



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO *IN VITRO* DE *Mimosa pudica* L., LA PLANTA SENSITIVA DE
MÉXICO

Tesis presentada para obtener el título de:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

LUIS FERNANDO OLVERA URIBE

TUTOR:

DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

Abril 2018

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Generalidades de la familia Fabaceae.....	4
2.2. <i>Mimosa pudica</i> Linneo	4
2.2.1. Descripción botánica	6
2.2.2. Distribución y hábitat	8
2.2.3. Importancia de <i>Mimosa pudica</i> L.	8
2.2.3.1. Ornamental.....	8
2.2.3.2. Medicina tradicional y farmacológica.....	8
2.2.3.3. Científica	10
2.2.3.4. Ecológica.....	11
2.3. Cultivo de tejidos vegetales	11
2.3.1. Explante	13
2.3.2. Medios de cultivo y reguladores de crecimiento.....	14
2.3.3. Aplicaciones de cultivo de tejidos vegetales	16
2.3.4. Problemática en el establecimiento de cultivo de tejidos vegetales	17
2.4. Cultivo de tejidos vegetales en fabáceas.....	17
2.4.1. Estudios de cultivo <i>in vitro</i> en <i>Mimosa pudica</i> y fabáceas afines	18
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. General	23
4.2. Particulares.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Localización experimental.....	24
5.2. Material biológico	24
5.3. Desinfección y siembra de semillas <i>in vitro</i>	25
5.4. Descripción del crecimiento de las plántulas germinadas <i>in vitro</i>	26

5.5. Plántulas <i>in vitro</i> : selección, obtención y siembra <i>in vitro</i> de explantes para inducción regenerativa	26
5.6. Plantas adultas: desinfección, obtención y siembra <i>in vitro</i> de los nudos para inducción regenerativa	28
6. RESULTADOS	31
6.1. Desinfección de semillas	31
6.2. Germinación <i>in vitro</i>	31
6.3. Crecimiento de las plántulas y obtención de explantes	32
6.4. Plántulas <i>in vitro</i> : respuesta regenerativa de los explantes	36
6.5. Plantas adultas: desinfección y respuesta regenerativa de los nudos	38
7. DISCUSIÓN	48
8. CONCLUSIONES	52
9. LITERATURA CITADA	53

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el cultivo *in vitro* de *Mimosa pudica*, donde se logró la siembra aséptica (100%) de semillas sobre medio MS al 50/100%, en el que se obtuvo el 29.7% de germinación *in vitro* en 2-6 días después de la siembra. Se describió el desarrollo morfológico de las plántulas *in vitro* hasta haber cumplido 5 semanas de edad, dado que a esa edad se extrajeron los explantes de hojas (pinnas y peciolas) y de yema apical para su cultivo en medio MS al 50/100% bajo el testigo y 3 tratamientos (0/1.5, 0.5/1 y 0.5/1.5 mg/l de ANA/Kin), de los cuales solo 2 explantes de yema apical pertenecientes al tratamiento 1.5 Kin respondieron y formaron brote y callo a las 2 semanas. Los nudos obtenidos de plantas adultas sembrados en medio MS al 100% suplementado con antioxidante e ingredientes nutricionales extras bajo el testigo y 7 tratamientos (1 y 1.5 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de ANA, 0.5/1 y 0.5/1.5 mg/l de ANA/BAP y 0.5/1 y 0.5/1.5 mg/l de ANA/Kin) produjeron ≤ 3 brotes/explante a las 4 semanas después de su cultivo. Los mejores tratamientos que dieron mayor promedio de número de brotes por explante fueron 0.5 ANA/1.5 Kin y 0.5 ANA/1 Kin con 1.33 ± 0.33 y 0.67 ± 0.25 respectivamente. Por otra parte, la oxidación y la contaminación de los explantes fueron bastante evidentes en los resultados obtenidos de este protocolo, por lo que su cultivo fue poco eficaz, pero significativo para reforzar y mejorar su estudio en futuros trabajos sobre esta especie.

1. INTRODUCCIÓN

Mimosa pudica L., llamada comúnmente como “dormilona”, “sensitiva”, “morivivi”, “no me toques”, entre otros nombres (Martínez, 1979), es una pequeña planta arbustiva originaria de América Tropical perteneciente a la familia Fabaceae, cuya característica notable es el cierre rápido de sus hojas en respuesta al tacto, desarrollado como un mecanismo de defensa ante la herbivoría y en parte, representa el ritmo circadiano de la especie (Kumar *et al.*, 2009).

