la vía biosintética del ácido

galacturónico, ayudando a la formación de varios constituyentes celulares, como el ácido ascórbico y la pectina, además de otros compuestos que intervienen en la división celular.

B) Carbohidratos: Se utilizan como fuente de energía y carbono. La sacarosa es el azúcar que más se emplea, pero la glucosa, maltosa, fructuosa y galactosa también son utilizados Gautheret (1985), citado por (Murashige, 1974), menciona que en principio se pensaba que un tejido dotado de clorofila y con una fuente lumínica podría sintetizar sus propios carbohidratos, pero numerosas investigaciones demostraron que no era así.

Los tejidos no sintetizan carbohidratos porque bajo cultivo la clorofila se desintegra y se despigmenta. La sacarosa se emplea a una concentración más elevadas 5 a 12% (Murashige, 1974).

C) Aminoácidos y complejos orgánicos: Tales como Glicina, Nitrógeno orgánico, Urea, Glutamina, Amonio, L-tirosina, L-Arginina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico. Otros compuestos orgánicos como el jugo de naranja, en donde el aumento en el crecimiento de algunos callos es atribuible a este, parcialmente al ácido cítrico, este ácido junto con el ascórbico, se emplea para evitar la oxidación de ciertos inóculos (Barba, 1987).

3.- Agentes solidificantes: Se ha empleado el agar como soporte en la preparación de medios sólidos ya que presenta varias ventajas como son la de que éste no sea digerido por las enzimas y no reacciona como constituyente del medio. Más recientemente se ha incrementado el uso del Gel-rite, éste es otro agente solidificante que proporciona mayores ventajas sobre el agar, ya que presenta mayor porcentaje de pureza que el agar y es utilizado en menores concentraciones (Murashige, 1977).

Es muy importante mencionar que en la utilización de un medio solidificado, la concentración de Agar y la calidad de éste tiene efecto directo sobre el medio, esto es sobre la reacción del explante y el pH del medio (Augé, 1982).

Altas concentraciones de agar, hacen demasiado duro el medio, pueden llegar a inhibir el crecimiento de los explantes. Las concentraciones de agar han sido establecidas de una manera sistemática de acuerdo a las necesidades específicas de cada especie (Murashige, 1977).

Murashige y Skoog (1962), utilizan niveles de agar de 0.6% a 1.0%, siendo los más recomendables .65% y .7%.

4.- Reguladores del crecimiento: Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, en tres grupos principales:

A) Promotores de crecimiento: auxinas, citocininas y giberilinas.

B) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.

C) Etileno.

Un regulador del crecimiento es un compuesto químico capaz de intervenir en el metabolismo, que actúa en muy pequeñas cantidades para activar ó deprimir algún proceso (Rojas y Rovalo, 1984).

A.1 Auxinas: Son sustancias orgánicas que promueven el crecimiento en aumento de volúmen. Sus efectos son múltiples tales como alargamiento de células a bajas concentraciones, aceleración de la respiración que repercute en un intenso metabolismo e interfiere en el contenido de RNA y los efectos son la base de muchos otros. Se usan en concentraciones de .1- a 10 mg/l (Rojas y Rovalo, 1984).

A.2 Citocininas: Son hormonas de las plantas que intervienen en el crecimiento y desdiferenciación, activan la división

celular y retardan la senescencia de los órganos. Tienen como efecto incrementar la velocidad en el ritmo de la mitosis así como en cierta medida el alargamiento celular, se encargan de retardar el envejecimiento de los órganos de la planta por efectos sobre el DNA y por acelerar la fluidez de la auxina y nutrientes a las hojas y evitar su amarillamiento y caída. Las concentraciones usadas son de .03 a 30.0 mg/l (Rojas y Rovalo, 1984).

A.3 Giberelinas: Presentan un espectro de actividad biológico muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, pues pueden producir una elongación extraordinaria en enanos genéticos, fenómeno que puede ser atribuible a la estimulación de la división y al alargamiento celular (Bidwell, 1979 citado por Merino y Hurtado 1987).

Las citocininas y auxinas más ampliamente usadas son:
(Merino y Hurtado, 1987).

N6 dimetil alil aminopurina (2ip) .

Citocininas: N6 furfuril aminopurina (Kinetina)

N6(4-hidroxi, 3 metil, 2-butenil), amino(zeatina)

N6 bencil aminopurina (BAP)

N6 Aminopurina(Adenina)

Acido 3-indolbutírico (AIB)

Auxinas: Acido 3-indolacético (AIA)

Acido Naftalenacético (ANA)

Acido 4- clorofenoxiacético (CPA)

Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Acido 4- amino-3,5,6-Tricloropicolínico(Tordón)

5.- Complejos naturales: Se usan estos complejos, como última alternativa después de que todos los ingredientes definitivos del medio han fallado en el establecimiento de cultivos de células y órganos. Ejemplo de estos pulpa de plátano, endospermo de coco, jugo de tomate, etc. (Barba, 1987).

2.3.3 Las condiciones de incubación.

A) Temperatura: Es de práctica general entre los que trabajan con cultivo de tejidos, proporciona a los explantes una

temperatura muy cerca a los 25° C, esta práctica no está acorde a las fluctuaciones que normalmente tienen las plantas diariamente y a través de las estaciones, sin embargo funciona sin problemas con las plantas anuales herbáceas de los trópicos, que tienden a desarrollar su ciclo en una estación con temperaturas relativamente constantes; en el caso de especies desérticas y de clima templado que son sometidas a fluctuaciones relativamente grandes de temperaturas durante el día y a las marcadas estaciones debe buscarse el régimen adecuado de temperaturas según su adaptación, para esperar éxito en la micropropagación (Murashige, 1977).

B) Luminosidad: Murashige (1974), encontró que tanto la intensidad, el tiempo de exposición y la distribución en el día (fotoperíodo) de la iluminación, tiene importante influencia sobre el desarrollo de los cultivos in vitro, el régimen óptimo es alrededor de 16 horas luz, proporcionadas por lámparas fluorescentes de luz fría, así como intensidades cercanas a los 1000 lux. También se ha observado que el uso de 3000 ó menos lux, baja sustancialmente la proporción de propágulos por explante e intensidades mayores a los 3000 lux reprimen el desarrollo de brotes adventicios y yemas auxiliares para la mayoría de las especies.

2.4 La alelopatía y su importancia en la agricultura.

El término alelopatía, se define como un mecanismo através del cual una planta es capaz de inhibir el crecimiento de otra, mediante la producción y excreción de sustancias tóxicas, es por lo tanto un mecanismo de antibiosis a nivel de plantas superiores (Rice, 1984).

En un sentido funcional, la alelopatía en la dominación puede ser definida como la influencia, que tienen ciertas plantas sobre el medio ambiente, siendo esto lo suficientemente fuerte como para determinar, el crecimiento de otras plantas, o bien si una planta crece, tal dominancia puede en un momento dado determinar un crecimiento o desarrollo deficiente (Muller, 1974 citado por Graue, 1981).

Rice, (1984) Un punto muy importante concerniente a la alelopatía es que su efecto depende de un componente químico, que se añade al ambiente que son requeridos por varios factores del medio que son requeridos por varias otras plantas en su habitat, factores que pueden ser reducidos incluyen agua, minerales, alimento y luz.

Ha habido confusión en la literatura, debido a que varios biólogos consideran la alelopatía como una forma de competencia, esta confusión ha disminuído por la aplicación del

término "interferencia" para referirse a la influencia total de una planta sobre otra, como sugirió Muller, (1969) citado por Rice, 1984.

Los inhibidores alelopáticos son aquellos que actúan sobre un individuo diferente al que los produce, sean de la misma o de otra especie. El término alelopatía lo refirió Molish en 1937 a toda intervención química entre las plantas fuese de efectos benéficos o represivos. El concepto de alelopatía se confunde a veces con el concepto general de inhibidor; sin embargo, para que un inhibidor pueda ser considerado como alelopático su acción deberá efectuarse en condiciones de campo o similares, el compuesto escapa de la planta al suelo o al aire donde hace sentir su efecto depresor, sobre otras plantas (Rojas, 1972).

