

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS

**GENERACIÓN DE CALLOS POR CULTIVO IN-VITRO
DE *Lupinus Mutabilis* Sweet (tarwi) A PARTIR DE
HIPOCOTILOS ENCONTRANDO LA CONCENTRACION
OPTIMA DE UNA
COMBINACIÓN DE FITOHORMONAS**

ELABORADO POR:

Univ. KATTIA SHIRLEY AVERANGA CONDE

(TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA)

LA PAZ – BOLIVIA
2011

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS**

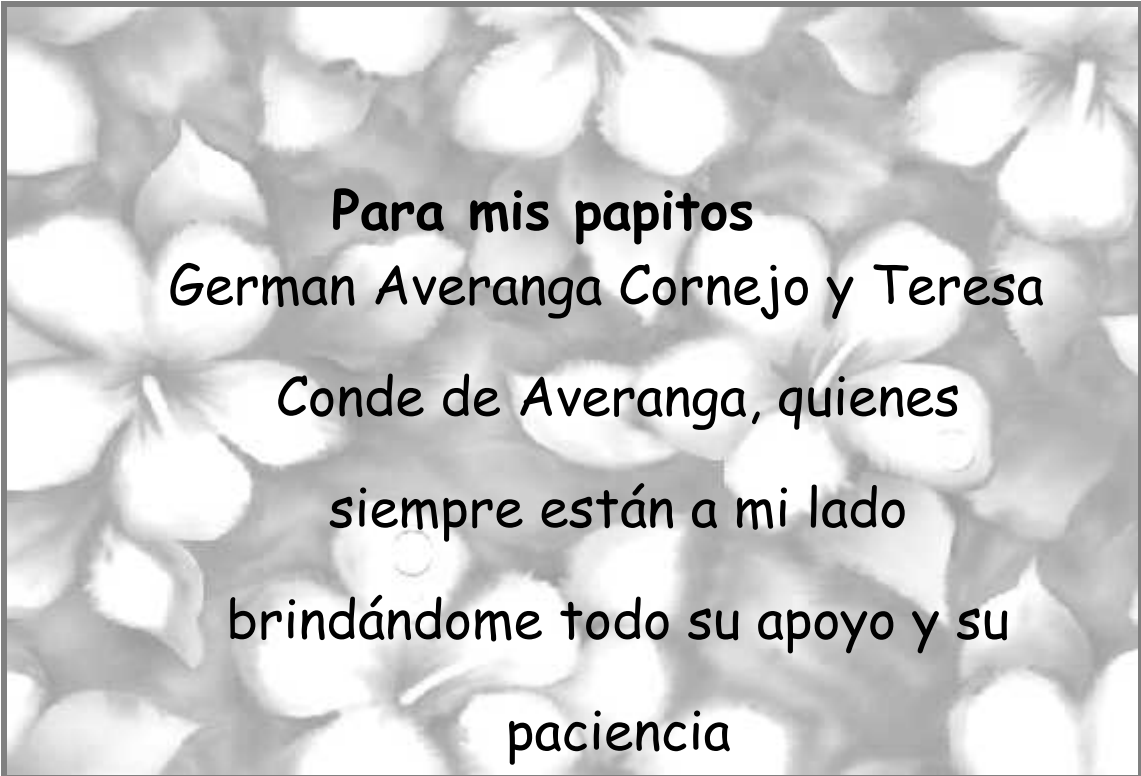
**GENERACIÓN DE CALLOS POR CULTIVO IN-VITRO
DE *Lupinus Mutabilis* Sweet (tarwi) A PARTIR DE HIPOCOTILOS
ENCONTRANDO LA CONCENTRACION OPTIMA DE UNA
COMBINACIÓN DE FITOHORMONAS**

ELABORADO POR: Univ. KATTIA SHIRLEY AVERANGA CONDE

**ASESORES: Luis Enrique Terrazas Siles Ph D.
Lic. Irma Mamani Urquizo**

(TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA)

**LA PAZ – BOLIVIA
2011**



Para mis papitos
German Averanga Cornejo y Teresa
Conde de Averanga, quienes
siempre están a mi lado
brindándome todo su apoyo y su
paciencia

AGRADECIMIENTOS

CB A Dios por haber iluminado mi camino todo este tiempo y por ayudarme a tomar decisiones correctas, por haber puesto en mi corazón esperanza, alegría y tranquilidad, por dejarme ver un nuevo amanecer.

CB A mis tutores Luis Enrique Terrazas Siles Ph D. y a la Lic. Irma Mamani Urquizo, quienes me brindaron todo su apoyo y su conocimiento, a ellos mi eterna gratitud por permitirme realizar el trabajo en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas en el área de Biotecnología Vegetal.

CB A mis hermanos Juan José, Maria del Pilar y Elvia Misao, por apoyarme y darme la fortaleza para seguir adelante, los quiero mucho hermanitos.

CB A mis amigos del IIFB, Boris Espinoza, Christian Espinal, Oscar Cárdenas, Irma Mamani Urquizo, con quienes compartí momentos inolvidables y siempre me brindaron su apoyo, su paciencia y su amistad sincera durante todo el tiempo que estuve en el instituto, a todos ellos mis mas sinceros agradecimientos ya que son el regalo mas maravilloso que Dios puso en mi camino.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1 LAS LEGUMINOSAS.....	5
2.1.1 EL "Lupinus mutabilis "	6
2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	7
2.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL tarwi	8
2.3.1 Etapa de germinación.....	8
2.4 CULTIVO DEL tarwi EN BOLIVIA.....	11
2.5 IMPORTANCIA DEL tarwi.....	11
2.6 USOS DEL tarwi.....	12
2.7 CULTIVO IN-VITRO (generación de callos).....	12
2.7.1 Principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo in vitro.....	14
2.7.2 Etapas del Proceso de Micropropagación.....	14
2.8 FITOHORMONAS.....	16
2.8.1 AUXINAS.....	17
2.8.1.1 Características de las auxinas.....	18
2.8.2 CITOCINAS.....	19
III. JUSTIFICACION.....	21
IV. OBJETIVOS.....	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICO	
V. METODOLOGIA.....	24
5.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	25
5.1.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	26
5.2 MÉTODO DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS DE TARWI.....	28
5.3 MÉTODO DE DESINFECCIÓN Y SEMBRADO DE OTRAS SEMILLAS.....	29

5.4 SEMBRADO DE LAS SEMILLAS	29
5.5 EMBRIOGENESIS SOMÁTICA (GENERACIÓN DE CALLOS.....	30
5.5.1 Soluciones de fitohormonas.....	30
5.6 MEDIO DE CULTIVO CON HORMONAS.....	31
5.7 SEMBRADO DE LOS HIPOCOTILOS.....	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
6.1 MEDIOS DE CULTIVO.....	35
6.2 SEMILLAS.....	36
6.3 DESINFECCIÓN Y SEMBRADO DE OTRAS SEMILLAS.....	36
6.4 GERMINACION Y GENERACIÓN DE VITRO-PLANTAS.....	37
6.5 SEMBRADO DE LOS HIPOCOTILOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO CON VARIACIÓN DE LAS FITOHORMONAS.....	42
6.6 GENERACION DE LOS CALLOS DE tarwi.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	52
VIII. RECOMENDACIONES.....	53

TABLA DE FIGURAS

FIGURA Nº1.	Componentes de una planta de <i>Lupinus mutabilis</i>	8
FIGURA Nº2.	Descripción del efecto de las hormonas sobre las plantas	17
FIGURA Nº3.	Clasificación genérica de las auxinas	18
FIGURA Nº4.	Clasificación genérica de las citocinas	20
FIGURA Nº5.	Material requerido para la preparación del medio de cultivo. IIFB (2010)	25
FIGURA Nº6.	Imagen de los reactivos empleados y las soluciones preparadas a diferentes concentraciones. IIFB (2010)	26
FIGURA Nº7.	Imagen de las hormonas empleadas y las soluciones preparadas. IIFB (2010).	31
FIGURA Nº8.	Material esterilizado irradiado con luz UV, en campana de Flujo laminar. IIFB (2010)	33
FIGURA Nº9.	Imagen del material empleado para el sembrado de los hipocotilos en los diferentes tubos que contienen variación en la concentración de hormonas . IIFB (2010).	34
FIGURA Nº10.	Imagen del material ya sembrado con los cortes de los hipocotilos en los diferentes tubos que contienen variación en la concentración de hormonas. IIFB (2010).	35
FIGURA Nº11.	Imagen de los hipocotilos libres de contaminación listos para el corte y sembrado en los tubos que contienen variación en la concentración de hormonas. IIFB (2010).	38
FIGURA Nº12.	Imagen de una semilla sufriendo el proceso de necrosis. IIFB (2010).	39
FIGURA Nº13.	Hipocotilos después de haberlos cambiado de medio de cultivo. IIFB (2010).	40
FIGURA Nº14.	Germinación de semillas de tarwi: 1:17/05/2010, 2: 10/06/2010, 3: 25/06/2010, 4: 15/07/2010, 5: 22/07/2010, 6: 03/08/2010, 7: 13/08/2010, 8: 18/08/2010. IIFB (2010).	41
FIGURA Nº15.	Imagen de la generación de las vitro-plantas, después de tres semanas de germinación. IIFB (2010).	42

FIGURA N°16.	Imagen de la generación de las vitro-plantas, después de cinco semanas. IIFB (2010).	42
FIGURA N°17.	Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación ANA/KIN en todas las concentraciones. IIFB (2010)	44
FIGURA N°18.	Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación 2.4D/BAP en todas las concentraciones. IIFB (2010).	44
FIGURA N°19.	Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación ANA/BAP en todas las concentraciones. IIFB (2010).	45
FIGURA N°20.	Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación 2,4D/KIN en todas las concentraciones. IIFB (2010).	46
FIGURA N°21.	Imagen de la generación de callos de la séptima semana de las combinaciones ANA/KIN en las concentraciones de 0.1/5, 1/1 y 1/0.5 en placas Petri. IIFB (2010).	46
FIGURA N°22.	CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS ANA/KIN A DISTINTAS CONCENTRACIONES	48
FIGURA N°23.	CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS 2,4D/BAP A DISTINTAS CONCENTRACIONES	49
FIGURA N°24.	CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS ANA/BAP A DISTINTAS CONCENTRACIONES	49
FIGURA N°25.	CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS 2,4D/KIN A DISTINTAS CONCENTRACIONES	50

RESUMEN.

El presente trabajo tiene como objetivo generar callos por cultivo in-vitro de tarwi a partir de hipocotilos en etapa de crecimiento encontrando la combinación óptima a distintas concentraciones, de fitohormonas como las citoquinas y las auxinas. La parte experimental se la realizó en el Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, ubicado en la ciudad de La Paz-Bolivia. Se utilizaron semillas de tarwi traídas del cantón de Puerto Mayor Carabuco, capital de la 3ra sección Municipal de la provincia Camacho del Departamento de La Paz ubicado a 170Km. Primero se realizó la asepsia y la germinación de estas semillas para luego sembrarlas en distintos sistemas del medio de cultivo Murashige-Skoog (caldo o sólido), por cada frasco se colocaron de 5-6 semillas, llevándolas a la cámara de aclimatación con fotoperíodo una vez germinadas se fueron cambiando de medio de cultivo para la generación de vitro-plantas. Se prepararon medios de cultivo Murashige-Skoog sólido a distintas concentraciones y combinaciones de fitohormonas en tubos de vidrio para la obtención de callos y se plaquearon en forma de pico de flauta, se sembraron hipocotilos de las semillas que germinaron que median aproximadamente entre 3 a 4.5cm de alto. Por cada prueba se realizaron 25 repeticiones, todos los tubos se los guardo en un conservador y fueron llevados a la cámara de aclimatación por siete semanas. Se realizaron los controles de crecimiento desde la tercera semana para observar si había generación de callos y en cual combinación y a que concentración tenía un mayor porcentaje de transformación.

I. INTRODUCCION:

Las leguminosas comprenden de 300 a 400 especies, estando los más importantes situados en la región Mediterránea de Europa y en la región Andina en Sud América. En nuestro país se la conoce con el nombre de tarwi, es una planta que se caracteriza por tolerar bajas temperaturas y además que tiene un alto valor nutritivo incluso mayor que la soya.¹

Esta es una planta anual, de altura determinada por el eje principal que varía entre 0,5 m a 2 m, es generalmente muy leñoso. Según el tipo de ramificación puede ser: de eje central predominante, con ramas desde la mitad de la planta o con ramas terminales, con inflorescencia a la misma altura, el número de ramas es variable. Las hojas son digitadas, generalmente compuestas por 8 folíolos de forma ovalada a lanceolada. Las flores son de color azul, que puede cambiar a blanco y rosado, con inflorescencia en forma de espiga. Los frutos se encuentran en vainas o legumbres de 5 cm a 12 cm de longitud, conteniendo un número variable de semillas estas son de 0.5 cm a 1.5 cm de diámetro y 0.2 g – 0.3 g de peso, recubiertas por un tegumento endurecido, tienen una forma variada, redonda, ovalada o ligeramente cuadrada. De colores diversos: blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón y combinados. La raíz es pivotante, vitorosa, de hasta 3 m de profundidad, con nódulos de variados tamaños (1 cm - 3 cm de diámetro), formados por un proceso de simbiosis con bacterias nitrogenantes (*Rhizobium sp.*).² Tiene mucha importancia en lo que se refiere a la preservación de la fertilidad de los suelos mediante la fijación del nitrógeno, su incorporación a la tierra como abono verde, este a su vez sirve para incrementar la producción de papa, genera mayor retención de humedad para la reestructuración de los suelos. También estudios realizados sobre esta leguminosa, han

¹ Emilia Santa Cruz R, Rafael Q, Liberato P. M. Propagación y regeneración in vitro de *Lupinus stipulatus* J. Agardh (LEGUMINOSAE), Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara., APDP. Potal 1-139 e-mail:srm30547@maiz.cucba.udg.mx.