Esta fabácea al ser una especie muy conocida en gran parte del mundo por sus movimientos foliares, ha tenido gran importancia en la vida del hombre bajo ciertos aspectos; es cultivada en viveros para su venta como planta ornamental (Stevens *et al.*, 2001); en algunas comunidades rurales es utilizada para la medicina tradicional (Joseph *et al.*, 2013), en farmacología se evalúan los efectos de los principios activos presentes en dicha planta sobre algunos padecimientos (Azmi *et al.*, 2011) y en la ciencia es empleada como modelo de estudio para trabajos de investigación experimental (Stevens *et al.*, 2001). Sin embargo, a nivel ecológico esta especie es considerada como maleza, que invade fácilmente terrenos perturbados generados por la acción humana, que en raras ocasiones, causa en algunos cultivos importantes baja producción de las cosechas, posiblemente por la competencia ejercida por espacio, luz, agua y nutrientes del suelo (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Dentro de la familia a la que pertenece *Mimosa pudica* L. existen diversas publicaciones sobre trabajos de cultivo de regeneración e inclusive propagación *in vitro* a partir de tejidos vegetales realizados en distintas especies de fabáceas, principalmente aquellas que son de gran interés agrícola e industrial. Se busca ampliar esfuerzos en el mejoramiento y producción de dichas plantas a través de esta biotecnología vegetal, por lo que se tiene que precisar, desarrollar y optimizar las técnicas en cuanto a selección del explante, la desinfección del explante, la concentración de fitorreguladores, el medio de cultivo y las condiciones adecuadas que proporcione la cámara de incubación del laboratorio para inducir la formación y desarrollo de brotes (organogénesis), embriones somáticos (embriogénesis) de

manera directa (a partir del explante) o indirecta (por medio de callo), que dependerá mucho de la especie con la que se esté manejando, debido a que no todas responden a los mismos tratamientos (Parrott *et al.*, 1992; Ganapathi *et al.*, 2003).

Para el caso de *Mimosa pudica* L. no se ha reforzado su estudio desde que se estableció su primer cultivo *in vitro* en 1982 por Gharyal y Maheshwari (citado por Parrott *et al.*, 1992), de manera que en los primeros años del siglo XXI han surgido nuevos protocolos que buscan reforzar y generar conocimiento al establecer su cultivo en base a sus propias técnicas, de modo que a corto o largo plazo se logre propiciar futuros estudios sobre dicha especie para otros fines.

A manera de contribuir al conocimiento de las técnicas de cultivo *in vitro* en *Mimosa pudica*, el presente trabajo se planteó como objetivo cultivar explantes obtenidos de plántulas *in vitro* y plantas adultas para su inducción y el tipo de respuesta regenerativa que puedan desarrollar.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la familia Fabaceae

Las fabáceas o mejor conocidas como leguminosas debido a que son fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre (Rodríguez y Porras, 2002), son una de las 6 familias de angiospermas más diversas a nivel mundial y mejor representadas en México (Rzedowsky, 1991). Comprenden una riqueza florística de 727 géneros y cerca de 19,325 especies; mientras que en el país se tiene un registro actualizado con alrededor de 140 géneros y 1,850 especies (Martínez-Bernal *et al.*, 2008). Este grupo cuenta con una gran variedad de formas biológicas, que pueden ser desde árboles o hierbas hasta trepadoras o rastreras, por el cual su ciclo de vida puede ser anual o perenne (Burkart, 1978; Rodríguez y Porras, 2002).

Esta familia se destaca por un número elevado de especies útiles y las grandes variedades de productos que suministra a la economía humana, por lo tanto, los beneficios que se obtienen de estas plantas son de aspectos alimenticios, medicinales, industriales y ornamentales, inclusive como forrajeras y de abono verde (Rodríguez y Porras, 2002). Por otra parte, a nivel ecológico son pocas las especies de fabáceas que son nocivas o invasivas en terrenos agrícolas, debido a la competencia ejercida por nutrientes y espacio. La gran mayoría viven en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* como fijadoras del nitrógeno atmosférico. Debido a esta simbiosis, las fabáceas tienen un importante papel en el Ciclo del Nitrógeno y en el mejoramiento de suelos perturbados dentro de los ecosistemas (Burkart, 1978).

2.2. *Mimosa pudica* Linneo

Conocida por diversos nombres en la República Mexicana como “dormilona”, “sensitiva” “morivivi”, “no me toques”, “mimosa”, “vergonzosa”, “doncella”, “tapa vergüenza” y “yerba vergonzosa” (Martínez, 1979), es un pequeño arbusto perenne (Foto 1) que fácilmente es reconocible por plegar de manera rápida los folíolos que conforman sus hojas en respuesta al tacto, debido a que en el ángulo

del folíolo se producen cambios de potencial osmótico de iones K^+ y Cl^- , que induce la turgencia en las vacuolas de las células motoras del pulvínulo (células flexoras y extensoras); una estructura especializada localizada en la base de los peciólulos de la hoja (Figura 1) que estimula a que se abran o se cierren, y en ocasiones hace descender toda la hoja (Weintraub, 1952), aunque los iones Ca^{2+} pueden también influir en la variación de turgencia en el pulvínulo (Kumar *et al.*, 2009).



Foto 1. Planta sensitiva (*Mimosa pudica* L.)

Este estímulo natural presente en la planta es conocido como sismonastia, un tipo de movimiento foliar mecánico que le sirve como mecanismo de defensa ante la herbivoría; al replegarse en un gran porcentaje, parece ser una planta mustia o marchita, aunque también es útil para no perder demasiada agua durante las horas de calor o para protegerse del viento reduciendo la superficie. Por otro lado, presenta una respuesta reversible a estímulos lumínicos conocida como nictinastia, que igual implica movimiento foliar, las cuales se encuentran extendidas durante el día y plegadas durante la noche, de manera que dicho estímulo representa el ritmo circadiano de la especie (Kumar *et al.*, 2009).