Los inhibidores alelopáticos son también muy importantes en estudios sobre ecología de malezas, para explicar la preponderancia, de unas especies de malas hierbas sobre otras o para explicar el poder competitivo de ellas ante las plantas cultivadas. Es muy importante mencionar el que haya plantas cultivadas como alfalfa y pepino, que producen sustancias alelopáticas según Lockerman y Putman, 1979 citados por Rojas en 1972, esto con lleva dos implicaciones: el posible aislamiento e identificación de productos tóxicos alelopáticos que podrían ser sintetizados y usados como herbicidas

selectivos, y la incorporación de genes para productos alelopáticos a los cultivos para obtener poblaciones en potencial genético del control de malezas. Las sustancias alelopáticas son generalmente del grupo de los inhibidores fenólicos principalmente flavonoides y ácidos fenólicos, pero también se conocen terpenos volátiles, ácido cianhídrico, etc, (Rojas, 1972).

2.5 Aplicaciones del cultivo de callo en estudios de alelopatía.

2.5.1 Antecedentes del cultivo de callo en las especies de estudio.

Schewenke, Schneider y Guenther (1983) realizaron experimentos con la hormona kinetina con concentraciones de 0.1-1 mg/l, encontrando que con 0.1 mg/l, se obtuvo una considerable estimulación en el crecimiento, al principio fue muy bajo su desarrollo, pero sin embargo la kinetina tuvo influencia en el crecimiento de tallos de Amaranthus retroflexus en los bioensayos.

Wickam, K. Rodríguez, E. y Aditt, J. (1980) encontraron que las raíces, pecíolos, tallos y hojas de plantas maduras de Parthenium hysterophorus y cultivo de tallos derivados de

explantes obtenidos de plantas en forma aséptica se realizó su crecimiento. En plantas se detectó la presencia de sesquiterpenos y lactonas, la partenina no se detectó en raíces, pero estuvo presente en el cultivo de callos de todos los explantes trabajados. El coronopilin se detectó solo en pecíolos y hojas, y cultivo de callos, derivados de esos explantes. Se descubrió que las síntesis para la obtención de partenina y coronopilin no es limitado a tricomas glandulares.

2.5.2. Antecedentes de efectos alelopáticos en las especies de estudio.

El impacto alelopático de Parthenium hysterophorus sobre ciertos cultivos fue investigado por Kanchan y Jayachandra citados por Mitchell en 1977, encontrando una reducción del 40% en la producción de campos cultivados con ragi (cereal comúnmente usado por la población de bajo estrato social de la India). Así mismo se observó una reducción en la ramificación y producción de alrededor del 30 % en tomate.

Extractos metanólicos de P. hysterophorus inhibieron la germinación y crecimiento de Phaseolus vulgaris. Una marcada supresión del crecimiento y colonización de Rhizobium en leguminosas fué observada debido al mismo principio (Harvey, 1976).

Rojas en (1972) encontró que extractos de partenina en metanol y otros tipos de extractos inhibían la germinación y el desarrollo del frijol (Phaseolus vulgaris), además encontró que la partenina utilizada directamente tenía los mismos efectos aunque era menos activa.

En estudios llevados a cabo por Bhowmilk y Doll (1982), citados por Rice (1984), se observó que los extractos de Amaranthus retroflexus inhibieron el crecimiento en las siguientes partes: a) Raíz de maíz b) Coleóptilo de maíz c) Hipocótilo en soya. En maíz y soya se determinó después de 28 días la altura y peso fresco de plantas, obteniéndose como resultado una inhibición en el crecimiento del cultivo a causa de la maleza.

La más completa demostración del potencial alelopático de Parthenium hysterophorus fué hecha por Kanchan y Jayachandra, 1980, citados por Rice (1984) ellos plantearon que el retardo en el crecimiento en plantas está asociado con la maleza presente en el campo. La nodulación del frijol (Burpes stringless) se vió reducida y se comprobó que la inhibición se redujo al aumentar la distancia de la maleza.

P. hysterophorus es una maleza común que da serios problemas en 5 países del mundo (Holm et al, 1979 citados por Rice, 1984). Se ha distribuído en toda la India en solamente 2

décadas, esta rápida expansión de la maleza dió lugar a que se pensara en la inhibición del crecimiento de cultivos y por lo tanto de un potencial alelopático.

En un estudio de invernadero los extractos acuosos de Chenopodium, Amaranthus retroflexus y Setaria faberi, inhibieron el alargamiento de la radícula de maíz. El alargamiento del hipocótilo de la soya se inhibió mediante extractos de A. retroflexus, los rendimientos de soya fueron disminuidos de 12 a 20 % con los residuos de A. retroflexus, A. theoprasti y H. annuus. La asimilación de nutrientes en maíz y soya inhibida mediante estos residuos; N y P suplementarios no sobrepusieron los efectos inhibitorios. En un bio-ensayo de invernadero los residuos de A. retroflexus disminuyeron la altura del sorgo (*Sorghum bicolor*) pero no el peso seco y también redujeron el crecimiento de soya (*Glycine max*) (Bhowmilk, 1982).

La incorporación del material pulverizado de plantas de P. hysterophorus al suelo redujo la germinación y crecimiento de leguminosas más que la de cereales, aunque la germinación de arroz, avena y cebada no fue afectada, el crecimiento posterior fue considerablemente reducido. Todas las cosechas mostraron una reducción drástica en peso seco de la planta, en longitud

de raíz, número de hojas, retoños por rama y altura de planta. El crecimiento de plantas disminuyó, con la edad indicando inhibición continua (Muniyappa y Krishnamurthy, 1982).

Extractos de A. spinosus produjeron toxicidad en algodón y sorgo al realizar estudios edáficos, también estos extractos fueron severos en un tiempo corto, la toxicidad fue observada en campo en las planicies de Texas (Munger, Bernathy y Gipson, 1986).

En estudios realizados con el fin de determinar la magnitud del daño causado por la maleza al competir con un cultivo se encontró que por cada planta de quelite (Amaranthus spp) existente en cada metro de hilera se produjo una reducción de 270 kg/ha de producto cosechado. En tanto que al haber una planta por cada 25 cm de hilera, la reducción fue el doble (Anónimo, 1970).

2.5.3 Potencial de la técnica en estudios de alelopátia.

La producción de sustancias químicas a partir de tejidos vegetales tiene aplicación para formar productos secundarios de una gran variedad química, hasta ahora hay más de 200, esta lista crece día con día; estos fármacos forman un grupo muy importante de compuestos debido a que son productos que se

forman en muy baja cantidad en las plantas y además tienen mucho uso en medicina (Loyola y Reyes, 1985).

Apoyados en la técnica del cultivo de callo y en la producción de sustancias in vitro, podemos esperar que la síntesis en planta pueda realizarse también in vitro para tener producción industrial de sustancias alelopáticas con todas las ventajas que esto implica, sobretodo en el uso de sustancias naturales con gran valor a futuro, tal es el caso de los bio-herbicidas y bio-insecticidas, estas sustancias son muy beneficiosas ya que su residualidad es menor comparada, con los residuos de agro-químicos.

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación, se realizó en el laboratorio de Bio-tecnología del departamento de química del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, durante el período de marzo 1988 a febrero 1989.

3.1 Material de campo.

3.1.1 Malezas.

Las especies utilizadas para la realización del experimento consideradas como malezas fueron:

Amaranthus spinosus, A. retroflexus, y Parthenium hysterophorus. Las malezas fueron colectadas en el campo agrícola experimental de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. Estas plantas fueron transplantadas a macetas, para así disponer de material vegetal fresco, además se recolectó semillas de todas las especies, para realizar siembras en macetas y en agar, está último bajo condiciones de asepsia.