² Ilse Kr, Diana C, James C, Benhard G, Sojue S. "Plantas en la Cultura Andina", Descripción – Medicina- Alimentación- Cultura.- CEDEPAS 2000- Ayacucho, Huancayo-Perú.(533).

demostrado que tiene un efecto biocida en el control de ectoparásitos (garrapatas) y parásitos intestinales en los animales.^{3,4} actividad atribuida a las fitohormonas.

Una fitohormona, es un compuesto orgánico sintetizado en un lugar de la planta que en concentraciones muy bajas, produce una respuesta fisiológica celular, que regula el crecimiento, el desarrollo, la especialización de los tejidos y los ciclos de reproducción. Esta se caracteriza por ser un mensajero químico vegetal secretado en un determinado tejido y que puede actuar en el mismo tejido, o en otro distinto de la planta, considerándoselas como biocatalizadores junto con enzimas y vitaminas. Las hormonas vegetales o fitohormonas se clasifican en:

- a) Auxinas
- b) Citoquininas
- c) Giberelinas
- d) Ácido abscísico
- e) Etileno
- f) Brasinoesteroides

Cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación del crecimiento en plantas, posee su propia estructura y pueden ser activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta. Las auxinas como el 2,4-diclorofenoxiacético es una fitohormona bastante fuerte y tóxica a concentraciones elevadas, siendo un potente activador de la actividad meristemática, muchas veces ligado a citoquininas en trabajos de cultivos celulares. Las citoquinas estimulan la división celular (cariocinesis) en cultivo de tejidos vegetales y tienen un efecto sinérgico al actuar con las auxinas.⁵

³ Mario Enriquez R. El potencial del "tarwi", CIPCA La Paz (No. 70), 25 de octubre de 2004.

⁴ Producción con Potencial Exportador, TARWI, ¡EXPORTEMOS!, Cámara Nacional de Exportadores de Bolivia, Publicación mensual, N°31–Año 4, Marzo de 2009, <http://www.caneb.org.bo/publicaciones.html?lang=es>.

⁵ Lallana, V.H, Lallana, Ma. del C. Manual de Practicas de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias – UNER, 2001.

El estudio de la influencia morfológica de las fitohormonas sobre callos de tarwi, es de gran importancia científica, debido a que se pueden emplear los callos para el estudio, de fermentos producidos por hongos, extractos de plantas y combinaciones hormonales con el objeto de analizar la influencia de estos sobre los callos, también nos permite realizar una serie de pruebas con distintos métodos analíticos. Es en tal razón que el presente trabajo se pretende: Determinar la concentración adecuada de una combinación de fitohormonas, para la generación de callos de tarwi partiendo de la germinación de las semillas libres de contaminación, generando plantas in vitro y obteniendo callos de tarwi.

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA:

2.1 LAS LEGUMINOSAS:

Se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, constituyen una de las más extensas familias del reino vegetal jugando un papel importante en la agricultura y en la fertilidad de los suelos, constituyen el tercer grupo de plantas con flor más grande con más de 19,000 especies distribuidas en 750 géneros. Se distinguen por su simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* y con otros organismos íter cambiantes de nitrógeno. Por su amplia adaptabilidad en lo que al clima y suelo se refiere, es posible encontrarlas en casi todas las formaciones ecológicas existentes. Las leguminosas son utilizadas para consumo humano, como abono verde, como cultivos de cobertura y como productoras de forraje.⁶

La preocupación por una recuperación natural de la fertilidad en suelos cultivados ha dado lugar en el Altiplano boliviano a propuestas orientadas a incrementar la producción bajo una perspectiva agroecológica. La fijación biológica del nitrógeno (FBN) durante el descanso podría ser una manera de mejorar la calidad del material vegetal incorporado como abono verde o como subproducto agrícola.

En cuanto a las leguminosas, el interés científico se ha concentrado de manera general en una serie de experimentaciones sobre leguminosas cultivadas, estudiaron la fijación de nitrógeno por el tarwi y su efecto residual en la cebada (*Hordeum vulgare*), se midió el efecto de la incorporación de residuos de haba (*Vicia faba*) en el rendimiento del cultivo. Otros autores han experimentado el efecto de leguminosas forrajeras sobre el nitrógeno mineral del suelo y la respuesta del cultivo de papa.⁷

⁶Bismarck Sandoval C. Características Agronómicas y Nutricionales de Asociaciones de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centeno, UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ, 2007

⁷ Sivila de C, Hervé D. Efecto de leguminosas nativas en terrenos en descanso sobre la microbiota del suelo durante un cultivo de papa (Altiplano central boliviano), Ecología en Bolivia, Vol. 41(3): 154-166, Diciembre de 2006.

2.1.1 EL "Lupinus mutabilis ":

Leguminosa de Los Andes, conocida en Bolivia con el nombre de "tarwi" por los quechuas, "tauri" por los aymaras, se desarrolla desde los 2,000 hasta los 4,000m de altitud, es tolerable a las bajas temperaturas, siendo éste un potencial para la industria, podría denominarse "la soya andina" por sus propiedades.⁸ Además el tarwi es un fijador de nitrógeno atmosférico en cantidades apreciables que contribuye a la fertilización del suelo.⁹

El lupino andino tarwi es una planta leguminosa reconocida como una de las más ricas en nutrientes (TABLA N° 1). Se caracteriza por tener elevado contenido de proteínas y ácidos grasos, que la constituyen en una excelente alternativa para la nutrición humana y animal.

TABLA N°1: Comparación de la composición del tarwi y la soya (g/100g).

Componente	Tarwi	Soya
Proteína	44.3	33.4
Grasa	16.5	16.4
Carbohidratos	28.2	35.5
Fibra	7.1	5.7
Ceniza	3.3	5.5
Humedad	7.7	9.2

El aprovechamiento de los lupinos en el mundo se ha limitado por la presencia de sustancias tóxicas, debido principalmente a que las semillas poseen en su estructura alcaloides quinolizidínicos, confiriéndole cierto grado de toxicidad y un sabor fuertemente amargo.¹⁰

⁸ Mario Enriquez R., Centro de Investigación y promoción del Campesinado, CIPCA La Paz (No. 70)-La Paz lunes, 25 de octubre de 2004

⁹El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres, *Botánica Económica de los Andes Centrales* Editores: M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006: 458-482.

¹⁰ *Eduar Ortega D, Aida R, Arturo D, Ángel Zamora B.* Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia, ACTA AGRONÓMICA. 59 (1) 2010, p 111-118.

TABLA N°2: Composición relativa de Alcaloides en la semilla de *Lupinus mutabilis*

ALCALOIDES	Composición Relativa de Alcaloides (%)
Esparteína	7,39
K2 (no identificada)	0,07
Amodendrína	0,23
K5 (no identificada)	0,16
N-Metilangustifolia	3,46
Angustifolia + 17 oxoesparteína	0,6
Isolupanina	0,29
K9 (no identificada)	57,5
4-hidroxilupanina	8,65
Multiflorina	0,14
17-Oxolupanina	0,09
Anagirina	0,03
13-Hidroxilupanina	14,9
4,13-dehidroxilupanina	2,12
K17 - K19 (no identificada)	0,09
13-tigloiloxilupanina	0,28
Monoangeloil + ester de la monogloil de la 4,13 dehidroxilupanina	0,08
K24 (no identificada)	0,21
13 Benzoiloxilupanina	1,15
13-cis-cinnammoiloxilupanina	0,39
13-trans-cinnammoiloxilupanina	99,39
13-amgeloiloxiluanina	1,57

2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

TABLA N°3: Descripción taxonómica del *Lupinus mutabilis* (tarwi)¹¹

Tronco:	Cormofitas
División:	Embriofitas sifonógamas
Sub División:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledóneas
Sub. Clase:	Arquiclamideas
Orden:	Rosales
Familia:	Leguminosas
Sub Familia:	Papilionáceas
Genero:	<i>Lupinus</i>
Especie:	<i>mutabilis</i>
Nombre Científico:	<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>
Nombre Común:	Tarwi, Choco

¹¹ Jhohana Mariela C. Evaluación “in vitro” de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción de proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), Escuela superior politécnica de chimborazo, Riobamba-Ecuador 2009.

2.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL tarwi:

2.3.1 Etapa de germinación:

Esta comienza con la imbibición de la semilla y continúa con la aparición de la radícula esta última presenta una gran elongación antes de que aparezca el hipocotilo. El lupino es una especie de germinación epigea, lo que determina que los cotiledones sean conducidos por el hipocotilo sobre el nivel del suelo.¹²



- ☞ Cuando a terminado el crecimiento del hipocotilo y a partir del punto en que se presentan insertos los cotiledones, comienza a generarse el epicotilo, presentando una pequeña elongación antes de generar la primera hoja.¹³

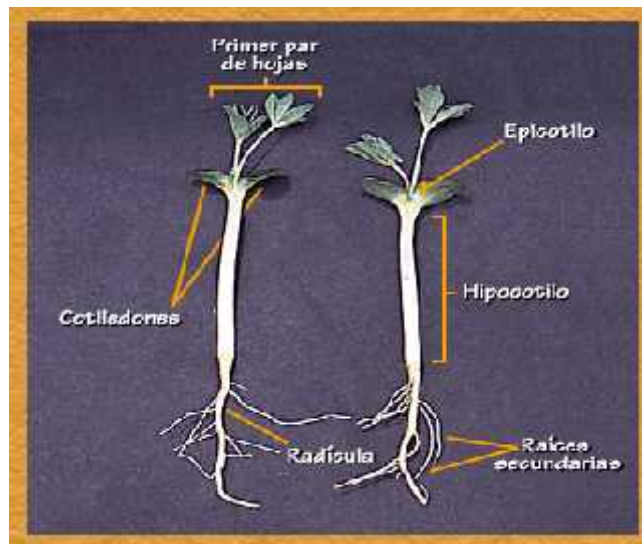


FIGURA Nº1. Componentes de una planta de *Lupinus mutabilis*¹⁴

¹² Adrian J, Fragne R. La Ciencia de los Alimentos, Editorial ACRIBIA S.A: Zaragoza-España: Pág. 25.

¹³ Adrian J, Fragne R. La Ciencia de los Alimentos, Editorial ACRIBIA S.A: Zaragoza-España: Pág. 30.

¹⁴ http://www.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/lupino/bibliogr.htm.

La radícula profundiza y crece rápidamente para llegar a transformarse en una fuerte raíz pivotante que presentara múltiples ramificaciones y gran cantidad de raicillas con una capacidad de alcanzar más de 1m de profundidad.¹⁵

☞ Tallo principal y ramas:

Tienen una estructura muy particular, mostrando distintos niveles de ramificación y de floración, estos niveles van determinando una jerarquía de ejes laterales. El tallo principal termina en una inflorescencia, bajo ésta y a partir de las yemas axilares ubicadas en las hojas de su parte apical, se generan ramas primarias o ejes de primer orden a su vez éstas, originan un nuevo nivel de ramas a partir de yemas axilares ubicadas en sus últimas hojas de esta manera se va desarrollando en secuencia el desarrollo de la planta con nuevos niveles de ramificación y de floración.¹⁶

☞ Hojas:

Son de forma digitada, generalmente compuesta por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. Se diferencia de otras especies de *Lupinus* en que las hojas tiene menos vellosidades.¹⁷

☞ Flores e inflorescencias:

Las flores son grandes y se agrupan en inflorescencias racemosas terminales, el numero de flores por racimo fluctúa entre 20 y 80 en el caso del lupino blanco y entre 5 y 20 en



¹⁵ Adrian J, Fragne R. La Ciencia de los Alimentos, Editorial ACRIBIA S.A: Zaragoza-España: Pág. 31.

¹⁶ Adrian J, Fragne R. La Ciencia de los alimentos, Editorial ACRIBIA S.A: Zaragoza_España: Pág.31.