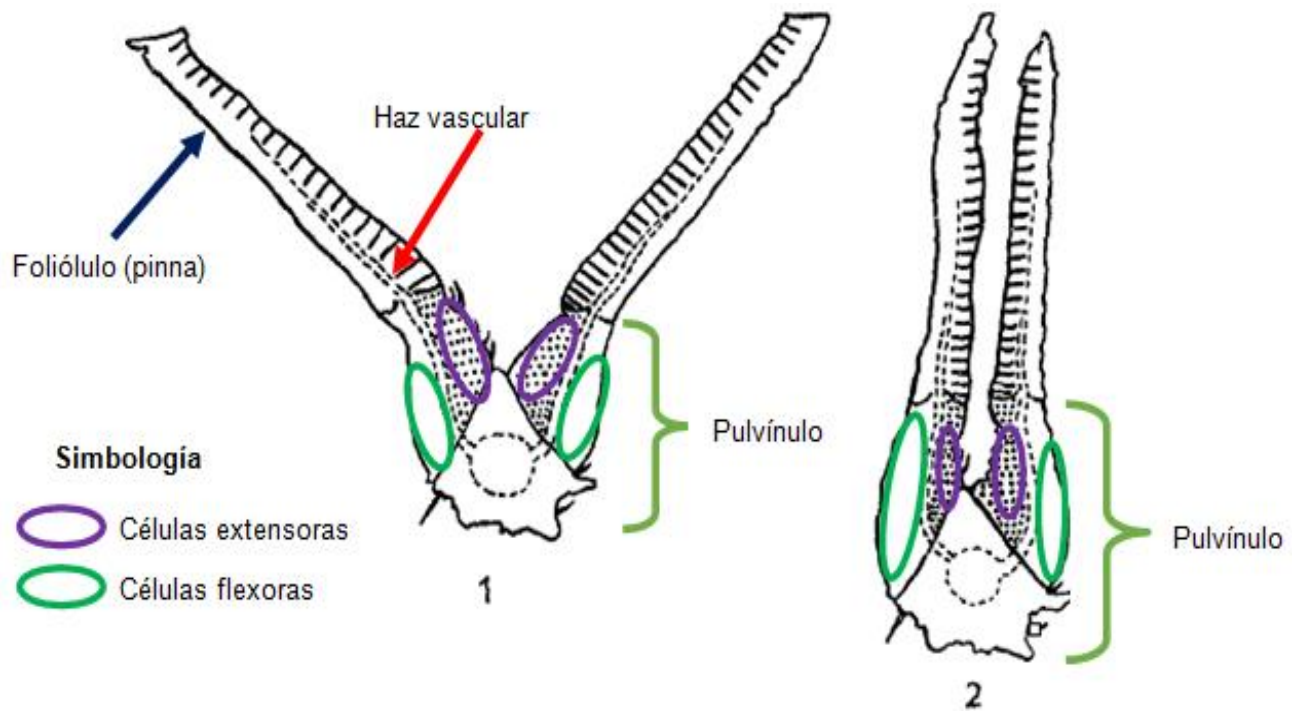


Figura 1. Pulvínulo de *Mimosa pudica*, encargada de la apertura (1) y cierre (2) foliar (Weintraub, 1952).

2.2.1. Descripción botánica

Es un pequeño arbusto perenne, sufruticosa, erecta o decumbente que puede medir desde 30 cm hasta 1 m de altura (Waterhouse, 1994; Stevens *et al.*, 2001).

Los tallos son de estriados a acostillados, a veces cubiertos de pelillos erguidos, con espinas (Barneby, 1991; Sousa *et al.*, 2009).

Sus hojas son alternas, compuestas (parecen ramas), consisten en un corto eje principal (llamado raquis) cerca de cuyo ápice parten de 1 a 2 pares de ejes secundarios (llamados raquillas), sobre los que se ubican, apretadamente, de 15 a 25 pares de hojillas (llamadas foliolos) linear-oblongas, de hasta 10 mm de largo y hasta 2.5 mm de ancho, puntiagudos o al menos terminados en una diminuta puntita, base asimétrica, con pelillos en los márgenes (Stevens *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2009).

La inflorescencia tiene las flores densamente agrupadas, formando grupos globosos llamados cabezuelas (de hasta 1.5 cm de diámetro) que se ubican en racimos y también solitarias en las axilas de las hojas. Las brácteas de la mitad a

dos tercios del largo de la corola (Burkart, 1979; Barneby, 1991; Sousa *et al.*, 2009).