3.1.2 Frijol.

La especie trabajada fué Phaseolus vulgaris variedad pinto americano, proporcionado por el Proyecto de Mejoramiento de Maíz, Frijol y Sorgo de la F.A.U.A.N.L.

3.2 Material de laboratorio.

El material utilizado fué la cristalería, equipo y reactivos que se encuentran normalmente en todos los laboratorios de cultivo de tejidos (cuadros 1A y 2A).

Material necesario al momento de la siembra: Cajas petri, frascos gerber y agua destilada debidamente esterilizados, a 121°C por 20 minutos. Mechero y frasco con alcohol al 96 % para el flameado de instrumentos. Medio de cultivo estéril e instrumentos de disección ya flameados dentro de la cámara.

3.3 Metodología desarrollada.

3.3.1 Colecta de material vegetal.

Al realizar la colecta en el campo, se evitó la deshidratación del material vegetal, envolviéndolo éste en

papel húmedo y procurando que el material seleccionado fuera joven.

La siembra del material en invernadero se realizó colocando las semillas de cada especie, en macetas para tener más acceso al material de trabajo.

3.3.2 Preparación de medios de cultivo.

En todos los experimentos, el medio básico utilizado fué preparado con sales inorgánicas según, Murashige y Skoog (1962) adicionado de sacarosa 30 g/l, inositol 100 mg /l, 2,4-D 3 mg/l (sólo en algunos tratamientos) y Agar-agar 7 g/l. Este medio fué preparado a partir de soluciones concentradas mantenidas en refrigeración (Cuadro 3A), siguiendo el procedimiento descrito en el Cuadro 4A.

El pH de todos los medios fué ajustado a 5.7 (\pm 0.1) utilizando NaOH 0.1 N y/o HCL 0.1 N. Se distribuyó el medio en frascos de gerber con 25 ml c/u, se cubrieron con tapas de plástico, y posteriormente se esterilizarón en una ollá de presión por 15 minutos a 121°C, y con una presión de 15 lbs/pulg².

3.3.3 Esterilización superficial.

El procedimiento de desinfestación de material vegetativo (tallos) fué muy similar para las cuatro especies iniciando con un lavado en agua corriente, después se segmentaron los tallos y hojas, y se colocaron en alcohol al 96 % por 10 segundos; a las hojas no se les hizo este pre-lavado con alcohol. Posteriormente fueron transferidos a una solución de blanqueador comercial (tallos y hojas) al 10% (cloralex, el cual contiene hipoclorito de sodio al 6%), adicionado de unas gotas de shampoo como surfactante, ésto último se realizó junto a una campana de acrílico conectada a una bomba de vacío con el fin de mejorar la penetración del desinfectante, después de 15 minutos, se retiró el material de la campana y se enjuagó por tres veces con agua destilada estéril y se transfirieron los explantes al medio de cultivo.

En el caso de semillas, el procedimiento fué idéntico al de tallos y hojas, con la modificación de que se sumergieron en agua por 24 horas previo al tratamiento. Se utilizó cloralex más concentrado (15 %) estas fueron germinadas en agua y agar, a excepción de las semillas de frijol, en el cual se utilizó cloralex al 6% .

3.3.4 Excisión, siembra e incubación.

En el caso de material vegetativo (tallos y hojas), ya se describió el procedimiento de siembra. En el caso de semillas germinadas in vitro, fueron fragmentados los hipocótilos de las plantas y transferidos a un medio de cultivo preparado según Murashige y Skoog (1962), adicionado de 3mg/l de 2,4-D, ésta transferencia se realizó bajo condiciones de asepsia, utilizando una cámara de siembra de fabricación casera, en donde se hace filtrar aire normal através de una capa de algodón impregnada de alcohol al 96 % y fenol al 5%, aire que está siendo impulsado por la aspás de un ventilador.

La incubación de todo el material se realizó en cajones de madera de 60 cm de ancho por 70 cm de alto, iluminados por luz fluorescente blanca con intensidad aproximada de 1000 lux y a 25-28°C, y en donde el fotoperíodo fue de 14 hr luz/10 de obscuridad. Estas condiciones se utilizaron para todas las especies, excepto en Parthenium hysterophorus en donde los callos se desarrollaron en obscuridad total.

3.3.5 Descripción de experimentos.

Experimento 1. Inducción de callos de A. spinosus.

Utilizando segmentos de hojas de A. spinosus, se evaluaron tres tamaños de explante: 1, 2 y 3 cm, en dos medios diferentes: Un medio contenía solo los constituyentes de MS y el segundo, igual al anterior pero adicionado de 3mg/l de 2, 4-D. Se evaluó el peso final del callo a los 60 días. A continuación se aprecian los 6 tratamientos, considerando tamaño de los explantes y los medios de cultivo. Estos tratamientos se probaron en 20 repeticiones.

Tratamiento	Explante	Tamaño (cm)	Medio
1	Hoja	1	MS
2	Hoja	1	MS+2,4-D(3mg/l)
3	Hoja	2	MS
4	Hoja	2	MS+2,4-D(3mg/l)
5	Hoja	3	MS
6	Hoja	3	MS+2,4-D(3mg/l)

Experimento 2. Inducción de callos de A. retroflexus.

Apartir de plantas jóvenes de A. retroflexus se evaluó el efecto del tamaño y procedencia del explante. Se establecieron tres tamaños del explante: 1, 2 y 3 cm y dos procedencias: Hoja y tallo, formando seis tratamientos probados en 22 repeticiones. Se usó un medio básico MS adicionado de 3 mg/l de 2,4-D. Y se evaluaron a los 65 días después de la siembra. Registrandose el peso fresco de los callos. A continuación se aprecian los 6 tratamientos considerando tamaño y tipo de explante.

Tratamiento	Explante	Tamaño (cm)	Medio
1	Hoja	1	MS+2,4-D(3mg/l)
2	Hoja	2	MS+2,4-D(3mg/l)
3	Hoja	3	MS+2,4-D(3mg/l)
4	Tallo	1	MS+2,4-D(3mg/l)
5	Tallo	2	MS+2,4-D(3mg/l)
6	Tallo	3	MS+2,4-D(3mg/l)

Experimento 3. Producción de callos de A. spinosus y A. retroflexus, a partir de semilla.

Se pusieron a germinar semillas de A. spinosus y A. retroflexus en agua y agar (durante 60 días) para después fragmentar las plántulas y colocarlas en un medio MS adicionado de 3 mg/l de 2,4-D durante 60 días. A continuación se aprecian los 2 tratamientos probados en 18 repeticiones, considerando las dos especies mencionadas.

Tratamiento	Especie	Medio
1	<u>A. spinosus</u>	MS+2,4-D (3 mg/l)
2	<u>A. retroflexus</u>	MS+2,4-D (3 mg/l)

Experimento 4. Producción de callos de Parthenium hysterophorus.

Se indujo a la producción de callos de P. hysterophorus en un medio MS adicionado de 3 mg/l de 2,4-D con explantes provenientes de segmentos de hoja de tres tamaños (1, 2 y 3 cm) y de tallo de dos tamaños (1 y 2 cm) evaluandose el peso fresco

de los callos a los 70 días en completa oscuridad a continuación se aprecian los 5 tratamientos, considerando tipo y tamaño de explante. Los tratamientos se probaron en 20 repeticiones

Tratamiento	Explante	Tamaño (cm)	Medio
1	Hoja	1	MS+2,4-D(3mg/l)
2	Hoja	2	MS+2,4-D(3mg/l)
3	Hoja	3	MS+2,4-D(3mg/l)
4	Tallo	1	MS+2,4-D(3mg/l)
5	Tallo	2	MS+2,4-D(3mg/l)

Experimento 5. Producción de callos de P. hysterophorus a partir de semillas.