¹⁷ Lock O. Investigación Fotoquímica: métodos en estudio de productos naturales, Perú: Pontificia Universidad Católica, pp149-191. (Serie Productos Naturales, N°27)

el caso del lupino australiano, el número de flores por racimo es mayor en el primer nivel de floración, disminuyendo paulatinamente hasta el último nivel y cada flor tiene cinco pétalos.¹⁸

☞ **Etapa de floración:**

Esta se produce gradualmente debido a los distintos niveles de ramificación que presenta por eso que llega a alcanzar de tres a cuatro niveles de floración. La coloración de la flor varía entre el inicio de su formación hasta la maduración, de un azul claro hasta uno muy intenso y de allí se origina el nombre científico, *mutabilis*, es decir que cambia.¹⁹

☞ **Semillas:**

Su número es variable, en una vaina de 5-12cm, también varían de forma, estas pueden ser redondas, ovaladas. Miden de 0.5 a 1.5cm, esta variación depende de las condiciones en las que crece y de acuerdo a la variedad. Los colores de las semillas varían de acuerdo a la genética. Estas semillas son usadas en la alimentación humana, ya que esta especie ocupa uno de los primeros lugares entre los alimentos nativos con elevado contenido de proteínas y aceites a nivel mundial, su contenido proteico es incluso superior al de la soya y su contenido en grasa es similar es por este motivo que las semillas son excepcionalmente nutritivas (TABLA N° 1). La

¹⁸ Ing. Abraham Palacios V, Ing. Demetrio Salazar M, Lissi Espinoza C, Milagros Herrera M, Carlos Huamancaja C. "OBTENCION DE ALCOHOL A PARTIR DE LA MALTA DE LUPINUS MUTABILIS (TARWI)", CENTRO DE INVESTIGACION HUANCAYO – PERU, 2003, Facultad de Ingeniería.

¹⁹ Gross R, Tuesta L. et al. 1988 El Cultivo y la Utilización de los Lupinos, Perú: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Pp. 154-165.

²⁰ Benjamín Castañeda C, Renán Manrique M, Fabricio Gamarra C, Ana Muñoz J, Fernando Ramos E, Frank Lizaraso C, Jorge Martínez H. Probiótico elaborado en base a las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (chocho o tarwi), Acta Med Per 25(4) 2008.

semilla de tarwi es rica en aminoácidos: lisina, metionina, triptofano, isoflavonoides, proteína (51%) grasa (16.5%), con contenido de ácidos grasos (omega 3 y 6), carbohidratos (28%) y alcaloides.²⁰

2.4 CULTIVO DEL tarwi EN BOLIVIA.

Los cultivos se encuentran en el Norte de La Paz y en los valles inter-andinos de Cochabamba, Chuquisaca y Potosí, aproximadamente la extensión de cultivo es de 4,000 hectáreas. Es un cultivo anual que no requiere muchos nutrientes desarrollándose en suelos franco-arenosos con un pH de 5-7, preserva la fertilidad de los suelos fijando nitrógeno es susceptible al exceso de humedad durante la floración y el envainado, tiene mayor resistencia al frío que otras especies. Además que es incorporado como abono verde incrementando la producción de papa y mejorando la estructura de los suelos del Altiplano y los valles³.

2.5 IMPORTANCIA DEL tarwi.

El tarwi es un alimento muy completo ya que posee grasas, proteínas, hierro, calcio y fósforo, además de contener vitamina A y complejo B. Su consumo es recomendado para mujeres embarazadas o que estén dando de lactar y niños en crecimiento. Su porcentaje proteico es elevado por lo que contiene lisina y minerales. Su consumo es muy importante y según estudios se a llegado a la conclusión de que el tarwi puede sustituir a la carne siempre y cuando este acompañada de un cereal como la quinua, el maíz, etc.²¹¹⁸

²¹ Lic. Ana Cecilia Abregú T, Ing. Jessica Huerta G, Ing. Gerardo Mendoza P. Manual de Helicicultura. CECOMLAMIN. Lima 2006.

2.6 USOS DEL tarwi.

El tarwi tiene múltiples usos no solo en la alimentación donde es muy apreciado, las semillas cocidas constituyen un ingrediente para sopas, guisos y ensaladas así como para la preparación de pan, galletas, etc, pero también es utilizado:

- En la medicina, se lo utiliza en casos de diabetes, en males renales y también para eliminar parásitos externos (Ganado).
- En los rituales, cuando se festeja el ritual de la ch'alla de la semilla no pueden faltar los granos de tarwi, también se utilizan las flores.
- Es utilizada de modo artesanal, se elabora harina, leche, yogurt.
- Entre los derivados que se obtienen de esta planta también están los repelentes ya controla las plagas de los cultivos, leña, abono y de forraje.³
- El producto líquido del desamargado es utilizado para combatir a las garrapatas en el ganado ovino, asimismo se utiliza este producto para la fabricación de shampoo. ²¹

2.7 CULTIVO IN-VITRO (generación de callos).

La función de la Biotecnología Vegetal es el cultivo "in Vitro" de plantas "en recipientes de vidrio" manteniendo las plantas en el laboratorio libre de contaminaciones y por supuesto fuera de su entorno natural, reemplazando el suelo donde crece por medio de

cultivo, este medio de cultivo esta compuesto por minerales, agua, hormonas, sustancias orgánicas y vitaminas. El porcentaje de estos elementos puede variar según el medio de cultivo utilizado y según las especies vegetales. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos constituyen una valiosa herramienta para el fitomejoramiento, recientemente, la ingeniería genética está siendo aplicada conjuntamente con el mejoramiento convencional para aumentar la calidad nutritiva y los atributos agronómicos de diferentes especies.²²

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

²² Ricardo J, Hebe Y, Luis A. Regeneración in vitro de múltiples yemas y vástagos a partir de embriones de *Desmanthus virgatus* (Leguminosae), IBONE - CC 209 - Facultad de Ciencias Agrarias – UNNE, Sargento Cabral 2131 - (3400) Corrientes - Argentina., Teléfono/Fax: +54 (3783) 427131, E-mail: ibone@espacio.com.ar.

2.7.1 Principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo in vitro.

☞ Ambiente químico:

- Composición del medio de cultivo
- pH.

☞ Ambiente físico:

- Temperatura.
- Luz y fotoperíodo.
- Humedad.

2.7.2 Etapas del Proceso de Micropropagación.

☞ **Selección y Preparación de la planta madre.**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado.

☞ **Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas.**

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente.

☞ Introducción del material seleccionado in vitro.

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

☞ Multiplicación de brotes.

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados.

☞ Enraizamiento.

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

☞ Aclimatación.

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán

cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales.²³

☞ Explante.

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, si el objetivo final es la producción de callos, la utilización de un explante en condiciones apropiadas permitirá la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos.²⁴

☞ Formación de callos.

Están formados por un cúmulo o masa de células que no cesan de dividirse y crecer, sin formar nada definido. Estas estructuras se asemejan a un tumor y se puede lograr la proliferación callosa con relativa facilidad utilizando ápices o meristemas, ojos, entrenudos, cotiledones, raíces, o tejidos provenientes de frutos.^{25,24,26,25}

2.8 FITOHORMONAS.

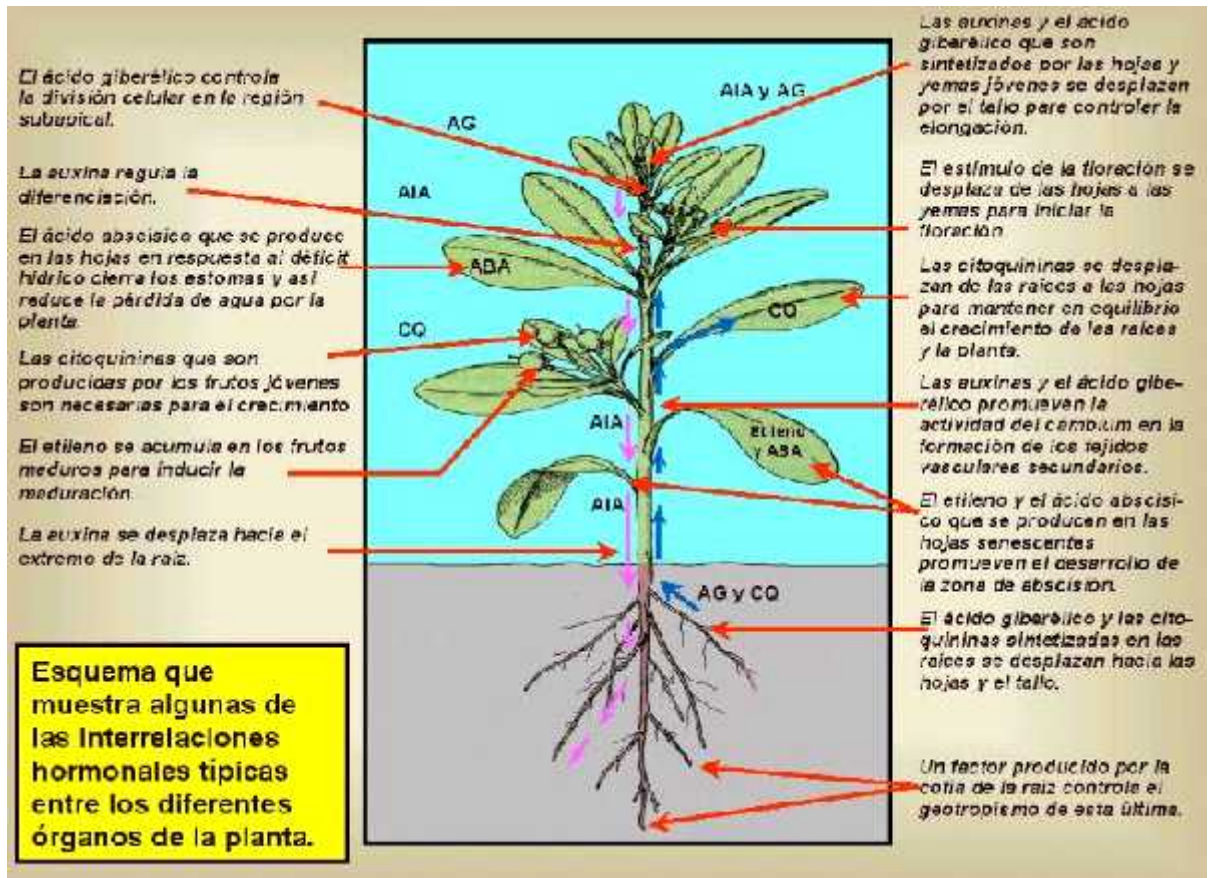
Se le llama así, ya que FITO significa Vegetal, y constituyen un grupo de sustancias orgánicas, el éxito del empleo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, está muy influenciado por la composición química del medio de cultivo y los factores ambientales. Si falta algún componente básico en el medio de cultivo, lo normal es que no se produzca crecimiento y desarrollo, y por lo tanto el tejido u órgano

²³ Ing.Agr. Alicia C. MSc. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo, Unidad de Biotecnología, INIA.

²⁴ L.A.Mroginski, W.M.Roca. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Cali-Colombia.

²⁵ Dra. Rosa Martínez R. Y colaboradores, *Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales*, Libros Técnicos: Serie Forestal, 1ª edición, México, 2010.

muera. En el uso de las técnicas *in vitro* en las plantas superiores, los reguladores del crecimiento, especialmente las auxinas y citocininas, juegan un papel muy importante, aspecto que se explicará posteriormente.



F

FIGURA Nº2. Descripción del efecto de las hormonas sobre las plantas

2.8.1 AUXINAS.

Son las primeras hormonas que se describieron. Su estructura es un derivado del fenol o el indol y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados con características ácidas. Se descubrieron a partir del efecto de curvatura de los tallos al cortar su parte apical. No se sabe el modo de acción pero está relacionado directamente con su estructura, ya que si se modifica pierde su función.

Las auxinas principales son:

- Ácido indolacético
- Ácido 4-cloroindolacético
- Ácido indolbutílico: actúa en el enraizamiento.
- Ácido fenilacético

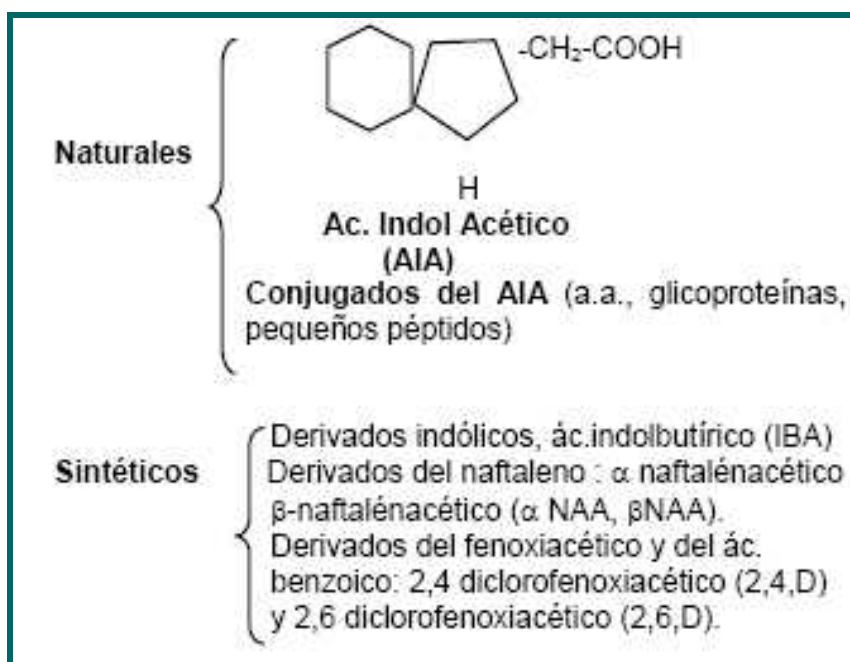


FIGURA Nº3. Clasificación genérica de las auxinas.

2.8.1.1 Características de las auxinas.

∞ Crecimiento.

Estimulan la elongación celular en tallos y coleoptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación del xilema y el floema.

☞ **Tropismos.**

Responsables del fototropismo y gravotropismo.