Las flores tienen cáliz acampanado, muy pequeño (de un décimo del largo de la corola), terminado en dientes poco evidentes; la corola rosada, es acampanada y dividida hacia el ápice en 4 lóbulos triangulares, sin pelillos; estambres 4; el estilo parecido a los estambres pero más grueso y largo (Barneby, 1991; Waterhouse, 1994; Sousa *et al.*, 2009)

Los frutos son legumbres de 1.0-1.5 cm de largo, 3-4 mm de ancho, rectas a ligeramente curvadas, comprimidas entre las semillas, las valvas con 2-5 artejos (craspedios), glabras, sésiles, el margen largamente setoso, el ápice acuminado a cuspidado; cada fruto produce de 3-5 semillas, alcanzando a medir de 3.0-3.2 mm de largo, 2.5-3.0 mm de ancho y 1.0-1.2 mm de grosor; son lenticulares, de testa ocre, lisa a porosa, con línea fisural de 90% de extensión (Villaseñor y Espinoza, 1998; Martínez-Bernal *et al.*, 2008). Es indehiscente, no se abre por las 2 suturas como una legumbre típica, sino que se fragmentan los artejos que contiene en su interior cada uno una semilla (segmento monospermo) al momento de su diseminación, por lo cual quedan todavía dentro de la cubierta frutal (pericarpio), de tal forma que dejan el repleo o bastidor acompañado de grandes tricomas como una armadura, sin deshacerse por completo (Figura 2; Muller *et al.*, 2000).

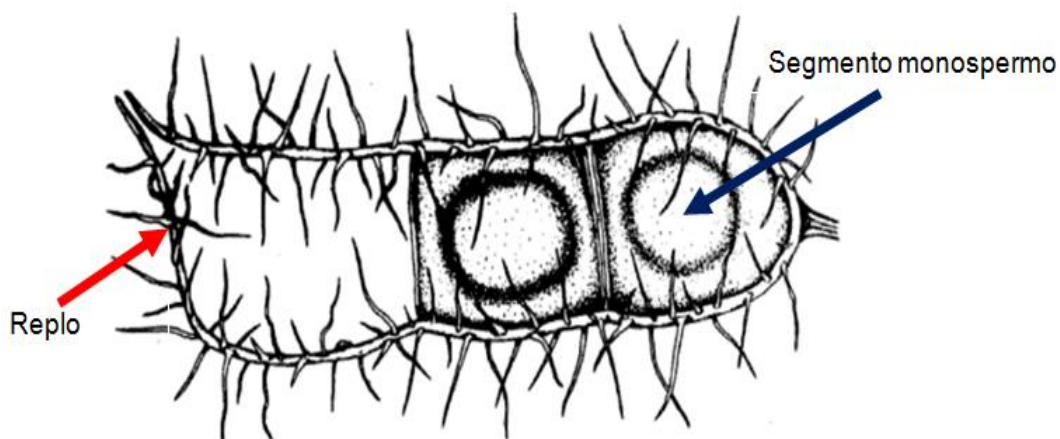


Figura 2. Fruto de *Mimosa pudica*: los segmentos monospermos indehiscentes que conforman la legumbre están unidos a un repleo (bastidor), que al madurar estas se desprenden sin deshacerlo (Muller *et al.*, 2000).

2.2.2. Distribución y hábitat

Es originaria de América Tropical, localizada en México, Centroamérica (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá) y Sudamérica (de Colombia a Brasil); actualmente esta especie se encuentra introducida en África, Asia y Australia (Villaseñor y Espinosa 1998; Stevens *et al.*, 2001).

En México, *Mimosa pudica* es muy común encontrarla en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Veracruz (Stevens *et al.*, 2001) en diversos hábitats como las Selva Alta Perennifolia; Selvas Medianas Subperennifolia y Subcaducifolia; Selva Baja Caducifolia primaria y perturbada; Bosque de Encino perturbado; cañadas; Matorrales; Pastizales; terrenos inundables; orillas de ríos; Pantanos; Dunas Costeras e incluso en campos de cultivo (Martínez-Bernal *et al.*, 2008).

2.2.3. Importancia de *Mimosa pudica* L.

2.2.3.1. Ornamental

Mimosa pudica L. es cultivada en viveros para su comercialización como planta de interior o para jardín, debido a la peculiaridad de sus hojas sensitivas, al ser considerada como un característica decorativa o estética (Stevens *et al.*, 2001). En México, esta especie es muy aprovechada en el comercio de plantas ornamentales por su fácil cultivo y belleza floral (Camargo-Ricarde *et al.*, 2001).

2.2.3.2. Medicina tradicional y farmacológica

En la India y en algunos países del sur y sudeste del continente Asiático, *Mimosa pudica* es utilizada para el tratamiento de ciertos males, entre ellos la lepra, la disentería amebiana, la leucodermia, la fatiga, el asma, la diarrea, la ictericia, la bronquitis, la impotencia, la fiebre biliosa y las hemorroides. También es muy efectiva para las infecciones urinarias, trastornos ginecológicos, enfermedades de

la piel, detiene el sangrado, permite el proceso de cicatrización de las heridas e inclusive alivia el dolor de muelas (Joseph *et al.*, 2013).

Sin embargo, en algunas entidades federativas de la República Mexicana se tiene poco registro sobre el gran valor medicinal que presenta *Mimosa pudica* para la comunidad rural e indígena (Camargo-Ricarde *et al.*, 2001); en Oaxaca y Veracruz es usada frecuentemente contra el insomnio como somnífero o sedante (Barrera, 1971; Calatayud, 1990). En Morelos, es utilizada en problemas ginecobstétricos; es antiabortivo, mejora la potencia sexual tanto en el hombre como en la mujer y es utilizada para la inflamación de matriz y como anticonceptivo (Gómez y Chong, 1985). En Puebla, es empleada para aliviar el mal de boca, la vista nublada, el sarampión y para que los niños puedan dormir bien (Martínez, 1987). En Tabasco, junto con otras plantas medicinales se usa contra la mordedura de víbora al aplicarse en la área afectada (Ortiz, 1987). Además, esta fabácea es beneficiosa para mitigar trastornos mentales como la ansiedad y el nerviosismo (Camargo-Ricarde *et al.*, 2001).