A partir de semillas P. hysterophorus germinadas in vitro, durante 60 días se indujo formación de plántulas en un medio básico (MS), adicionado de 3 mg/l de 2,4-D, a partir de 2 explantes distintos que fueron brotes y raíces. Se midió el peso fresco de los callos obtenidos a los 60 días después de la siembra. Los dos explantes utilizados se establecieron en frascos de gerber, con 15 repeticiones cada uno.

Experimento 6. Bio-ensayo de alelopatía entre callos de A. spinosus y P. vulgaris.

Se comparó el crecimiento de callos de frijol en dos tratamientos, el tratamiento uno consistió de callos creciendo junto a los A. spinosus, y en el tratamiento dos únicamente se tenían callos de frijol. Estos dos tratamientos fueron establecidos en frascos de gerber, con 20 repeticiones cada una, y se evaluó el peso final obtenido de los callos a los 60 días, además de medirse el tamaño de estos. Para la medición del tamaño se consideró el largo y el ancho, y debido a que la forma aparentaba ser una elipse se calculó la superficie de contacto con el medio mediante la fórmula :

$$A = \pi \times a \times b$$

$$A = \text{área}$$

$$a = \text{largo del callo}$$

$$b = \text{ancho del callo}$$

3.3.6 Medición de variables.

En todos los experimentos, el parámetro principal fue el peso fresco de callo (g), sin embargo teniendo como variación la especie, el tamaño y tipo de explante, y el medio de cultivo utilizado en los diferentes experimentos, además se constató la

colocación final de los callos, y se midió la contaminación en términos de porcentaje en cada uno de los experimentos a excepción del experimento 6, en donde además del peso de callo fresco (g), se evaluó el área de los callos. En todos los experimentos se sometieron al análisis de varianza y comparación de medias.

3.3.7 Análisis estadístico.

Todos los experimentos se sometieron al análisis de varianza y comparación de medias, utilizando el paquete diseños experimentales para computadora personal propuesta por (Olivares S, 1992).

El diseño utilizado en todos los experimentos, fué completamente al azar, y cuando se trató de dos factores, se arreglaron estos combinatoriamente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Experimento 1.

En la producción de callos de A. spinosus cabe señalar que esta especie fué la que presentó mayor problema para su establecimiento con la asepsia, por la presencia excesiva de hongos y bacterias. A pesar de ésto, se tuvo 100% de callo caracterizado por su compactación y color blanquesino a café. También se encontró secreción de sustancias al medio de cultivo. La contaminación de callos en esta especie, llegó a ser de hasta un 40% del total y con secreción de sustancias al medio de cultivo.

Se formó callo de A. spinosus en todos los tratamientos. De hecho, los trabajos preliminares aseguraban ésto por lo que se decidió cuantificar éste callo utilizando el peso fresco como variable. El cuadro 5A muestra los resultados originales obtenidos, y el cuadro 6A el análisis de varianza correspondiente.

En los cuadros anteriores se puede observar la gran heterogeneidad entre repeticiones por ejemplo, en el tratamiento uno se tienen callos desde 0.24 g. hasta 2.71 g. aun cuando éste tipo de variación con lleva a un incremento del error aleatorio, lo cual pudo dificultar la detección

estadística de diferencias entre tratamientos, aun cuando en los promedios, ésta sea palpable.

Estas diferencias altamente significativas muestran superioridad de los medios de cultivo con 2,4-D. Esto era de esperarse considerando el papel de éste regulador del crecimiento y el gran número de antecedentes que existen sobre su efecto desdiferenciador tal como lo mencionan Hussey (1980) y Reinart (1977). En relación al tamaño de explante, puede apreciarse claramente que en los dos medios de cultivo se presentó el mismo orden en tamaños de callos, resultando mejor 2 cm, 1cm y finalmente 3 (ver cuadro 7A). Aun cuando algunas de estas comparaciones no son diferentes estadísticamente, la tendencia del promedio de 20 repeticiones es clara, indicando que explantes muy grandes podrían dificultar la inducción de callo pero tampoco se deben de utilizar explantes muy pequeños. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por (Murashige, 1974), en los que menciona que los explantes pequeños, la probabilidad de su sobrevivencia y desarrollo in vitro son muy pobres. Sin embargo; la probabilidad de aislar un tejido limpio, esto es, un explante libre de microorganismos, esta inversamente relacionado con su tamaño, así mayor tamaño, mayor probabilidad hay de contaminación.

4.2 Experimento 2.

Se detectó diferencia altamente significativa entre los tratamientos evaluados para la obtención de callos de A. retroflexus (Cuadro 9A).

El cuadro 10A muestra la comparación de medias de los seis tratamientos. Notese que el tamaño de explante presentó un comportamiento muy similar comparado con el experimento 1 ya que los mejores callos (mayor tamaño) se obtuvieron explantes de 2 cm indistintamente del explante tallo u hoja. Esto podría corroborar el hecho de que los explantes muy pequeños ó muy grandes no son buenos productores de callo, sin embargo también podría atribuirse el gran parentesco entre estas dos especies, ya que ambas pertenecen al mismo género.

Al comparar la procedencia del explante, no se puede observar una superioridad de uno sobre otro, ya que tanto en hoja como en tallo se presentó buena formación de callo. Al utilizar tallo se tuvieron callos más grandes con explantes de 2 cm y 3 cm, pero cuando se utilizaron de 1 cm, la producción de callos en las hojas fué más grande.

Cabe señalar que la interpretación que se hace, está basada solo en el peso del callo y es deseable evaluar también tanto la calidad como la química del callo ya que éste trabajo

va encaminado a síntesis in vitro de sustancias alelopáticas, de cualquier manera, no se tuvieron los parámetros adecuados que permitieran esta evaluación, por tal motivo solo se considero el crecimiento como un proceso fisiológico, y es el que permitirá explicar el efecto del tamaño de explante, la procedencia y en el caso de A. spinosus, la presencia de 2, 4-D. En general, los callos obtenidos fueron compactados y de color blanquesino a café. La contaminación observada y evaluada en porcentaje llevo ser de un 30%.

4.3 Experimento 3.

El cuadro 11A muestra los datos de peso fresco de callo obtenido a partir de explantes que se tomaron de semilla germinada in vitro y el cuadro 12A y 13A contienen en los análisis de varianza y comparación de medias respectivamente.

No se detectó diferencia estadística entre los callos de las dos especies, ya que en promedio los datos son muy similares difiriendo solo en 0.2 g. Esto confirma el gran parentesco que existe entre las dos especies aún en cultivo in vitro, ya que además de pertenecer al mismo género, fenotípicamente son muy parecidas. La contaminación en este experimento en general fué de un 35%, ya que implicó el

trabajar en 2 siembras primero la de semillas, y luego la del explante para la formación de callos.

4.4 Experimento 4.

En el cuadro 14A aparecen los datos de peso fresco (g) medido en los callos de P. hysterophorus.

En la especie estudiada se tuvieron los callos más grandes al utilizar explantes de 2 cm tanto en hoja como en tallo (Cuadro 16A) con una superioridad altamente significativa. Al comparar la procedencia, no se detectó diferencia entre tallo y hoja. Esta similitud entre tallo y hoja se explica por la naturaleza de los tejidos y sobre todo la edad, ya que ambos eran tejidos muy jóvenes y suculentos.

La incubación de los explantes bajo condiciones de obscuridad obedece a experiencias previas, en dónde se observó que al exponerlos a la luz, se oxidaban en un período de tiempo muy corto, además de que no había formación de callo. La explicación probable de esto, es que hubo una inhibición total la regeneración de células in vitro, provocada por luz, en la cual se óxido el tejido. Los callos formados fueron de color café claro a obscuro, y también presentaron secreción al medio. La contaminación presentada en el experimento fué de un 30%.