☞ **Dominancia apical.**

La yema apical del tallo (produce la mayoría de auxinas) inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.

☞ **Abscisión de órganos (hojas, flores y frutos).**

Posee un control genético, y las auxinas retrasan la caída, aunque el etileno la induce.

☞ **Rizogénesis.**

Estimulan la formación de raíces laterales o adventicias. Inhiben la elongación de la raíz principal. Las aplicaciones agrícolas de las auxinas son la reproducción, la formación de frutos, floración, partenocarpia (frutos sin semilla), aparición de flores femeninas y creación de herbicidas.

2.8.2 CITOCINAS.

Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función (citocinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular. Derivan de adeninas, y las más frecuentes son la kinetina y benciladenina (sintéticas) y la zeatina (natural). La zeatina posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales. La zeatina puede estar en la base siguiente al 3' del anticodón del ARNt.

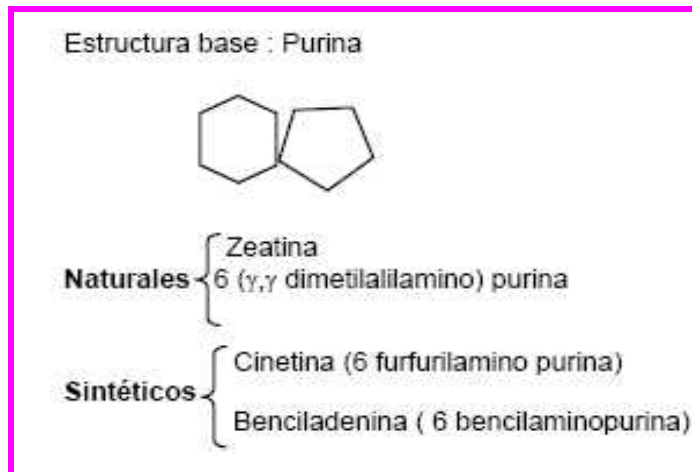


FIGURA Nº4. Clasificación genérica de las citocinas

Los efectos que producen son:

☞ **Crecimiento.**

En conjunto con las auxinas estimulan la proliferación de células meristemáticas, y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben.

☞ **Dominancia apical.**

Estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo que deben estar en equilibrio).

☞ **Diferenciación y morfogénesis.**

Provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento. Junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.

☞ **Senescencia.** Son anti-senescentes.²⁶

²⁶ Jesús Agustín Badillo C, María del Carmen Oliver S, Karen Gisela Moreno G, Verónica Pacheco G, Hernán Cortés A. MANUAL DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, DEPARTAMENTO DE BIOPROCESOS-ACADEMIA DE BIOTECNOLOGÍA, México D. F. Agosto 2009

III. JUSTIFICACION:

- ☞ El Tarwi, es una leguminosa de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú, teniendo una relevancia en la gastronomía desde la época prehispánica. Su alto contenido en proteínas es mayor que el de la soya, es por este motivo que se convierte en una planta de interés para la nutrición humana y también como forraje para los animales de granja.

- ☞ Esta leguminosa, se caracteriza por ser tolerante a las bajas temperaturas y tener un alto valor nutritivo en proteínas y grasa, siendo este un potencial para la industria alimenticia, y llegando a denominar a este producto como “la soya andina” por sus propiedades. La tabla de composición de alimentos para uso en América Latina, reporta que el Tarwi contiene un 44.3% de proteínas frente al 33.4% de la soya. Las áreas de cultivo de este producto en Bolivia se encuentra distribuidas en el Altiplano, norte de La Paz y en los valles interandinos de Cochabamba, Chuquisaca y Potosí, llegando a estimar que la extensión de cultivo llega a las 4.000 hectáreas.

- ☞ En la gestión 2008 se exportaron cerca de 3.300 dólares de tarwi hacia los mercados de Colombia (96%) y Estados Unidos (4%). La relevancia de este producto ha transpuesto nuestras fronteras y la de los productores principales, países como Perú y Ecuador, extendiéndose el cultivo de esta leguminosa ha zonas templadas de Brasil, Nueva Zelanda, Vietnam, Europa y los Estados Unidos, aunque su adaptación a este tipo de clima no es de las más alentadoras para su producción. Sin embargo a pesar de esta ventaja climática, hace falta impulsar al sector agrario para mejorar sus condiciones de producción y generar un valor agregado a esta leguminosa y por que no pensar en la promoción del tarwi el mercado interno.

∞ El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que nos ayuda a generar un modelo in vitro de leguminosas en este caso del tarwi, que es útil para el mejoramiento, supervivencia y producción, no solo de esta leguminosa, sino que también de otras especies, por lo que esta es una técnica con un enorme potencial tanto en el ámbito de la investigación como en el desarrollo agrario. No obstante el emplear hormonas vegetales en el crecimiento y mantenimiento de los cultivos in-vitro facilitaría e incrementaría la producción en el campo, mejorando el rédito para el agricultor.

IV. OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las concentraciones óptimas de las fitohormonas de crecimiento, para la inducción de callos a partir de hipocotilos tallos de plántulas in-vitro de *Lupinus mutabilis* (tarwi).

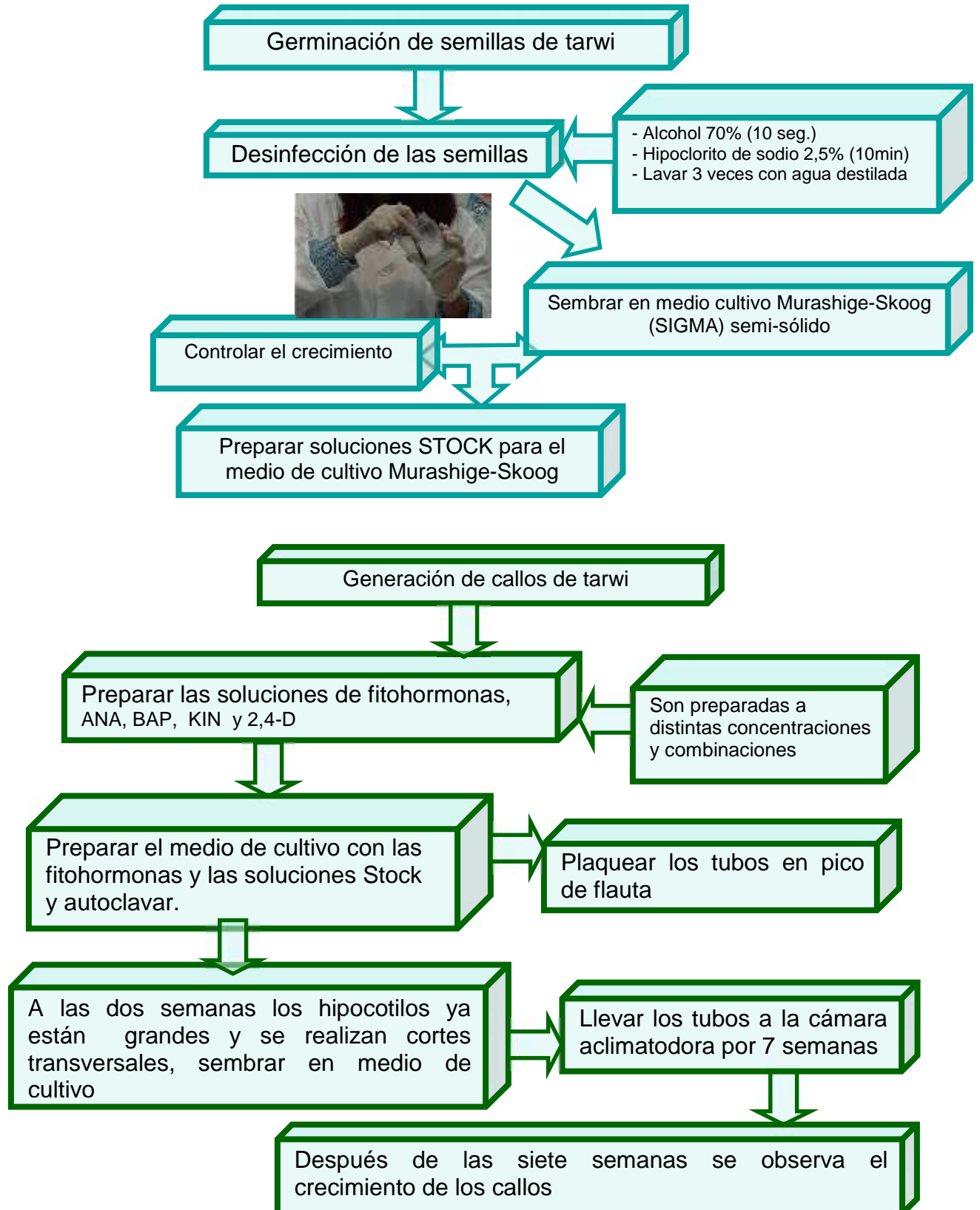
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICO

- ☞ Inducir la germinación in-vitro de las semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi).

- ☞ Realizar la micro propagación de plántulas de *Lupinus mutabilis* (tarwi) en medio de cultivo sólido Murashige-Skoog.

- ☞ Establecer si las concentraciones de las diferentes combinaciones de fitohormonas, influyen en la generación de callos.

V. METODOLOGIA:



5.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:

Para la preparación del medio de cultivo Murashige-Skoog se prepararon las soluciones STOCK (ver reactivos en Anexo 3), todos estos reactivos se pesaron en un balanza analítica de la marca KERN (KERN&sbhn Gimbh D-72336 KERN-ALJ) 220-4M.



FIGURA Nº5. Material requerido para la preparación del medio de cultivo. IIFB (2010).

Una vez pesada la cantidad adecuada de reactivos para un volumen apropiado se disolvió con agua destilada en un frasco de vidrio. Durante todo el proceso experimental, se emplearon seis soluciones STOCK, teniendo en cuenta que para el STOCK-V, se hizo hervir el medio de cultivo en el plato de calentamiento (marca Thermolyne) adicionando (cuantos gramos) EDTA en la mitad del volumen total, una vez en ebullición se agregó $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, completando el volumen de agua destilada restante, para el volumen requerido. La solución debe tornarse de color amarillo pálido y se debe guardar en un ambiente oscuro.

Las soluciones STOCK se las prepararon en frascos de vidrio, a las que se identificó en orden numérico con la fecha en la que se preparó el reactivo y posteriormente se almacenó a 4 °C.



	STOCK-I	STOCK-II	STOCK-III	STOCK-IV	STOCK-V	STOCK-VI
1-LITRO	20mL	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL

FIGURA N°6. Imagen de los reactivos empleados y las soluciones preparadas a diferentes concentraciones. IIFB (2010).

5.1.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS:

Se realizaron tres sistemas de germinación de semillas:

☞ Para el primer sistema de germinación, se preparó el medio de cultivo Murashige-Skoog caldo. En un matraz erlenmeyer de 1000 mL, al que se adicionó agua destilada estéril (920 mL/L), conjuntamente con las soluciones stock (20 mL/L sol Stock I, 10 mL/L sol Stock II, III, IV y V), la cual se llevó al plato de calentamiento – agitación para la homogenización del medio, posteriormente se procedió a medir y ajustar el pH a 5.8 con un pHmetro HANNA Instruments – HI9812, para el ajuste del pH se empleó HCl 1N si el medio de cultivo presentaba una característica básica y también se empleó NaOH 1N si el medio de cultivo presentaba característica ácida. El medio de cultivo preparado se llevó a ebullición. Antes del

inicio de ebullición del medio de cultivo, se adicionó, 40g/L de sacarosa al medio y finalmente 4.4 g/L de medio de cultivo Murashige-Skoog (SIGMA). Inmediatamente se vertió un volumen de 15 mL a los frascos de vidrio que contenían en el fondo algodón y gasa. Luego se procedió a esterilizar los medios de cultivo empleando un autoclave marca ALL AMERICAN-Electric Pressure Steam (Sterlizer-Modelo 25x-2), se esterilizó los medios cultivo a 25 °F y 20 psi, dejando el autoclave en estas condiciones por 15 minutos, pasado este tiempo se dejó enfriar los medios y se procedió a colocar los mismo en la campana de flujo laminar, donde se adicionó la solución Stock VI (10 mL/L), la que previamente se filtró.

- ☞ El segundo sistema de germinación se preparó empleando el medio de cultivo Murashige-Skoog (SIGMA) sólido. En un erlenmeyer de 1000 mL, se adicionó agua destilada estéril, el cual se llevó al plato de calentamiento – agitación para su homogenización, posteriormente se procedió a medir y ajustar el pH a 5.8 con pHmetro, para el ajuste del pH se empleó HCl 1N si el medio de cultivo presentaba una característica básica y también se empleó NaOH 1N si el medio de cultivo presentaba característica ácida. El medio de cultivo preparado se llevó a ebullición, donde se adicionó 40 g/L de sacarosa, 4.4 g/L de Murashige-Skoog (SIGMA) y 8 g/L de agar. Inmediatamente se vierte un volumen de 15 mL a los frascos de vidrio, luego se llevan los medios al autoclave, se esteriliza los medios cultivo a 25 °F y 20 psi, dejando el autoclave en estas condiciones por 15 minutos, pasado este tiempo se dejó enfriar los medios de cultivo y se procedió a colocar los mismos en campana de flujo laminar.