En la investigación farmacológica se ha comprobado que los extractos acuosos y etanólicos de cualquier parte anatómica de *Mimosa pudica* tienen efectos fisiológicos sobre el cuerpo humano para el tratamiento de ciertos padecimientos: los extractos acuosos obtenidos de raíces secas inhiben la miotoxicidad causada por mordedura de serpientes venenosas; de los vástagos se inducen la cicatrización de la piel y de las hojas presentan actividad enzimática antioxidante, tales como superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y polifenol oxidasa; en cuanto a los extractos etanólicos de la planta completa funcionan como antibiótico contra *Staphylococcus aureus*, de las hojas muestran efectos hiperglucémico y antidiabético; y en combinación hoja-semillas para el tratamiento contra el cáncer (Azmi *et al.*, 2011).

En el caso de la mimosina (Figura 3), un alcaloide tóxico presente en todas las partes anatómicas de dicha especie y en algunas otras especies del género *Mimosa* y todos los miembros del género *Leucaena* (Aguilar y Zolla, 1982), se ha encontrado que tiene potentes efectos antiproliferativos y apoptóticos (Azmi, *et al.*, 2011), además de que inhibe el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos

como *Alternaria spp.*, *Cercospora canescens*, *Colletotrichum indemuthianum*, *Diplodia natalensis*, *Sclerotium rolfsii*, *Dreschlera oryzae*, y *Rhizoctonia solani* (Xuan *et al.*, 2013).

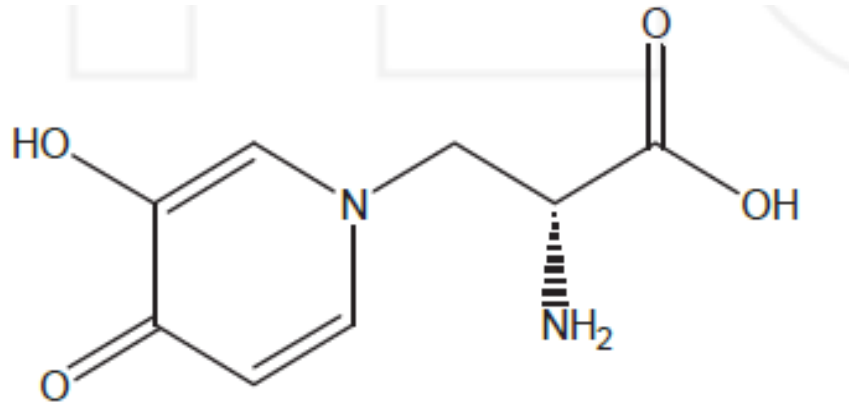


Figura 3. Estructura química de la mimosina (Xuan *et al.*, 2013)

2.2.3.3. Científica

Las hojas sensibles de *Mimosa pudica* L. la han convertido en objeto de estudio para trabajos de investigación experimental, con el fin de comprender más a fondo la morfo-fisiología de su notable característica (Stevens *et al.*, 2001). Balmer y Franks (1975) trabajaron con esta especie para evaluar las características contráctiles que consistió en medir la reacción fuerza-velocidad del pulvínulo a partir de la modificación de la ecuación de Hill, que normalmente se utiliza para describir el comportamiento de la contracción fisiológica del musculo de un animal vertebrado; los resultados obtenidos mostraron que los valores de contracción del movimiento sismonástico de la planta es casi idéntico a los movimientos típicos del músculo de un animal. Otro trabajo realizado por Volkov *et al.* (2010), en donde estudiaron la estimulación eléctrica y mecánica de la planta al utilizar un condensador que se conectó en los pulvínulos de la hoja con electrodos de platino para estimar con alta precisión la cantidad de energía eléctrica necesaria para inducir una respuesta bajo diferentes voltajes, del que se obtuvo al final una descripción cinética de los movimientos foliares con base a una elucidación detallada de aspectos bioquímicos y biofísica adicional.

2.2.3.4. Ecológica

Las especies del género *Mimosa* tienen un papel importante dentro de los ecosistemas, debido a que al igual que otros grupos de fabáceas, desarrollan nódulos fijadores de nitrógeno en sus raíces al asociarse con bacterias del género *Rhizobium*, lo que les da la capacidad de enriquecer el suelo (Camargo-Ricarde *et al.*, 2001). Sin embargo, *Mimosa pudica* juega un papel importante como especie oportunista al colonizar sitios perturbados resultantes de actividades humanas con fines agrícolas o de construcción, que propician las condiciones adecuadas para su desarrollo e invasión (Villaseñor y Espinosa, 1998). Además, es considerada como maleza importante en México y países tropicales del Sudeste Asiático al crecer en cultivos de maíz, frijol, sorgo, jitomate, caña de azúcar, soya, algodón, plátano, mango, café, papaya y cítricos, que en raras ocasiones puede causar baja producción de las cosechas, en especial, si son plantas de estatura media o baja, probablemente por la competencia ejercida por espacio, luz, agua y nutrientes del suelo (Waterhouse, 1994; Villaseñor y Espinosa, 1998).