4.5 Experimento 5.

El peso fresco de los callos obtenidos a partir de brotes y de raíz de P. hysterophorus se observa en el cuadro 17A, y el cuadro 18A muestra el análisis de varianza correspondiente, y no encontró diferencia estadística entre los tratamientos, sin embargo en la comparación de medias cuadro 19A, se aprecia una diferencia entre los tratamientos con una superioridad en formación de callo en el tratamiento uno, lo cual indica que ambos explantes tuvieron capacidad de inducir callosidad, pero los brotes fueron ligeramente superiores, esto puede atribuirse al mayor tamaño del explante en el caso de brotes y sobre todo al mayor grosor comparado con la raicilla. La contaminación presentada en el experimento llegó a ser de un 35%, es un poco superior al anterior por la razón, de que se realizaron dos siembras para la formación de callos.

4.6 Experimento 6.

En el bio-ensayo hecho entre las especies : quelite (A. spinosus) y frijol (P. vulgaris) sembradas juntas T1 y teniendo como testigo el frijol solo T2, se midieron variables como peso fresco de callo y área de callos además se observó la coloración de medios y la contaminación de estos. En el cuadro 20A se aprecian los resultados originales, en el cuadro 21A el

análisis de varianza para peso fresco (g) de callos, en donde se presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0.01$) entre los dos tratamientos. En el cuadro 23A se viene a corroborar esto con la comparación de medias, en donde existió una gran diferencia entre uno y otro tratamiento, y en el cuál podemos afirmar la existencia de alelopatía manifestada por el A. spinosus sobre el frijol P. vulgaris. Ya que la presencia de callos de quelite limitó el crecimiento de callos de frijol. Se consideró que esto no pudo atribuirse a una competencia por espacio, pues el recipiente utilizado fué significativamente grande asegurando una buena disponibilidad de nutrientes.

En los cuadros 22A y 24A se muestra el análisis de varianza y la comparación de medias respectivamente en la variable área de callos, en donde resulta nula la diferencia estadística entre tratamientos, sin embargo si hay diferencia numérica entre las medias de tratamientos, esto se puede atribuir a que los callos de P. vulgaris en el T1, tuvieron una expresión más alta en cuanto a esponjosidad de callo, más que en diámetro o expansión lateral.

En cuanto a la coloración del medio en el T1, fue siempre de un color transparente (original) a un color café claro, y en el testigo T2, fue siempre de un color transparente esto nos da por resultado la clara evidencia en la que la segregación de sustancias al medio (metabolitos) afectó el crecimiento de

callos de frijol (alelopatía), cuando estuvieron juntos con callo de A. spinosus. La contaminación llegó a ser de un 40%, debido a lo anterior solo se evaluó el experimento libre de patógenos, puesto que se desecho el material contaminado.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1) La metodología para la formación de callos en las cuatro especies trabajadas, que fueron A. spinosus, A. retroflexus, P. hysterophorus, y P. vulgaris. Implica las siguientes consideraciones.

a) El tamaño ideal del explante para la producción de callo, en todas las malezas trabajadas fué de 2 cm.

b) Es recomendable la presencia de 2,4-D en los medios de cultivo en una concentración de 3 mg/l, para la inducción de callo.

c) En relación al explante, es indiferente utilizar tallos y hojas para la inducción de callo en las especies de malezas.

d) En relación al ambiente de incubación el Parthenium hysterophorus L fué la única especie que requirió obscuridad total.

2) Amaranthus spinosus presentó las medias de peso fresco de callo in vitro y los porcentajes de contaminación más altas.

3) Al cultivar in vitro en forma conjunta callos de P. vulgaris y A. spinosus (en el mismo medio) se tuvo una influencia negativa en el crecimiento de callos de P. vulgaris.

RECOMENDACIONES.

- 1) Eficientizar la técnica de desinfección, ya que se tuvieron elevados porcentajes de contaminación en todos los casos.
- 2) Continuar trabajando sobre este tema, ya que la información generada hasta el momento es muy escasa.

VI. RESUMEN

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de bio tecnología del departamento de química del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Monterrey, durante el período de marzo 1988 a febrero 1989.

Se utilizarón plantas de frijol (P. vulgaris) variedad: Pinto americano, quelite (A. spinosus, A. retroflexus), y la hierba de amargoso (P. hysterophorus), el medio de cultivo que se utilizó fué el de Murashige y Skoog modificado, con la adición en algunos tratamientos de la hormona 2,4-D en una concentración de 3 mg/l. En total se llevaron a cabo seis experimentos variando de especie, tamaño de explante, procedencia y medio de cultivo. En general el tamaño de explante fué de uno a tres centímetros, con explantes de tallo, hoja y raíz. Todos los explantes con excepción de la semilla, requirieron de una técnica de desinfección muy semejante; donde los tallos de las especies A. spinosus, A. retroflexus y P. hysterophorus. Se desinfectaron sumergiendolos en alcohol al 96% por 10 segundos y posteriormente en cloralex al 10% durante 10 minutos; para las hojas de estas tres especies de malezas y frijol solo se desinfectaron en cloralex usando el mismo tiempo y concentración mencionadas. Las siembras se efectuarón en la cámara de siembra de material acrílico de fabricación casera,

con un flujo de aire accionado con aspas de abanico, provisto de una capa de algodón impregnada de alcohol al 96% y fenol al 5%, para filtrar el aire hacia la zona de siembra.

La incubación se realizó a una temperatura de 25° C a 28°C, con un fotoperíodo de 14 horas, y con una intensidad de 1000 luz. En los experimentos del 1 al 6 hubo formación de callo. En la producción de callos de A. spinosus, el mejor explante fué la hoja con un tamaño de (2cm) usando medio MS+2,4-D (3mg/l), comparando este experimento con el experimento 3, en donde se formó callo a partir de la germinación y crecimiento de semilla, fué más rápido haciendo la siembra directamente del explante joven, ya que este último experimento llevó el doble de tiempo.

En el experimento 2, la formación de callos, de A. retroflexus el mejor tamaño de explante fué de 2 cm, procedente del tallo, sin embargo el explante de hoja también fué bueno, en un medio MS+2,4-D (3mg/l).

En el experimento 4 para P. hysterophorus el tamaño de 2 cm, con explante de hoja fué el que mejor resultado presentó seguido del explante de tallo con el mismo tamaño, comparado con el experimento 5, fué más rápida su formación de callos, ya que en este su duración fué de 120 días.

En el experimento 6 en el bio-ensayo se aprecia marcada inhibición en el crecimiento de callos de P. vulgaris, cuando su crecimiento estuvo acompañado de callos de A. spinosus, esa supresión en el crecimiento permite afirmar la existencia de alelopatía, los callos asociados en el T1, cambiaron la coloración original del medio, de transparente blanquesino a color café claro.

VII. SUMMARY

This job took place in the Biotechnology Laboratory, of Chemistry at the Technological Institute of Superior Studies in Monterrey Campus during the period of March 1988 to February 1989.

Plants utilized were: bean (P. vulgaris) variety, American pinto, Quelite (A. spinosus, A. retroflexus), and the Amargoso herb (P. hysterophorus). The medium of culture that was used was of the Murashige and Skoog modified, with the addition in some of the hormone treatments 2,4-D in a concentration of 3mg/l. In total six experiments took place varying in species, size of explant, extraction and medium of culture. The average of the size of explant was of one to three centimeters, with explants of stem, leave and root. All the explants except for the seed, required of disinfectant technique hery similar; in which the otems of the stems of species A. spinosus, A. retroflexus, and P. hysterophorus were disinfected sumerging them in alcohol at 96% for 10 seconds and subsequently in cloralex using the same time and concentration already mentioned for the leaves to three species of weeds and bean, only disinfected in cloralex using the same time and concentration. The sowing took place in the chamber of sowing of acrylic home made material of domestic production, with a flow operated with fan blades, provided with one laye of impregnated cotton of 96% alcohol phenol at 5%, to filter the air toward the sowing zone.