☞ El tercer sistema de germinación consiste en la preparación del medio de cultivo Murashige-Skoog sólido con las soluciones STOKS, adicionando a este sistema una fitohormona. En un matraz erlenmeyer de 1000 mL, se adicionó agua destilada estéril (920 mL/L), conjuntamente con las soluciones stock (20 mL/L solución stock I y 10 mL/L de solución stock II,III,IV y V), la cual se llevó al plato de calentamiento – agitación para la homogenización del medio, posteriormente se procedió a medir y ajustar el pH a 5.8 con un pHmetro, de igual manera que en los anteriores casos, para el ajuste del pH se empleó HCl 1N si el medio de cultivo presentaba una característica básica y también se empleó NaOH 1N si el medio de cultivo presentaba característica ácida. El medio de cultivo preparado se llevó a ebullición. Antes del inicio de ebullición del medio de cultivo, se adicionó, 40g/L de sacarosa al medio de cultivo, 4.4 g/L de medio de cultivo Murashige-Skoog (SIGMA) y 8 g de agar, además de agregar 2 mg de 2,4 Diclorofenoxiacético. Inmediatamente se procedió a verter un volumen de 15 mL a los frascos de vidrio que tenían una base de algodón en el fondo, luego se llevaron los medios de cultivo a esterilizar en autoclave a 25 °F y 20 psi, dejando el autoclave en estas condiciones por 15 minutos, pasado este tiempo se dejó enfriar el autoclave, se retiraron los medios de cultivo y se colocaron los mismo en campana de flujo laminar, donde se adicionó la solución Stock VI (10 mL/L), la que previamente se filtró.

5.2 MÉTODO DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS DE TARWI:

☞ Las semillas de tarwi fueron adquiridas del cantón de Puerto Mayor Carabuco, capital de la 3ra sección Municipal de la provincia Camacho del Departamento de La Paz ubicado a 170Km de la ciudad de La Paz. La desinfección se realizó, sometiendo las semillas a Etanol al 70% durante 10 segundos y posteriormente fueron trasvasadas a un frasco

que contenía Hipoclorito de Sodio al 2,5% por 10 min. Finalmente se lavó con agua destilada estéril (proceso realizado en tres ocasiones).²⁷ Las semillas se colocaron en placas de Petri con papel filtro, y se las colocó en medio de cultivo Murashige-Skoog.

²⁷ Edgar Alexander S, Teresa M. Establecimiento de una metodología para la inducción de regenerantes de arveja (*Pisum sativum* L.) variedad 'Santa Isabel', Agronomía Colombiana 24(1): 17-27, 2006.

5.3 MÉTODO DE DESINFECCIÓN Y SEMBRADO DE OTRAS SEMILLAS:

- ☞ Se realizó la desinfección de 50 semillas de arvejas frescas con hipoclorito de sodio al 1% y etanol al 70%, se las sembró en medio Murashige-Skoog sólido en frascos de vidrio.

- ☞ De igual manera se realizó el sembraron 50 semillas de habas frescas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y etanol al 70%, y se las sembró en medio de cultivo medio Murashige-Skoog sólido en frascos de vidrio, se las almaceno en la cámara aclimatadora

5.4 SEMBRADO DE LAS SEMILLAS:

Para el sembrado de las semillas se empleo material totalmente estéril, empleando luz UV sobre: pinzas, guantes, placas de Petri, medios de cultivo, etc. Se irradio la campana de flujo laminar, durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se activó el extractor de aire y se procedió al sembrado de las semillas. En cada frasco se colocaron entre 5 a 6 semillas de tarwi llegando a un total de 100 semillas de tarwi sembradas, cerrándolas bien se las llevó a la cámara de aclimatación la que se encontraba a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un 60% de humedad relativa, durante un fotoperíodo de 16 horas luz y o de oscuridad. El control del crecimiento se realizó entre el tercer y quinto día después del sembrado.

5.5 EMBRIOGENESIS SOMÁTICA (GENERACIÓN DE CALLOS):

Para la generación de callos se contó con aproximadamente unas 150 semillas de tarwi en crecimiento, de estas se realizaron los cortes de hipocotilos y de las raíces terminales ya que están en una etapa de crecimiento constante.

5.5.1 Soluciones de fitohormonas:

Para un volumen final de 250mL se peso en una balanza analítica 25mg de cada fitohormona en este caso se utilizaron dos citoquinas: el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) y el 6 bencil amino purina (BAP) y dos auxinas como la Kinetina (KIN) y el ácido naftalenacetico (ANA).



FIGURA Nº7. Imagen de las hormonas empleadas y las soluciones preparadas. IIFB (2010).

- ☞ Una vez pesadas las cantidades necesarias se disolvió con 500uL de alcohol ANA, BAP y 2,4-D ya que estas fitohormonas son insolubles en agua destilada. Pero la kinetina se disuelve con 500uL de agua destilada.

- ☞ Una vez disueltas las fitohormonas se adicionó 50mL de agua destilada para disolver la fitohormona y se procedió al aforo a 250mL. Se etiqueto cada matraz correctamente.

- ☞ Terminado de preparar las soluciones se realizaron los cálculos para las cantidades de fitohormonas que se utilizaron según el volumen final del medio de cultivo que utilizamos.

TABLA Nº4: Calculo de las concentraciones de fitohormonas empleadas en la inducción del crecimiento de los hipocotilos.

	Tratamiento 1 0/20 mg/L	Tratamiento 2 0,2/10 mg/L	Tratamiento 3 1/2 mg/L	Tratamiento 4 2/2 mg/L	Tratamiento 5 1/2 mg/L	Tratamiento 6 10/0,2 mg/L	Tratamiento 7 20/0 mg/L
2,4D/BAP	0/10	0,1/5	0,5/1	1/1	1/0,5	5/0,1	10/0
2,4D/KIN	0/10	0,1/5	0,5/1	1/1	1/0,5	5/0,1	10/0
ANA/BAP	0/10	0,1/5	0,5/1	1/1	1/0,5	5/0,1	10/0
ANA/KIN	0/10	0,1/5	0,5/1	1/1	1/0,5	5/0,1	10/0

5.6 MEDIO DE CULTIVO CON HORMONAS:

Se preparó el medio Murashige-Skoog sólido, adicionado diferentes concentraciones de fitohormonas (Tabla Nº5), colocando en 7 Erlenmeyers de 250mL. Luego se procedió a alicuotar los volúmenes determinados para el volumen final, se midió el pH a 5.8. (Tabla Nº4).

TABLA Nº5: Combinaciones y concentraciones de las fitohormonas para preparar el medio de cultivo para un volumen final de 250mL.

	1	2	3	4	5	6	7
	0/10	0,1/5	0,5/1	1/1	1/0,5	5/0,1	10/0
2,4D/BAP	0/25mL	0,25/12,5mL	1,25/2,5mL	2,5/2,5mL	2,5/1,25mL	12,5/0,25mL	25/0mL
2,4D/KIN	0/25mL	0,25/12,5mL	1,25/2,5mL	2,5/2,5mL	2,5/1,25mL	12,5/0,25mL	25/0mL
ANA/BAP	0/25mL	0,25/12,5mL	1,25/2,5mL	2,5/2,5mL	2,5/1,25mL	12,5/0,25mL	25/0mL
ANA/KIN	0/25mL	0,25/12,5mL	1,25/2,5mL	2,5/2,5mL	2,5/1,25mL	12,5/0,25mL	25/0mL
Vf + VH	17,5+25mL	17,5+12,75mL	17,5+3,75mL	17,5+5mL	17,5+3,75mL	17,5+12,75mL	17,5+25mL
STOCK	42,5mL	30,25mL	21,25mL	22,5mL	21,25mL	30,25mL	42,5mL
Vf de H₂O	207,5mL	219,75mL	228,75mL	227,5mL	228,75mL	210,75mL	207,5mL

Vf= Volumen final, **VH=** Volumen de la combinación de las fitohormonas, **Vf de H₂O=** Volumen final de agua destilada

☞ Luego preparar los diferentes medios de cultivo, se llevaron los mismos al plato de calentamiento – agitación, cuando el medio estuvo a punto de hervir se le coloco 7.5g de sacarosa y 2g de agar y se dejo hervir el medio hasta observar un color amarillo pálido. Posteriormente se procedió al sellado de los matraces que contenían el medio de cultivo con papel estañado y papel madera,

llevando los mismos al autoclave, una vez que paso por el proceso de purgación se esperó que la temperatura ascienda a 25°F y de 15-20 psi, misma que debe mantenerse por 15 min. Mientras se preparó la campana de flujo laminar para trabajar. Se realizó la limpieza de la campana con alcohol al 70%, en la que se colocó todo el material a ser empleado para el proceso de esterilizado proceso dura 15 minutos, luego se procedió a encender el extractor de aire.



FIGURA N°8. Material esterilizado irradiado con luz UV, en campana de flujo laminar. IIFB (2010).

☞ Una vez que la temperatura del autoclave descendiendo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se procede a sacar los medios de cultivo del equipo de autoclave y se espera que los mismos enfríen a temperatura ambiente y se procede con la adición de vitaminas (tratadas previamente por filtrando), esta es la solución STOCK-VI, homogenizando bien con el medio se procedió a verter en medio de cultivo en los tubos de ensayo en forma de pico de flauta. Todos los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente guardándolos en bolsas y separándolos por concentraciones, se los guardo en una gaveta limpia hasta el momento en que se los utilizó.

5.7 SEMBRADO DE LOS HIPOCOTILOS:

- Se procedió al sembrado de los hipocotilos. Nuevamente se limpio la campana y se la irradio con todo el material necesario como pinzas, escalpelo, cuchillas, placas petri, etc. Los cortes de los hipocotilos fue de 5cm aproximadamente, estos fueron colocados en la placa de Petri. Los cortes son en forma diagonal aproximadamente de 3 a 4mm, se los introdujo en el tubo ensayo con la ayuda de una pinza poniéndolos en contacto con el medio de cultivo cerrándolos, sucesivamente hasta que se hayan completado todos los tubos.



FIGURA Nº9. Imagen del material empleado para el sembrado de los hipocotilos en los diferentes tubos que contiene variación en la concentración de hormonas . IIFB (2010).

- Todos los tubos ya sembrados se los guardo dentro de un conservador y se los llevo a la cámara aclimatadora que esta a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un 60% de humedad, estando al rededor de 7 semanas y a la tercera semana recién se observó el crecimiento. Se observaron los cambios que se producen durante las siete semanas.



FIGURA Nº10. Imagen del material ya sembrado con los cortes de los hipocotilos en los diferentes tubos que contienen variación en la concentración de hormonas. IIFB (2010).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION:

6.1 MEDIOS DE CULTIVO:

- ☞ En el estudio se utilizó el medio líquido para las etapas de germinación debido a que aceleraba el proceso de germinación y este era mas rápido, proporcionándole a la semilla mayor hidratación y nutrientes. Para la proliferación de los hipocotilos se utilizó medio sólido para que las raíces se adhieran al medio de cultivo y así evitar que los hipocotilos por su peso caigan y comiencen el proceso de necrosis.

- ☞ Se utilizó medios de cultivo preparados con las soluciones STOCK, para esto se tomo en cuenta el filtrado del STOCK VI. Esta es una solución preparada a base de vitaminas y como el medio de cultivo se debe autoclavar y es sometido a altas temperaturas se corre el riesgo de que estas se desnaturalicen y no cumplan con su propósito nutritivo al medio de cultivo es por eso que después de autoclavar el medio de cultivo se dejo enfriar a temperatura ambiente, cuando el recipiente que contiene el medio de cultivo es tolerable al dorso de la mano es el momento de agregar el filtrado de las vitaminas en la campana de flujo laminar.

- ☞ Para la generación de callos de tarwi también se utilizó el medio de cultivo sólido, variando la concentración de fitohormonas esto nos permitía adherir los cortes de hipocotilos para observar su desarrollo en las siete semanas posteriores.

6.2 SEMILLAS:

☞ Se utilizaron semillas del cantón de Puerto Mayor Carabuco, capital de la 3ra sección Municipal de la provincia Camacho del Departamento de La Paz ubicado a 170Km, que no presentaban ningún tipo de alteración morfológica. En el campo por lo general las semillas se encuentran expuestas al medio ambiente y sirven de alimento para algunas aves. Además estas semillas estaban secadas en el sol y no habían sufrido el proceso de desamargado.

☞ El grano de tarwi crudo es amargo (alto contenido de esparteína, lupinina y otros), por lo tanto es inconsumible, debido a este sabor amargo de las semillas se procede al desamargado. Para este procedimiento existen dos métodos el manual y el industrial. El método manual consiste primeramente en la selección del grano por tamaño posteriormente se remojan los granos en agua durante un día, luego se cosen los granos por una hora para depositarlos en un costal o canasta y dejarlos en agua corriente durante 4-5 días, pasado este tiempo se prueban los granos de tarwi para probar su sabor. El desamargado industrial consiste en la clasificación y limpieza con zarandas para luego hidratarlas durante 12 horas, la cocción se realiza en una olla a presión con una llave que permite el flujo de agua se secan en el sol y finalmente se los almacena.

6.3 DESINFECCIÓN Y SEMBRADO DE OTRAS SEMILLAS:

Después del sembrado de las semillas de arvejas se las dejó en la cámara aclimatadora y luego de una semana se pudo

observar que mas de la mitad estaban contaminados y los demás empezaban a germinar, por lo cual se los cambio de medio de cultivo, al cabo de las dos semanas se observo que las semillas se secaban y por lo tanto ya no había crecimiento.