2.3. Cultivo de tejidos vegetales

Uno de los avances alcanzados en las ciencias biológicas que ha permitido el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, además de incidir en su crecimiento y desarrollo para la propagación vegetativa dentro de un laboratorio al proveer todas las condiciones necesarias para dicho fin, es la utilización del cultivo de tejidos vegetales (CTV); rama de la biotecnología que involucra diferentes técnicas de cultivo de tejidos, órganos o células vegetales, que consiste en la regeneración de plantas a partir de explantes (fragmentos obtenidos de cualquier estructura vegetal: raíz, tallo, hojas, flores y frutos) cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, lo cual se basa en el principio de la Totipotencialidad Celular (propuesto por Haberlandt en 1902), que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa

(Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Segretín, 2006; Cedres-Gazó y Sharry, 2015).

Esta técnica sigue una secuencia de pasos básicos para poder llevar a cabo el cultivo *in vitro* en diferentes especies vegetales, consta de 4 fases (Castillo, 2004).

FASE 0: Preparación de la planta madre

Para obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado, se recomienda mantener a la planta madre, es decir la planta donadora, un prolongado período de tiempo que puede oscilar entre unos días a varias semanas en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades antes de su utilización en el cultivo *in vitro*.

FASE 1: Desinfección del material vegetal

Una vez preparada la planta madre, se extraerán los fragmentos conocidos como explantes, que pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, tallo, etc., a los que se realiza una adecuada desinfección para eliminar cualquier agente contaminante, los más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Aunque se logre superar desinfectar los explantes, también se corre el riesgo de que se oxiden, lo cual esta fase resulta crítica para el establecimiento de los cultivos.

FASE 2: Introducción del material *in vitro*

Luego de la desinfección superficial de los explantes se siembran en medio de cultivo con reguladores de crecimiento bajo condiciones asépticas de una campana flujo laminar. En un período de unos días o semanas aproximadamente (según el tipo de explante y la especie vegetal seleccionada) se espera que comience el proceso de regeneración de brotes o embriones según sea el caso, de tal forma que dé inicio el cultivo *in vitro*.

FASE 3: Multiplicación

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la fase 1 y 2 originen brotes o embriones; una vez establecido el cultivo *in vitro* al haber obtenido dichas respuestas regenerativas, periódicamente se deben subcultivar (siembra de material biológico ya establecido *in vitro*) en tubos de ensayo u otros recipientes adecuados con medio de cultivo nuevo, con el fin de aumentar el número de brotes o embriones por cada subcultivo, que dependerá de la especie vegetal y las condiciones del medio de cultivo utilizados para lograr dicho proceso.

2.3.1. Explante

Un explante puede ser cualquier fragmento vivo extraído de un tejido u órgano, incluyendo un pequeño grupo de células en suspensión o protoplastos, que tiene el único fin de ser utilizado en el cultivo *in vitro*. Sin embargo, la elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, éste variará de acuerdo al objetivo perseguido. En general, factores como el genotipo, la especie, la edad y el estado fisiológico de la planta, además del tipo de medio de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados bajo ciertas condiciones de pH, humedad, luz, temperatura e intercambio gaseoso son importantes a considerar para la regeneración de plantas (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Levitus *et al.*, 2010)

Otro aspecto importante a considerar del explante es el tamaño, factor que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que a mayor tamaño del explante son mayores las probabilidades de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración directa de órganos (Mroginski y Roca, 1991; Adema, 2015).

2.3.2. Medios de cultivo y reguladores de crecimiento

Para lograr una respuesta morfológica deseada, estimular la diferenciación y conducir el crecimiento de tejidos vegetales *in vitro*, se requiere la preparación de medios de cultivo; consta de una combinación de sustancias químicas que mantienen una dieta balanceada de nutrientes, que integran fuentes de carbono (sacarosa), minerales (macro y micronutrientes), vitaminas (tiamina), aminoácidos (glicina) y otros compuestos que son adicionados ocasionalmente como el inositol, jugo de jitomate, agua de coco y extractos de levadura y tubérculo de papa con el fin de enriquecer mejor los medios de cultivo, siendo todos necesarios para el desarrollo básico de las plantas que normalmente los obtienen del suelo en su estado natural (Mroginski y Roca 1991; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Boeri, 2015). La mayoría de las veces se emplean agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico y polivinilpirrolidona) en el medio de cultivo, debido a que los explantes llevan un cierto contenido de polifenoles que pueden estimular su oxidación, lo que provoca el oscurecimiento y muerte de los mismos (Mroginski y Roca 1991; Levitus *et al.*, 2010).