The incubation was accomplished under a temperature of 25°C to 28°C, with a photo period of 14 hours, and with an intensity of 1000 luxes. In the experiments from 1 to 6 there was in the callus a formation of callus. Production A. spinosus; the best explant was the leaf with a size of (2 cm) using medium MS+2,4-D (3mg/l). Comparing this experiment with the experiment 3, in which callus was formed after the germination and growth of the seed, it was quicker extracting the sow directly of the young explanting, since this last experiment took double its time.

In experiment 2, the callus formations for A. retroflexus the best size of explant was 2 cm coming directly from the stem, however the leave explant was also good in the MS+2,4-D (3 mg/l) conditions.

In experiment 4 (P. hysterothorus) the 2 cm size, with leave explant was the best, followed by the steam explant obtained of the steam (about same size) compared with experiment 5, experiment 4 was of faster on callus formation, because it took 120 days in this one.

In experiment 6. In the biossays we could appreciate a strong inhibition in the callus formation of the P. vulgaris, when the growing process was accompanied by A. spinosus callus, this slow growing motion, suggests the existence of alelopatie, the callus in T1 changed the original coloration of the medium from white crystal clear to a light brown color.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anónimo. (1970). Galeria de malezas Tropicales. Agricultura de las Américas. (12): 58-61.
- 2.- Augé R. et. al. 1982. El cultivo in vitro y sus aplicaciones hortícolas. Técnica y Documentación. Lavoiser. París. 31-33.
- 3.- Barba, A.A. 1987. Cultivo de callos. EN : Hurtado M; D.V. y M.E. Merino. M. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México, D.F.
- 4.- Beelen 1984. Introductory course on in vitro culture. Departament of Tropical Crop Science, Agricultural University, International Agricultural Centre, Wageningen, The Natherlands 84p.
- 5.- Bhowmilk, P.C. 1982 Allelopathy activity of annual weeds on corn (Zea mays) and soybeans (Glycine-max). Weed abstracts 31 (8) N° 2537.
- 6.- Bidwell, R.G.S. 1979. Fisiología Vegetal. 1a. edición. AGT. Edit. pp 461-462. México, D.F.

- 7.- Bowen y Bernard 1988 En: Herbicidas químicos. Agricultura de las américas año 37 N°5 pp. 6
- 8.- Day, P.R. 1980. Tissue culture in plant Breeding In: Ingram D.S. and J. P. helgenson (Eds). Tissue culture methods for plant pathologists. Blackweell scientific publications. Oxford.
- 9.- Dodds, J. H. y Roberts, L.W. 1984. Experiments In plant tissue culture. Cambridge University Press. 1a. Edición. Londres. pp. 99-103.
- 10.- Graue, W.B. 1981. Estudio del potencial inhibidor y alelopático de Helietta parvifolia. Especie del matorral sub-montañoso de Nuevo León, México. Tesis. I.T.E.S.M. pp. 35-38.
- 11.- Harvey, G. J. 1976. Parthenium hysterophorus literature review. Reporte no publicado, Alan Fletcher Research. Station, Sherwood, Qld. pp. 8.
- 12.- Horgan R. 1985. Cytokinins. In: Advanced plant physiology ed. M.B. wilkins Pitman press, pp. 53-55.

- 13.- Hussey, G. 1980. In vitro propagation In: Ingram, D.S. and J.P. Helgenson (eds). Tissue culture methods for plant pathologists. Blackweel Scientific Publications. Oxford. pp. 121-125.
- 14.- Loyola V.W. y Reyes, L.J. 1985. El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales En: El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT. pp. 41-50.
- 15.- Merino, M. y Hurtado. 1987. Técnicas de esterilización y manipulaciones ascépticas. En: Hurtado N; D.V. y M. E. Merino. M. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, D.F.
- 16.- Mitchell, C. J. y otros. 1977. Biology and Chemistry of Parthenium hysterophorus a problem weed in India Journal of science and Industrial Research 36.
- 17.- Munger, P.H., Bernathy, A.J.R; and Gipson, J.R. 1986 Influence of selected residues on cotton and sorghum. Weed abstracts. 35 (11) Nº 4056.
- 18.- Muniyappa, T.V. and Krishnamurthy, R. 1982. Biology of Parthenium hysterophorus. Linn and its allelopathic

effects on succeeding crops. Weed abstracts. 32 (1-2)
Nº 3415.

- 19.- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Phys. 25: 135-150.
- 20.- Murashige, T. 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. Bot - Bull of Academia Science. 18: 1-15.
- 21.- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physil. Plant. 15:473-497.
- 22.- Olivares Sáenz, Emilio 1992. Paquetes de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.2 Facultad de Agronomía U.A.N.L. Marín, N.L.
- 23.- Reinart, J. and P.S. Bajaj. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer - Verlag, N.Y. Inc. 1a. Ed. pp. 581-600.
- 24.- Rice 1984 Allelopathy. Ed. Academy Press Inc. Norman Oklahoma, U.S.A. pp. 170-190.

- 25.- Robbins 1969 Destrucción de malas hierbas. Editorial UTEHA. pp. 51-57.
- 26.- Rojas, G.M. 1972. New growth inhibitors from Pathenium hysterothorus. Weed Abstracts 23 (II), 2658.
- 27.- Rojas, G. M. y M. Rovalo. 1984. Fisiología vegetal aplicada. 3a. Edición. Editorial Mc. Graw Hill.
- 28.- Sánchez de J. E. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en la investigación básica. En: Robert, M.L. y V.M. Loyola (comp). El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT. México, D.F.
- 29.- Schwenke, J; Schneider, J; and Guenther, G. 1983 Chemical Abstracts. 101 # 87526 b.
- 30.- Street, H. E. 1974. Tissue culture and plant science. 1a. ed. Academic Press Inc. USA. PP. 19, 71, 287, 301.
- 31.- Villalobos, A. 1985. Fundamentos teórico - práctico de cultivo de tejidos vegetales. Colegio de Postgraduados de Chapingo, México. pp. 2-7, 32, 41.

- 32.- Weaver, R.J. 1982. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. 1a. ed. Trillas, S. A. México. pp. 20, 102-106, 123.
- 33.- Wickham, K. Rodríguez, E. y Arditt, J. 1980. Comparative phytochemistry of P. hysterophorus (compositae) tissue culture. Chemical Abstracts. Vol. 94. 1981. # 99830 w.
- 34.- Wilkins, M. B. 1985. Advanced Plant Physiology. Pitman Press. pp. 52-54.

IX. APENDICE

CUADRO 1A. Equipo y material de cristalería utilizado en la realización de los experimentos.

Equipo:	Balanza granataria	Mechero de Bunsen
	Balanza analítica	Gasas
	Potenciómetro	Algodón
	Refrigerador	Papel secante
	Destilador	Alcohol al 96%
	Agitador magnético	Cloralex al 6% y 15%
	Magnetos	Balastras
	Filtros milipore	Vasijas de plástico
	Termómetro	Ollá de presión
	Picetas	Detergente
	Bomba de vacío	Papel aluminio
	Cámara de siembra	Lavabo
	Estuche de disección	

Material de cristalería: Frascos de gerber
Tapas de plástico
Frascos ambar
Tapones para tubos de ensaye
Matraces Erlenmeyer
Matraces aforados
Goteros
Probetas
Vasos de precipitado
Cajas petri

CUADRO 2A. Reactivos utilizados en la preparación de los medios de cultivo.