Ya que de igual manera que para las arvejas se sembraron habas frescas a la semana se observó que el medio se tornaba café oscuro y las semillas se habían necrosado, no se encontró ninguna germinada.

6.4 GERMINACION Y GENERACIÓN DE VITRO-PLANTAS:

☞ Para la germinación se utilizó un método de desinfección superficial para las semillas de tarwi²⁷, en la cual emplearon: alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 2,5%, debido que a esta concentración actúan como agentes desinfectantes y así librarlas de hongos y microorganismos que pudieran contaminarlas y afectar en el proceso de germinación, además de esta manera obtendríamos hipocotilos estériles para comenzar la generación de callos.



FIGURA NºII. Imagen de los hipocotilos libres de contaminación listos para el corte y sembrado en los tubos que contienen variación en la concentración de hormonas. IIFB (2010).

☞ Durante el proceso de la germinación se observó, que las semillas sembradas en medio de cultivo con una fitohormona sufrían en su mayoría el proceso de necrosis, y las que fueron trasvasadas a otro medio de cultivo crecieron deformes, observándose hipocotilos con morfología gruesa y de color negrusco, asemejándose a un pata de gallina. Las otras semillas sembradas en medio sólido, presentaban en su mayoría contaminación por hongos y además el ambiente no era adecuado debido al mal estado de la cámara de aclimatación por lo que se tubo que trasladar a otro ambiente mientras este era reparado.



FIGURA Nº12. Imagen de una semilla sufriendo el proceso de necrosis.
IIFB (2010).

☞ Las semillas que fueron sembradas en medio de cultivo Murashige-Skoog (SIGMA), presentaron mejores resultados ya que existía menor cantidad de hipocotilos contaminados, no se observaron alteraciones en su crecimiento y eran más resistentes a los cambios de temperatura.

Posteriormente al cabo de una semana ya se podía observar que los hipocotilos que presentaron crecido midiendo aproximadamente unos 5cm de altura, también se observaron las raíces delgadas pero abundantes estando listos para el segundo cambio de medio de cultivo.



FIGURA N°13. Hipocotilos después de haberlos cambiado de medio de cultivo. IIFB (2010).

- ☞ Entre la primera y la segunda semana se observó el crecimiento de las semillas de tarwi. Una vez que se consiguió la mayor cantidad de semillas germinadas se procedió al cambio de medio de cultivo, reemplazando el medio de cultivo caldo por el medio sólido.
- ☞ Se realizó los cortes en forma transversal para que haya un mejor enraizamiento y se realizó entre 1 a 3 cambios de medios de cultivo más o menos cada 2 semanas para obtener una vitro planta.
- ☞ Durante el proceso de la germinación se contaron la cantidad de semillas germinadas, contaminadas y muertas que se detallan en la tabla N°5.

TABLA Nº5: Control de la germinación y crecimiento de las semillas de tarwi.

Nº	FECHA	SEMILLAS	FECHA	G	FECHA	1er CAMBIO	2do CAMBIO	3er CAMBIO	C*	M*
1	17/05/2010	100	19/05/2010	80 G	26/05/2010	30 H*	75	60	10	30
2	10/06/2010	100	14/06/2010	45 G	17/06/2010	69 H	50	48	18	34
3	25/06/2010	100	06/07/2010	80 G	20/07/2010	74 H	70	60	25	15
4	15/07/2010	100	10/07/2010	40 G	25/07/2010	32 H	21	19	30	51
5	22/07/2010	100	03/08/2010	40 G	18/08/2010	38 H	35	31	26	43
6	03/08/2010	100	18/08/2010	78 G	02/09/2010	75 H	70	67	10	23
7	13/08/2010	100	29/08/2010	85 G	06/09/2010	80 H	-----	-----	-----	20
8	18/08/2010	100	30/08/2010	89 G	08/09/2010	86 H	-----	-----	-----	14

G= Numero de Germinados, H*= Hipocotilos, C*= Numero de Contaminados, M*= Numero de Muertos

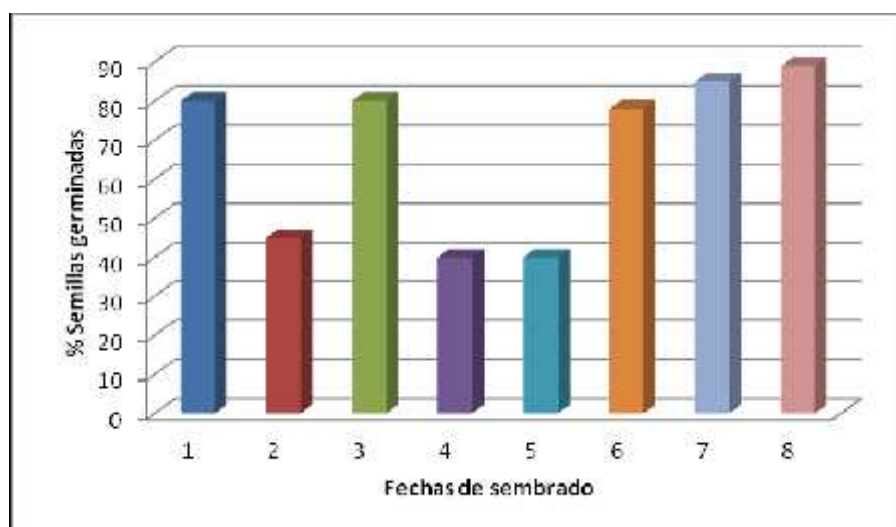


FIGURA Nº14. Germinación de semillas de tarwi: 1:17/05/2010, 2: 10/06/2010, 3: 25/06/2010, 4: 15/07/2010, 5: 22/07/2010, 6: 03/08/2010, 7: 13/08/2010, 8: 18/08/2010. IIFB (2010).

☞ Pasado los dos a tres días después del sembrado de las semillas, se observó si había algún cambio en las semillas, en algunos casos se encontraban semillas contaminadas por hongos, algunos presentaban necrosis y los demás simplemente no existía germinación. Transcurrida una semana después del sembrado para la germinación se trasvasaron las semillas que habían germinado a un medio de cultivo sólido para obtener las vitro-plantas de tarwi, estas son muy

susceptibles al cambio de temperatura y a la contaminación por lo cual se trabajó en un ambiente estéril.



FIGURA Nº15. Imagen de la generación de las vitro-plantas, después de tres semanas de germinación. IIFB (2010).

☞ Transcurridos los dos meses de germinación de los hipocotilos, se pudo observar que las vitro-plantas comienzan el proceso de necrosis y posteriormente mueren, es posible que este proceso se deba al poco espacio que tienen para desarrollarse o que el medio de cultivo necesita mas suplementos nutritivos que contribuyan al mantenimiento de estas vitro-plantas.



FIGURA Nº16. Imagen de la generación de las vitro-plantas, después de cinco semanas. IIFB (2010).

6.5 SEMBRADO DE LOS HIPOCOTILOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO CON VARIACIÓN DE LAS FITOHORMONAS:

CB Después de haber obtenido las vitro-plantas se procedió al sembrado de los hipocotilos en los diferentes tratamientos, para este fin, se utilizaron hipocotilos que tenían una semana de germinación, esto por que se había comprobado con anterioridad, que si se utilizaban hipocotilos con un tiempo de vida superior a siete días, al momento de realizar los cortes se observó resequedad y un orificio que atravesaba el interior de los hipocotilos. Posteriormente cuando se los sembraba en los distintos tratamientos para la generación de callos estos cortes se secaban a la segunda semana y no presentaban ningún cambio morfológico.

CB En cambio los hipocotilos de las primera semana presentaban un color verde claro y al momento de realizar los cortes se podía apreciar la firmeza, y no dificultaba los cortes, se realizaron cortes de aproximadamente 3 mm y estos fueron implantados en los distintos medios de cultivo que presentaban distinta combinación y concentración de fitohormonas.

6.6 GENERACION DE LOS CALLOS DE tarwi:

CB Se utilizaron distintas combinaciones de fitohormonas a distintas combinaciones con el propósito de encontrar una concentración óptima de fitohormonas para la generación de callos de tarwi. Para este propósito una vez que se inocularon los hipocotilos a los medios de cultivo se observó a la tercera semana los cambios que se habían generado.

☞ Para la primera combinación que era ANA/KIN, no se observó ningún crecimiento, los cortes presentaban un aspecto de color café producto de oxidación del tejido vegetal, en la combinación 10/0 ANA/KIN se observaron dos contaminados los cuales fueron aislados y posteriormente desechados.



FIGURA N°17. Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación ANA/KIN en todas las concentraciones. IIFB (2010).

☞ Un aspecto similar presentaban los cultivos de la combinación 2,4D/BAP en todas las concentraciones donde los cambios celulares no se podían apreciar con claridad. No habían contaminados en ninguna de las concentraciones.



FIGURA N°18. Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación 2.4D/BAP en todas las concentraciones. IIFB (2010).

☞ Para la combinación ANA/BAP se llega a apreciar los primeros cambios en los cortes implantados en el medio de cultivo en la concentración 1/10 ya que en ocho tubos se observa el crecimiento de la masa celular presentaban un color verde claro y no se aprecia el orificio en el medio de los cortes como en las anteriores concentraciones ANA/KIN y 2,4D/BAP, esto posiblemente se debió a que para las dos anteriores concentraciones se utilizó cortes de hipocotilos de mayores días de germinación, en cambio para esta combinación de fitohormonas lo que utilizamos fueron hipocotilos de la primera semana de germinación.



FIGURA Nº19. Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación ANA/BAP en todas las concentraciones. IIFB (2010).

☞ Para la combinación 2,4D/KIN aunque la diferenciación no es muy notoria en las concentraciones 1/0.5 y 5/0.1 se aprecia el cambio morfológico y los cortes han aumentado de tamaño presentan un aspecto hidratado y no hubo ninguna contaminación.



FIGURA Nº20. Imagen de la generación de callos a la tercera semana de la combinación 2,4D/KIN en todas las concentraciones. IIFB (2010).

☞ Pero paralelamente a estos tratamientos también se realizó el sembrado de las raicillas terminales de la germinación del tarwi, se plaquearon por tratamiento ocho placas Petri a distintas concentraciones y combinaciones de fitohormonas como se lo hizo para los tubos de ensayo. En cada placa se sembraron de cuatro a seis cortes de las raicillas en medio Murashige-Skoog sólido, transcurridas las siete semanas después del sembrado se pudo observar gran cantidad de placas contaminadas en varias concentraciones a diferentes combinaciones, pero en la combinación ANA/KIN a las concentraciones de; 0.1/5, 1/1 y 1/0.5 se observó el crecimiento y la formación de callos friables, de consistencia dura y de color café.



FIGURA Nº21. Imagen de la generación de callos de la séptima semana de las combinaciones ANA/KIN en las concentraciones de 0.1/5, 1/1 y 1/0.5 en placas Petri. IIFB (2010).

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN FÁRMACO BIOQUÍMICAS

☞ Para la séptima semana los cambios eran mas notorios en los tubos de ensayo de los diferentes tratamientos, el crecimiento celular aumento con relación a la tercera semana, encontrándose cuatro concentraciones de diferentes combinaciones de fitohormonas las cuales generaron mejores resultados que los demás tratamientos y se lo aprecia el la tabla N° 6.

TABLA N°6: Control de generación de callos utilizando las siguientes combinaciones de fitohormonas ANA/KIN, 2.4D/BAP, ANA/BAP y 2.4D/BAP a la Séptima Semana de realizado el sembrado de los tarwi. IIFB (2010).

T*	N	COMBINACION	C*	CAMBIO MORFOLOGICO	COLORACION	CALLOS	N°C	OBSERVACIONES
1	25	ANA/KIN	0/10	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> CON RESPECTO A LAS OTRAS SEMANAS NO HAY MUCHO CRECIMIENTO LOS CORTES DE LA MAYORIA DE LOS TUBOS TIENEN UN ASPECTO DE RESEQUEDAD </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> CAFÉ CLARO-OSCURO </div>	3	----	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> AL COMPLETARSE LA SEPTINMA SEMANA SE PUEDE OBSERVAR QUE NO HAY MUCHA TRANSFORMACIÓN LA GENERECION DE CALLOS ES MUY POCA </div>
2	25		0,1/5			9	----	
3	25		0,5/1			----	----	
4	25		1/1			----	----	
5	25		1/0,5			4	----	
6	25		5/0,1			4	----	
7	25		10/0			----	2	
1	25	2,4D/BAP	0/10	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> EN TODAS LAS COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES HUBO CRECIMIENTO CELULAR LOS CALLOS SE FORMARON PERO SON DUROS CON VARIACIÓN DE COLOR </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> CAFÉ OSCURO </div>	----	----	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> EN TODAS ESTAS CONCENTRACIONES SE OBSERVO EL CRECIMIENTO DE CALLOS </div>
2	25		0,1/5			----	1	
3	25		0,5/1			4	----	
4	25		1/1			----	----	
5	25		1/0,5			----	----	
6	25		5/0,1			----	----	
7	25		10/0			1	----	
1	25	ANA/BAP	0/10	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> EN TODAS LAS COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES HUBO CRECIMIENTO CELULAR LOS CALLOS SE FORMARON PERO SON DUROS CON VARIACIÓN DE COLOR </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> CAFÉ VERDE-CLARO </div>	13	----	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> EN TODAS ESTAS CONCENTRACIONES SE OBSERVO EL CRECIMIENTO DE CALLOS </div>
2	25		0,1/5			7	----	
3	25		0,5/1			5	----	
4	25		1/1			1	----	
5	25		1/0,5			16	----	
6	25		5/0,1			17	----	
7	25		10/0			12	----	
1	25	2,4D/KIN	0/10	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> EN TODAS LAS COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES HUBO CRECIMIENTO CELULAR LOS CALLOS SE FORMARON PERO SON DUROS CON VARIACIÓN DE COLOR </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> CAFÉ OSCURO </div>	19	----	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> EN TODAS ESTAS CONCENTRACIONES SE OBSERVO EL CRECIMIENTO DE CALLOS </div>
2	25		0,1/5			15	----	
3	25		0,5/1			6	----	
4	25		1/1			20	----	
5	25		1/0,5			23	----	
6	25		5/0,1			12	----	
7	25		10/0			13	----	

T*= Número de tubo, N°= Número de replicas por experimento, C*= Concentraciones de las combinaciones de fitohormonas, N°C= Número de contaminados.