La preparación de los medios pueden ser semisólidas (adicionado con algún agente gelificante como agar, gelrite, fitogel, etc.) o líquidas, empleados en innumerables formulaciones existentes de medio basal (MB). Cada uno con sus determinados compuestos y concentraciones requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos (Mroginski y Roca 1991), del cual no existe un medio basal universal para todos los propósitos ni para todas las especies que se trabajan *in vitro* (Boeri, 2015). Por otro lado, el medio Murashige y Skoog (MS) creado en 1962, es uno de los más usados en la actualidad (Cuadro 1; Levitus *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Composición del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), el medio basal más usado en el cultivo *in vitro* de tejidos (Levitus *et al.*, 2010).

Medio MS	
Compuestos	mg/l
NH₄NO₃	1.650
KNO₃	1.900
KH₂PO₄	170
CaCl₂.2H₂O	440
(NH₄)₂SO₄	-----
MgSO₄.7H₂O	370
NaH₂PO₄.4H₂O	-----
KI	0,83
MnSO₄.H₂O	-----
H₃BO₃	6,20
MnSO₄.4H₂O	22,30
ZnSO₄.7H₂O	8,60
Na₂MoO₄.2H₂O	0,25
CuSO₄.5H₂O	0,025
FeSO₄.7H₂O	27,80
Na₂EDTA	37,30
CoCl₂.6H₂O	0,025
Glicina	2,00
Tiamina -HCl	0,10
Piridoxina -HCl	0,50
Ácido Nicotínico	0,50
Mioinositol	100,00
Sacarosa	30.000,00

Nota: El medio basal está ajustado a 5.7 de pH

Las hormonas de crecimiento son elementos importantes que se añaden a los medios de cultivo, puesto que intervienen en la morfogénesis (embriogénesis y organogénesis) de los explantes, que pueden responder de manera directa (formación de brotes) o indirecta (formación de brotes a partir de callo), del cual dependerá mucho del tipo y la dosis de hormona que se utilizara para lograr la regeneración y propagación *in vitro* deseada (Boeri., 2015).

Las hormonas comúnmente empleadas para el establecimiento de los cultivos son: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido absícico (ABA). Las auxinas y las citocininas son las más utilizadas en el cultivo *in vitro* de plantas, que pueden agregarse solas o combinadas al medio, según el tipo de morfogénesis que se quiera obtener (Mroginski y Roca 1991; Levitus *et al.*, 2010; Boeri, 2015).

En relación con sus efectos fisiológicos, las auxinas estimulan la división celular, que fomentan a la formación de callos y raíces (en altas dosis), entre los más usados se encuentran el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4 diclorofenoxiacético y el ácido indolbutírico (AIB); las citocininas promueven la diferenciación celular para la formación de órganos y se inhiben la formación de raíces (en altas dosis), siendo las más empleadas la benzilaminopurina (BAP), la kinetina (Kin) y la zeatina (ZEA) (Mroginski y Roca 1991; Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994; Levitus *et al.*, 2010; Boeri, 2015).

Las giberelinas, el ácido absícico (ABA) y el etileno solo son requeridas para casos especiales: las giberelinas (especialmente el AG₃) inducen la germinación de semillas en dormancia; el ácido absícico (ABA) actúa como inhibidor en la formación de órganos; y el etileno promueve la germinación y crecimiento en brotes bajo tratamientos breves, aunque se sabe que esta hormona puede estimular la maduración de los frutos, la senescencia, la abscisión foliar y la epinastia (Lira, 2007).

2.3.3. Aplicaciones de cultivo de tejidos vegetales

Hoy en día, el cultivo de tejidos vegetales puede utilizarse para diversos propósitos, entre estos se encuentra la propagación masiva, utilizada especialmente para aquellas especies de interés agrícola, ornamental, medicinal o en peligro de extinción. Asimismo, ha permitido una elevada tasa de germinación *in vitro* para aquellas especies con germinación baja en estado natural; la conservación e intercambio de germoplasma para el incremento de variabilidad genética vegetal; la extracción de metabolitos secundarios con gran utilidad para las industrias farmacéutica y alimenticia; y la creación y producción de semillas sintéticas y plantas híbridas, transgénicas y libres de agentes patógenos (virus, bacterias u hongos) con fines agrícolas o para estudios básicos de fisiología, bioquímica y ciencias afines (Segretín, 2006).

2.3.4. Problemática en el establecimiento de cultivo de tejidos vegetales

En el cultivo de tejidos vegetales suelen presentarse algunos problemas que pueden afectar el desarrollo de los explantes cultivados, siendo como factor principal la contaminación, provocado por diversos tipos de microorganismos (hongos, bacterias, fitoplasmas, virus) que al proliferar, compiten con los explantes por los nutrientes que contiene el medio de cultivo y lo modifican, que en la mayoría de los casos conlleva a la destrucción total de tales cultivos (Mroginski y Roca, 1991; Nikoloff, 2015).

Otros problemas comunes en la asociación explante-medio de cultivo y las condiciones de incubación como la oxidación, la hiperhidricidad y la falta de respuesta morfogénica también afectan significativamente la regeneración vegetal, por lo cual es necesario buscar y analizar la fuente del problema, tanto en la preparación y esterilización del medio de cultivo como la desinfección, manipulación e incubación de los explantes, con el fin de llevarse a cabo una posible solución para evitar o minimizar los daños al cultivo *in vitro*, de los cuales son aspectos necesarios que se deben tomar en cuenta si se quiere tener éxito en la regeneración y propagación de las plantas (Levitus *et al.*, 2010; Nikoloff, 2015).