Nitrato de amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$)

Nitrato de potasio (KNO_3)

Cloruro de Calcio (CaCl_2)

Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Fosfato de potasio dibásico ($\text{K}_2 \text{HPO}_4$)

Fosfato de sodio (NaH_2PO_4)

Acido bórico (H_3BO_3)

Sal disódica del ácido etilén-diamino-tetracético
(NaEDTA)

Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Molibdato de sodio ($\text{Na}_2 \text{MoO}_4$)

Sulfato de zinc (ZnSO_4)

Cloruro de cobalto (CoCl_2)

Yoduro de potasio (KI)

Hidróxido de sodio (NaOH)

Acido clorhídrico (HCL)

Solución buffer pH 4.5

Sacarosa

Tiamina, Glicina

Acido nicotínico

Agar-agar ó Gel-rite

Hormona: Auxina: 2,4-D(Acido 2,4-diclorofenoxiacético)

Inositol

CUADRO 3A. Proporciones y sustancias para elaborar las soluciones stock del medio del cultivo Murashige-Skoog (MS) enriquecido, para tejidos vegetales (Murashige, T. and F.Skoog. 1962).

Solución	Peso
<u>Solución A 100 x 50 ml</u> Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22.00 (g)
<u>Solución B</u> Nitrato de Potasio KNO_3	1.9 (g)
Nitrato de amonio NH_4NO_3	1.65 (g)
<u>Solución C 100 x 50 ml</u> Yoduro de potasio KI	41.5 (mg)
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.25 (mg)
<u>Solución D 40 x 50 ml</u> Fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4	3.4 (g)
Acido bórico H_3BO_3	0.124 (g)
Molibdato de sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.0 (mg)
<u>Solución E 40 x 50 ml</u> Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4 (g)
Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.446 (g)
Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.172 (g)
Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5 (mg)
<u>Solución F 200 x 100 ml</u> Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.557 (g)
EDTA disódico Na_2EDTA	0.745 (g)
<u>Solución G 100 x 250 ml</u> Glicina	50 (mg)
Piridoxina.HCl	12.5 (mg)
Acido nicotínico	12.5 (mg)
Tiamina	2.5 (mg)
Inositol	2.5 (g)

CUADRO 4A. Pasos sucesivos para elaborar un litro de medio de cultivo MS a partir de las soluciones stock.

PASOS	COMPONENTE A AGREGAR	CANTIDAD
1	Solución A	1.0 ml
2	Solución B	1.9 g
	KNO_3	1.65 g
	NH_4NO_3	
3	Solución C	1.0 ml
4	Solución D	2.5 ml
5	Solución E	2.5 ml
6	Solución F	5.0 ml
7	Solución G	10.0 ml
8	Sacarosa	30.0 g
9	Hormonas	varia
10	H ₂ O destilada	aforar a 950 ml
11	Ajustar a un pH de 5.7	aforar a 1 lt
12	Gel rite	2.0 g

CUADRO 5A. Peso fresco de callos de A. spinosus (g) provenientes de explantes de tres tamaños en dos medios de cultivo, a los 60 días después de la siembra.

Repetición	TAMAÑO DE EXPLANTE (cm)					
	1 cm.		2 cm.		3 cm.	
	A	B	A	B	A	B
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
1	0.51	1.55	0.74	3.51	0.33	2.91
2	1.03	5.24	1.23	5.33	1.88	4.24
3	1.72	0.95	2.11	2.14	0.21	0.95
4	2.71	2.56	1.73	1.58	2.13	3.89
5	2.50	3.29	0.44	0.95	0.47	5.14
6	0.61	7.22	1.37	7.77	0.91	1.24
7	0.83	0.69	1.59	3.81	1.25	2.32
8	2.22	4.34	1.17	9.24	1.86	3.47
9	0.24	8.53	1.28	12.31	0.54	4.31
10	0.75	6.12	0.89	15.41	1.15	2.81
11	1.27	8.24	2.91	6.52	1.31	3.21
12	1.92	5.36	2.72	3.66	1.57	0.72
13	0.74	3.67	0.69	4.33	2.17	1.17
14	0.33	1.88	0.95	2.22	1.29	6.17
15	1.73	2.94	2.55	13.21	0.76	5.13
16	0.24	3.41	2.71	16.41	1.22	2.19
17	0.83	2.95	1.89	8.77	1.94	0.74
18	2.31	1.34	1.27	1.81	0.87	2.24
19	1.95	5.44	0.77	5.11	0.68	4.59
20	1.81	4.91	1.31	3.79	0.58	9.41

Nota: A: MS

B: MS+2,4-D (3mg/l)

CUADRO 6A. Análisis de varianza para la variable peso fresco (g) de callos de A. spinosus cultivados a diferentes tamaños de explante y en diferentes medios.

<u>F.V.</u>	<u>G.L.</u>	<u>S.C.</u>	<u>C.M.</u>	<u>F.Cal.</u>	<u>P>F</u>
Tratamientos	5	422.81035	84.562210	14.9593	0.000
Error	114	644.41967	5.652804		
Total	119	1067.23071			

C.V. 80.3570 %

CUADRO 7A. Comparación de medias de tratamiento (medios de cultivo y tamaños de explante) callos de A. spinosus.

<u>Tamaño de explante</u>	<u>Medio</u>	<u>Peso fresco del callo</u>	<u>DMS</u>
2 cm.	MS+3 mg/l 2,4-D	6.3940	A
1 cm.	MS+3 mg/l 2,4-D	4.0315	B
3 cm.	MS+3 mg/l 2,4-D	3.3425	B
2 cm.	MS	1.5160	C
1 cm.	MS	1.3125	C
3 cm.	MS	1.1560	C
DMS: 1.4872		a: 0.05	

CUADRO 8A. Peso fresco de callos A. retroflexus provenientes de explantes de hoja y tallo de tres tamaños.

Repetición	Hoja tamaño (cm)			Tallo tamaño (cm)		
	1	2	3	1	2	3
1	1.12	2.14	0.85	1.12	1.95	1.71
2	0.65	0.98	1.25	0.81	0.79	0.88
3	2.27	1.75	2.17	2.17	2.99	1.44
4	1.75	4.23	1.91	1.22	5.44	3.22
5	3.21	1.81	0.76	0.77	7.22	2.91
6	4.24	2.75	2.43	0.95	4.24	0.77
7	0.88	3.43	1.74	1.72	1.17	0.88
8	0.65	4.21	3.42	2.11	1.24	1.91
9	1.81	6.41	0.91	0.62	2.19	2.18
10	5.21	1.71	3.48	1.17	0.71	5.13
11	3.12	0.77	2.52	0.71	9.44	2.39
12	0.59	3.15	0.93	1.20	5.22	1.27
13	2.11	5.21	1.81	2.18	1.21	3.24
14	3.44	7.21	0.65	1.91	2.13	2.47
15	0.90	3.47	2.21	1.78	0.79	1.89
16	1.41	0.55	1.19	0.79	2.18	1.71
17	1.23	4.14	0.87	0.81	1.21	0.94
18	0.67	2.21	2.33	1.95	8.23	2.17
19	1.41	0.87	0.67	0.73	1.43	3.24
20	0.84	2.19	1.44	1.18	2.19	0.91
21	1.21	3.94	1.15	0.91	3.21	1.22
22	1.17	0.89	0.89	2.13	2.18	2.71

NOTA: El medio de cultivo de todos los tratamientos fué de MS+2,4-D (3mg/l).

CUADRO 9A Análisis de varianza en callos de A. retroflexus (procedencia y tamaño de explante).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T.
Tratamiento	5	55.201965	11.040393	4.8930	0.0001
Error	126	284.301880	2.256364		
Total	131	339.503845			

C.V. = 70.5672%

CUADRO 10A Comparación de medias de tratamientos (procedencia y tamaño de explante) en callos de A. retroflexus.

Tratamiento	Procedencia de explante	Tamaño	Callo (peso fresco gr)	
5	tallo	2 cm	3.0618	A
2	hoja	2 cm	2.9100	AB
6	tallo	3 cm	2.0541	BC
1	hoja	1 cm	1.8132	C
3	hoja	3 cm	1.6173	C
4	tallo	1 cm	1.3155	C

D.M.S. = 0.8877 A un nivel de significancia del 5%

CUADRO 11A Producción de callos de A. retroflexus y A. spinosus, a partir de explantes provenientes de semilla germinada in vitro.