☞ Pasada la séptima semana observamos que en la combinación ANA/KIN, se llegaron a formar callos friables y la combinación que más transformaciones tuvo es la 0.5/1, en esta concentración hubo 9 callos friables generados del total de 25 tubos. El porcentaje de transformación de los callos generados solo llega a un 36% para esta combinación y se lo puede observar en la Figura N°22.

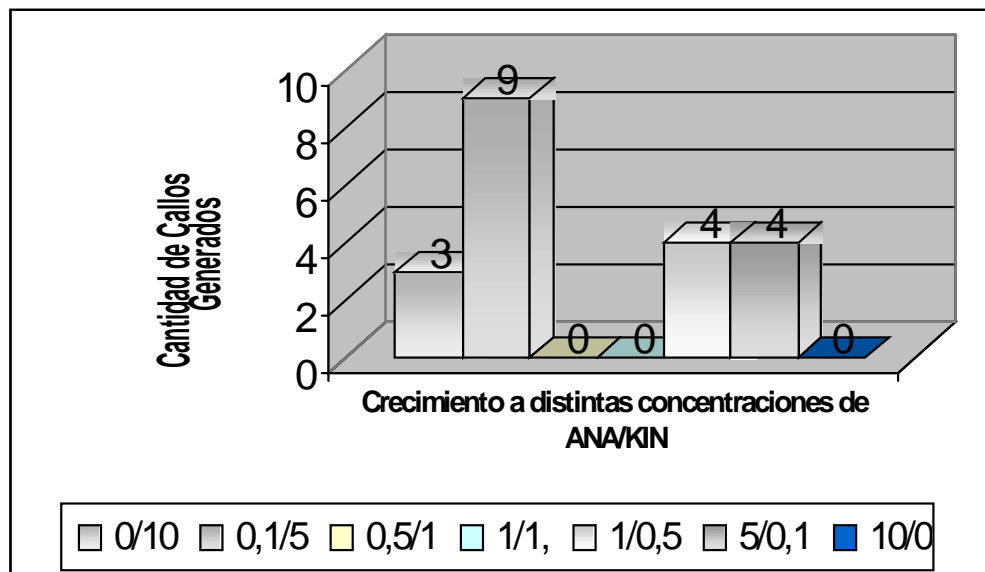


FIGURA N°22. CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS ANA/KIN A DISTINTAS CONCENTRACIONES

☞ Para la combinación 2,4D/BAP no hubo mucho cambio en cuanto al aspecto de los cortes que se habían sembrado ya que el mayor rendimiento fue en la concentración 0.5/1, y solo se generaron 4 callos friables, en las demás concentraciones no hubo crecimiento, los cortes solo se oxidaron cambiando su color de verde claro a café oscuro y posteriormente se secaron. En este caso el porcentaje de transformación es mas bajo que el de la combinación ANA/KIN ya que solo representa el 16% y se puede apreciar en la siguiente Figura N° 23

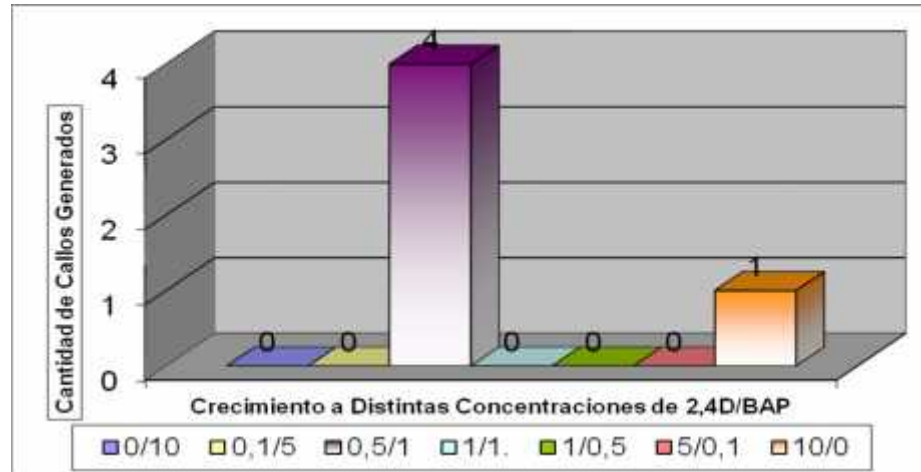


FIGURA23. CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS 2,4D/BAP A DISITNTAS CONCENTRACIONES

En la combinación ANA/BAP se pudo observar un mejor rendimiento que en las anteriores combinaciones debido a que la generación de callos para las concentraciones 0/10, 1/0.5, 5/0.1 y 10/0, fue elevada en comparación con las otras concentraciones, es importante mencionar que se generaron callos en todas las concentraciones pero las demás no tuvieron elevado rendimiento como las mencionadas. El mayor porcentaje de generación de callos es el 68% de la combinación 5/0.1 y se puede apreciar en la figura N° 24.

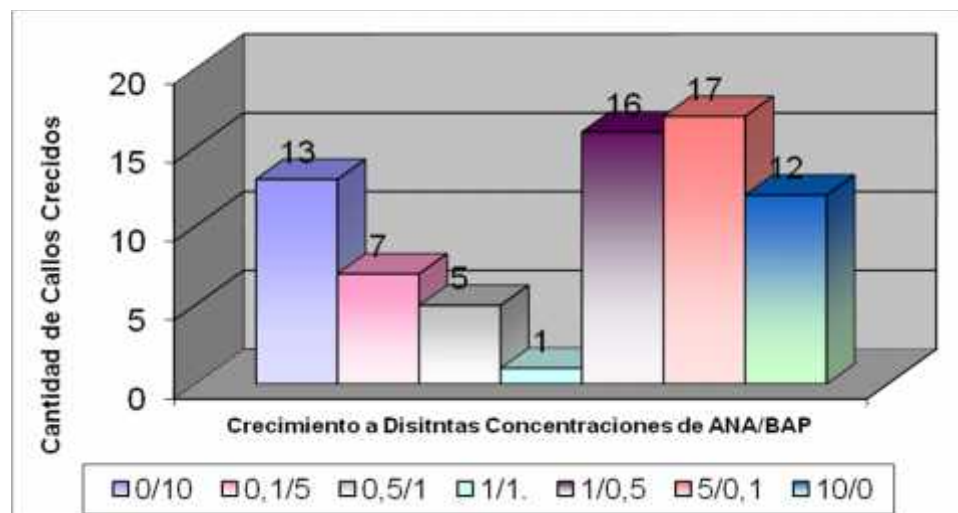


FIGURA N°24. CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS ANA/BAP A DISITNTAS CONCENTRACIONES

En la última combinación que es 2.4D/KIN se aprecia mejor la generación de callos en todas las concentraciones, donde hubo mejor crecimiento de callos es en las concentraciones 0/10, 1/1 y 1/0.5. Se puede decir que esta combinación es la mejor para la obtención y generación de callos de Tarwi, debido a que hubo un 92% de formación de callos en la concentración 1/0.5 que es definitivamente mayor al de los anteriores resultados obtenidos de las anteriores combinaciones y se puede apreciar en la figura N° 25.

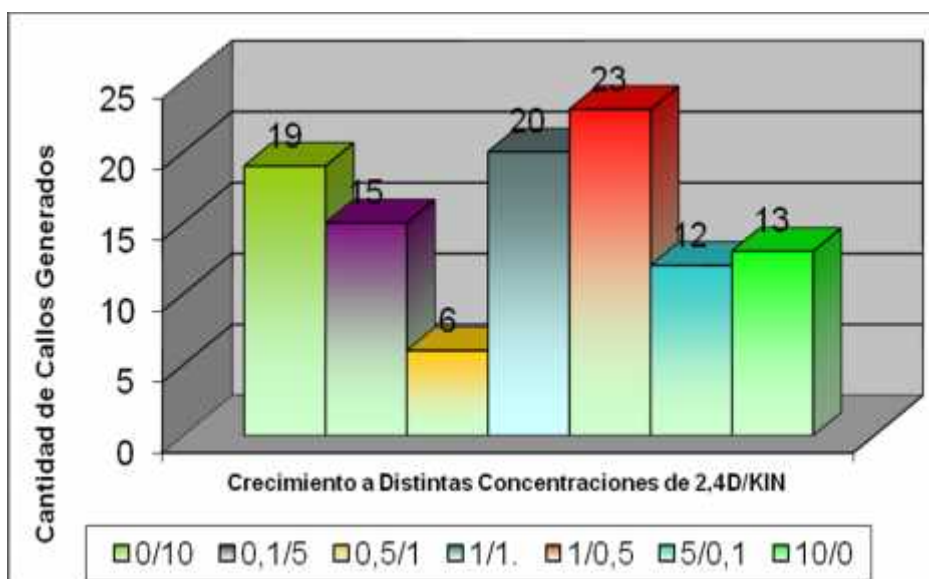


FIGURA N°25. CANTIDAD DE CALLOS GENERADOS A LA SÉPTIMA SEMANA CON LA COMBINACIÓN DE LAS FITOHORMONAS 2,4D/KIN A DISTINTAS CONCENTRACIONES

Es importante mencionar que con respecto al control hubo un crecimiento que se puede comparar debido a que los tubos del control solo se necrosaron y no hubo ningún cambio celular.

Según el trabajo de determinación de las condiciones de cultivo de *Lupinus Mutabilis* Sweet (tarwi) cultivados a partir de meristemas, (Marcos Leonardo Antequera Murillo-1999),

realizaron distintas combinaciones de fitohormonas: KIN/ANA, BAP/ANA y BAP/KIN a diferentes concentraciones, donde para KIN/ANA hubo un rendimiento del 50% de generación de callos en la concentración 0.8/0.4. De la misma manera en la combinación BAP/ANA y a la concentración de 0.8/0.4 hubo una generación de callos del 50% con relación a las demás concentraciones empleadas. Para la combinación de BAP/KIN en la concentración de 0.8/0.4 hubo mayor formación de callos ya que se obtuvo un 75%, es mas de la mitad y se ve un mejor rendimiento en esta combinación en relación a las dos anteriores combinaciones.

CB Realizando una comparación de los dos trabajos se puede decir que las combinaciones para la formación de callos con mayor porcentaje es distinto ya que en el trabajo realizado el mayor porcentaje de formación de callos es la combinación de 2,4D/KIN con un rendimiento de 92%, no obstante podemos ver que en ambos trabajos se hace referencia a la fitohormona KIN, la cual potencia el crecimiento celular de los callos a diferentes concentraciones.

CB Haciendo una relación para las combinaciones de fitohormonas, se puede evidenciar que existe una diferencia en las mimas, corroborada por el análisis estadístico realizado en la valor de p. Para la variable combinación de fitohormonas esta es estadísticamente significativa (p 0.05). En cambio respecto a las concentraciones, las mismas no presentan diferencia estadística alguna.

**Análisis de varianza: Generación de callos versus
Combinación de fitohormonas (C1); Concentración de
fitohormonas (C2).**

Source	DF	SS	MS	F	P
C1	3	960,86	320,286	16,07	0,000
C2	6	130,21	21,702	1,09	0,406
Error	18	358,64	19,925		
Total	27	1449,71			

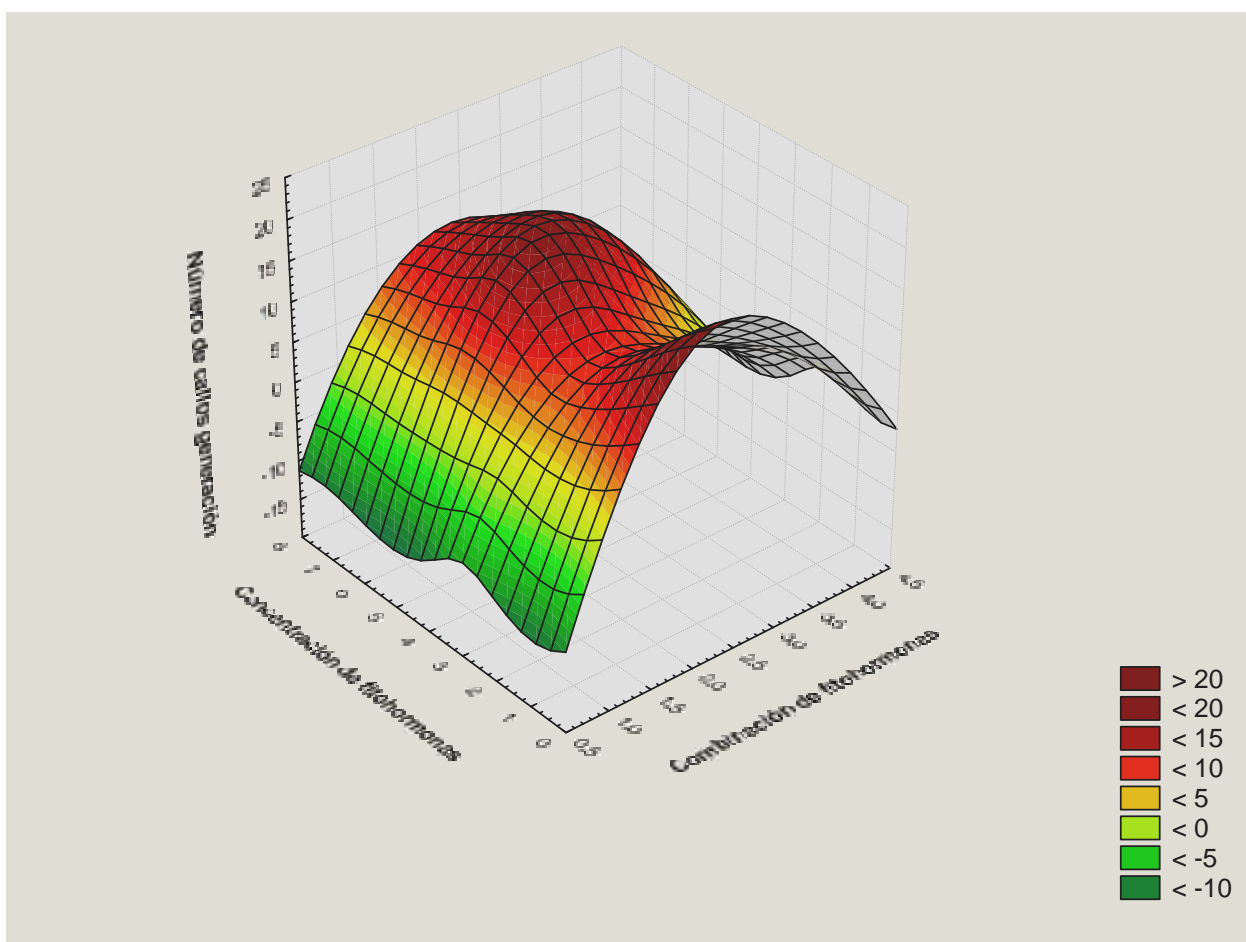


Figura :Superficie de respuesta del diseño factorial, del numero de callos generados de *Lupinus mutabilis* a diferentes combinaciones y concentraciones de fitohormonas (IIFB,2010)

☞ En este caso se puede decir que la generación de callos depende mucho de las condiciones y las combinaciones de fitohormonas con las que se preparan los medios de cultivo, ya que de este factor dependerá el crecimiento y el cambio celular para la generación de callos friables, pero también es importante que no exista contaminación ni cambios bruscos de temperatura en la cámara aclimatadora para que se pueda obtener un mejor rendimiento.

VII. CONCLUSIONES:

- ☞ La combinación adecuada de fitohormonas para la formación de callos es 2,4D/KIN con un rendimiento de 92%, cuando se emplea la concentración de 1/0.5 mg/L.
- ☞ Para la germinación de las semillas de tarwi, se estableció que el medio líquido Murashige-Skoog, proporciona las mejores condiciones de crecimiento respecto al medio sólido.
- ☞ Se realizó la micro propagación de vitro-plantas, estableciendo que la variedad de *Lupinus mutabilis* (tarwi), solo puede tolerar hasta cuatro replicaciones.
- ☞ Se estableció que no existen diferencias en la generación de callos, cuando se hace referencia a las diferentes concentraciones de fitohormonas..

VIII. RECOMENDACIONES :

- ☞ Para posteriores estudios de la generación de callos de tarwi, se recomienda realizar las siguientes combinaciones de fitohormonas: ANA/2.4-D y 2.4-D/BAP, para obtener una variación mas amplia y tener mas opciones para el crecimiento de callos de tarwi, debido a que en la bibliografía citada, no se encontró este tipo de combinación.

ANEXOS

ANEXO I

☞ MATERIALES UTILIZADOS

- ☞ Material de protección.(Guardapolvo, gorro, barbijo y guantes)
- ☞ Mechero
- ☞ Encendedor
- ☞ Frascos de cultivo (Pequeños y grandes)
- ☞ Pinzas
- ☞ Escalpelo
- ☞ Cuchillas
- ☞ Espátula pequeña y grande
- ☞ Pipetas (5 y 10mL)
- ☞ Micropipetas
- ☞ Propipeta
- ☞ Vasos de precipitados
- ☞ Erlenmeyers (100, 250 y 500mL)
- ☞ Matraz aforado (250mL)
- ☞ Probeta
- ☞ Agitador magnético
- ☞ Tips
- ☞ Algodón
- ☞ Gasa
- ☞ Parafilm
- ☞ Marcador indeleble
- ☞ Papel filtro
- ☞ Piceta
- ☞ Placas petri
- ☞ Tubos con tapa
- ☞ Conservadores
- ☞ Papel madera
- ☞ Bolsas nylon

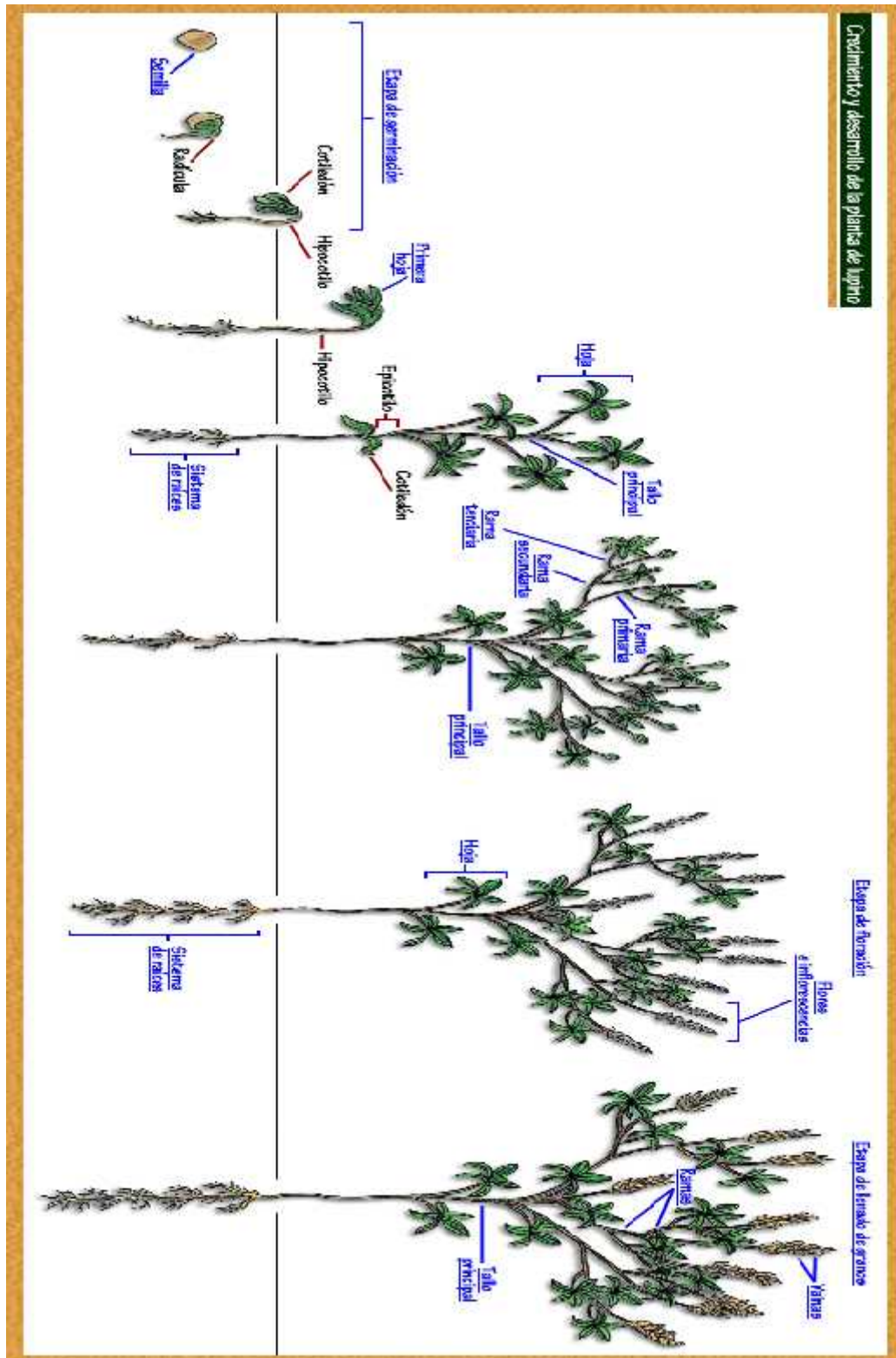
- ☞ Filtros
- ☞ Porta-filtros
- ☞ Jeringas
- ☞ Viales

☞ **REACTIVOS**

- ☞ Alcohol al 70%
- ☞ Solución de Hipoclorito de sodio al 2.5%
- ☞ Agua destilada estéril
- ☞ Soluciones STOCK para la preparación del medio Murashige- Skoog
- ☞ Soluciones de Fitohormonas
 - Solución de ácido 2,4 diclorofenoxiacético
 - Solución de 6 bencil amino purina
 - Solución de kinetina
 - Solución de ácido naftalenacetico
- ☞ Agar-Agar
- ☞ Sacarosa

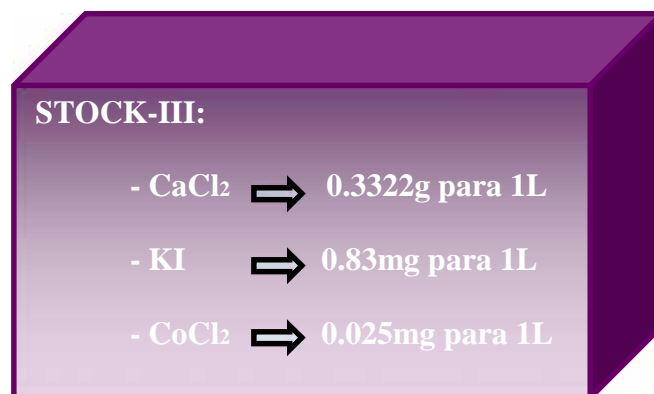
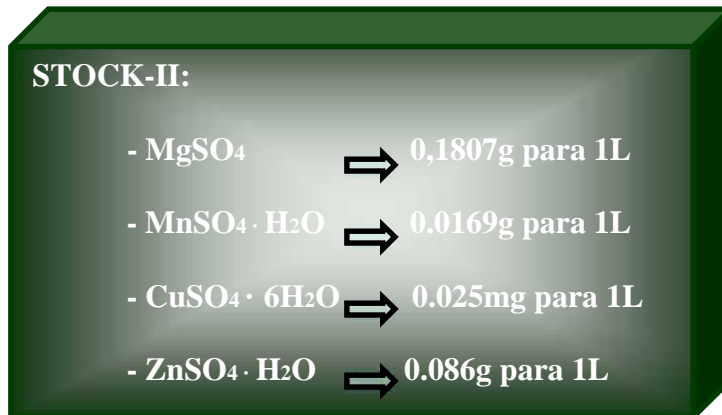
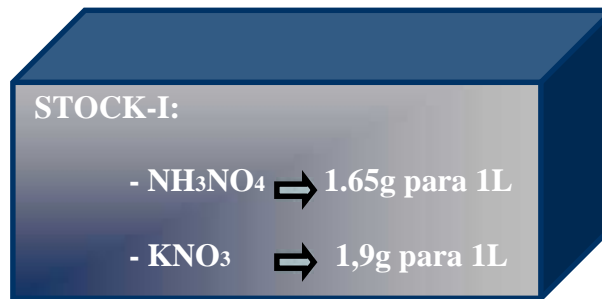
ANEXO 2

CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE UNA PLANTA DE *Lupinus*



ANEXO 3

☞ PARA PREPARAR LAS SOLUCIONES STOCK PESAR LOS SIGUIENTES REACTIVOS:



STOCK-IV:

- KH_2PO_4 \Rightarrow 170mg para 1L
- H_3BO_3 \Rightarrow 6.2mg para 1L
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ \Rightarrow 0.25mg para 1L

STOCK-V:

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ \Rightarrow 27.8mg para 1L
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ \Rightarrow 37.3mg para 1L

STOCK-VI:

- Ácido Nicotínico \Rightarrow 0.5mg/mL
- Piridoxina \Rightarrow 0.5mg/mL
- Tiamina \Rightarrow 0.1mg/mL
- Mioinisol \Rightarrow 100mg/mL
- Glicina \Rightarrow 2mg/L