Repetición	Peso fresco (g)	
	<u>A. spinosus</u>	<u>A. retroflexus</u>
1	1.51	0.81
2	3.47	1.78
3	1.23	0.75
4	0.54	1.81
5	0.47	2.18
6	1.92	1.72
7	1.27	0.85
8	1.41	0.79
9	0.66	2.41
10	0.29	3.19
11	1.79	1.47
12	2.12	0.68
13	1.33	3.23
14	0.83	0.71
15	1.17	1.99
16	1.87	1.21
17	0.89	0.61
18	1.71	1.82

CUADRO 12A Análisis de varianza para la variable peso fresco (g) de callo de A. spinosus y A. retroflexus.

F.V.	GL	SC	CM	FC	P>F
Tratamientos	1	0.348083	0.348083	0.5533	0.531
Error	34	21.389412	0.629100		
Total	35	21.737495			

C.V. = 54.3880%

CUADRO 13A Comparación de medias de tratamientos, en callos de A. spinosus y A. retroflexus.

Tratamiento	Especie	Media	
1	<u>A. spinosus</u>	1.34700	A
2	<u>A. retroflexus</u>	1.556666	B

DMS = 0.0000

AL 5%

CUADRO 14A Peso fresco (g) de la producción de callos de P. hysterophorus, en un medio MS+2,4-D (3mg/l) con explantes provenientes de segmentos de hoja de tres tamaños y de tallo de dos tamaños, durante 70 días, en completa obscuridad.

Repetición	Hoja			Tallo	
	1 (cm)	2 (cm)	3 (cm)	1 (cm)	2 (cm)
1	2.14	4.21	0.88	0.72	1.52
2	0.67	1.71	1.62	1.24	2.43
3	3.19	5.21	3.22	1.55	3.17
4	2.11	7.24	1.99	1.92	1.24
5	3.22	10.17	2.18	2.14	2.15
6	2.19	2.04	0.89	0.51	1.52
7	0.71	0.51	0.81	1.22	2.11
8	0.92	1.92	1.33	0.52	3.21
9	1.21	3.42	3.19	2.17	1.91
10	0.71	2.57	3.34	1.95	2.10
11	3.24	1.96	0.94	0.56	6.41
12	4.21	4.04	0.35	1.31	1.21
13	1.21	3.23	0.50	0.88	0.85
14	3.21	1.66	2.11	0.92	2.23
15	0.77	1.25	1.81	2.11	6.11
16	1.20	0.88	0.72	1.44	2.34
17	0.72	1.41	1.31	1.92	2.14
18	0.92	1.38	1.85	1.77	1.98
19	1.24	4.44	3.21	1.12	2.25
20	0.71	5.20	0.85	1.24	1.25

CUADRO 15A Análisis de varianza para la variable peso fresco (g) de callos P. hysterophorus, cultivados a diferentes tamaños de explante.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	46.973572	11.743393	5.8014	0.001
Error	95	192.303040	2.024243		
Total	99	239.276611			

C.V. = 68.3066

CUADRO 16A Comparación de medias de tratamientos (procedencia y tamaño de explante), de callos de P. hysterophorus.

Tratamiento	<u>Explante</u>		<u>Callo</u>	
	Procedencia	Tamaño(cm)	Peso fresco (g)	
2	Hoja	2	3.2695	A
5	Tallo	2	2.4065	AB
1	Hoja	1	1.7250	BC
3	Hoja	3	1.6550	BC
4	Tallo	1	1.3585	C

DMS = 0.8897 AL= 5%

CUADRO 17A Producción de callos (g) a partir de plántulas y raíz obtenidas por semilla germinada in vitro en medio MS+2,4-D (3mg/l) a los 60 días de la siembra.

Repetición	Plántulas	Raíz
1	0.77	1.55
2	1.25	1.21
3	2.11	0.89
4	0.81	0.95
5	1.91	1.21
6	0.51	0.88
7	0.77	1.57
8	0.89	1.25
9	1.22	1.11
10	2.17	1.17
11	1.24	0.57
12	0.75	0.82
13	1.21	/
14	2.27	/
15	1.19	/

CUADRO 18A Análisis de varianza para la variable peso fresco (g) de callo de P. hysterothorus, provenientes de segmentos de plántulas y de raíz.

F.V.	GL	SC	CM	FC	P>F
Tratamientos	1	0.199532	0.199532	0.8920	0.644
Error	25	5.592350	0.223694		
Total	26	5.791882			

C.V. = 39.5969 %

CUADRO 19A Comparación de medias para la variable peso fresco (g) de callo de P. hysterothorus, provenientes de segmentos de plántulas y de raíz.

Tratamiento	Explante	Repeticiones	Media	
1	Plántula	15	1.27133	A
2	Raíz	12	1.09833	A

DMS = 0.2110

AL 5%

CUADRO 20A Peso y área de callos de A. spinosus y P. vulgaris establecidos juntos T1 e individuales T2.

Repetición	Callos juntos(T1)				Callos individuales(T2)	
	<u>A. spinosus</u>		<u>P. vulgaris</u>		<u>P. vulgaris</u>	
	Peso (g)	Area (cm ²)	Peso (g)	Area (cm ²)	Peso (g)	Area (cm ²)
1	1.54	14.13	0.92	11.78	3.83	9.42
2	3.03	28.27	1.89	18.85	3.59	14.13
3	2.28	18.85	1.35	11.78	4.2	6.28
4	1.97	18.85	1.68	14.18	3.7	25.13
5	3.28	28.27	2.89	27.48	3.23	18.84
6	1.61	9.42	1.25	9.42	3.74	25.13
7	1.88	9.42	1.29	16.49	4.9	31.42
8	2.29	31.42	1.02	7.85	4.04	9.42
9	1.82	23.56	1.85	18.85	4.17	18.85
10	17.16	113.09	1.83	6.28	4.34	37.70
11	13.50	75.40	2.27	9.42	1.03	6.28
12	17.76	94.25	1.70	9.42	2.07	9.42
13	1.94	25.13	1.23	14.13	2.35	6.28
14	3.09	23.56	1.63	7.85	4.09	4.71
15	2.50	31.42	1.57	15.71	6.12	9.42
16	13.58	78.60	1.43	14.13	6.25	37.70
17	9.1	25.13	2.06	7.85	3.17	12.56
18	10.11	18.85	1.73	9.42	6.01	18.85
19	7.36	31.42	1.60	18.85	5.37	4.71
20	10.69	25.13	1.66	9.42	2.07	6.28

CUADRO 21A Análisis de varianza para la variable peso fresco (g), en callos de P. vulgaris, provenientes del bio-ensayo y el testigo.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	51.574463	51.574463	48.1171	0.000
Error	38	40.730377	1.071852		
Total	39	92.304840			

C.V. = 37.2679 %

CUADRO 22A Análisis de varianza para la variable área (cm²), en callos de P. vulgaris, provenientes del bio-ensayo y el testigo.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	71.31	71.3125	0.9982	0.675
Error	38	2714.85	71.4434		
Total	39	2786.16			

C.V. = 59.1544%

CUADRO 23A Comparación de medias para la variable peso fresco(g) de callos, de P. vulgaris provenientes del bio-ensayo y el testigo.

Tratamiento	Media
2	3.9135 A
1	1.6425 B

DMS = 0.6636 A un nivel de significancia del 5%.

CUADRO 24A Comparación de medias para la variable área, de cm² callos de P. vulgaris provenientes del bio-ensayo y el testigo.

Tratamiento	Media
2	15.6239 A
1	12.9535 A

DMS = 5.4131 A un nivel de significancia del 5%