2.4. Cultivo de tejidos vegetales en fabáceas

Desde la segunda mitad del siglo XX, el cultivo *in vitro* sobre este grupo de plantas se ha convertido en una alternativa para estabilizar y aumentar la producción y mejoramiento vegetal, en especial, para aquellas especies que tienen importancia industrial y agrícola a nivel mundial (Parrott *et al.*, 1992), con el planteamiento de obtener plantas libres de agentes patógenos, con resistencia a los cambios ambientales y que contengan germoplasma valioso de alta variabilidad, y por lo tanto, resultan de gran utilidad para el mejoramiento de los alimentos y la extracción de materia prima de buena calidad (Ganapathi *et al.*, 2003), de igual manera se han cultivado *in vitro* algunas fabáceas que proporcionen la restauración de ecosistemas perturbados, como en el control de la erosión y la fertilización natural de los suelos (Parrott *et al.*, 1992).

Sin embargo, factores como el genotipo de la planta, las condiciones químicas y físicas para realizar el cultivo y la selección del explante hacen que los patrones morfogénicos sean diversos entre las fabáceas, debido a que no todas responden a los mismos tratamientos, y por lo tanto, cada factor que interviene en el cultivo *in vitro* tiene que ser específico para cada especie, y de esta forma alcanzar el desarrollo y crecimiento de brotes o embriones de acuerdo con el objetivo propuesto (Parrott *et al.*, 1992; Ganapathi *et al.*, 2003).

2.4.1. Estudios de cultivo *in vitro* en *Mimosa pudica* y fabáceas afines

El primer trabajo registrado de cultivo realizado en *Mimosa pudica* fue en 1982 por Gharyal y Maheshwari, en el que obtuvieron con éxito brotes vía directa al utilizar medio N6 (Chu *et al.*, 1975) con 0.5 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de BAP a partir de nudos y yemas apicales, además de que los cotiledones, hipocótilos y pinnas formaron callo bajo esta misma concentración hormonal (citado por Parrott *et al.*, 1992), de modo que a partir de esa fecha no se han realizado nuevos estudios que pudieran mejorar las técnicas de cultivo, debido a que dicha especie todavía no ha generado tanto interés en esta área de estudio a pesar de las diversas utilidades conocidas para su aprovechamiento y beneficio humano (Ganapathi *et al.*, 2003). Por lo tanto, Hassan *et al.* (2010) y Afshan (2011) retomaron su estudio debido a la importancia medicinal que tiene en sus países de origen (Bangladesh e India) y en el interés de generar conocimiento en base a sus técnicas, por lo cual, Hassan *et al.* (2010) regeneraron brotes a partir de nudos y yemas apicales establecidos en medio MS al 100% con 7g/l de agar (Difco), ajustado a un pH de 5.8 y con una concentración hormonal de 0.5 ANA/1.5 BAP bajo una temperatura de 24±20°C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad; mientras que Afshan (2011), también utilizó medio MS pero con otro gelificante (agar 0.6%) sin cambiar su pH (5.7) bajo una diferente concentración hormonal (0.5 ANA/1 Kin), por el cual obtuvo brotes a partir de los nudos cotiledonales.

En otros trabajos de cultivo *in vitro* llevados a cabo en otras especies de fabáceas mimosoideas también han empleado medio MS para cultivar yemas apicales y nudos extraídos de plántulas *in vitro*, dado que los riesgos de contaminación u

oxidación es baja (Adema, 2015), además de que dichos explantes tienen la capacidad de formar brotes mediante la reactivación del meristemo, por lo que la respuesta regenerativa es eficaz en comparación con otros tipos de explantes (Segretín, 2006).

Sinha y Mallick (1993) trabajaron con *Albizia falcataria* al evaluar la respuesta regenerativa de los nudos cotiledonales establecidos en medios MS al 100% gelificados en diferentes dosis de gelificante Bacto-Agar (0.4 y 0.8%) con variaron en el pH (5.6 y 5.7) bajo 6 tratamientos con diferentes concentraciones de BAP (medidos en μM), incubados a una temperatura de 22° C y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad, lo cual se obtuvo regeneración de brotes a los 40 días, de manera que el tratamiento 8.9 μM (2mg/l) de BAP fue el que dio mayor resultado, con promedios y error estándar de 25.2 ± 2.9 (Bacto-Agar al 0.4% con 5.6 de pH) y 19.9 ± 1.5 (Bacto-Agar al 0.8% con 5.7 de pH) brotes/explante, aunque en algunos de los explantes sembrados en cada tratamiento presentaron después el callo.

En cambio, Nandwani (1995) trabajo con *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* a partir de los cotiledones, hipocótilos y nudos cotiledonales que fueron establecidos en medio MS gelificado con agar al 0.6%, ajustado a 5.6 de pH y bajo diferentes concentraciones de auxinas (ANA, AIA) y citocininas (BAP, Kinetina), incubados a una temperatura de 26 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad, obtuvo mayor respuesta regenerativa (promedio y error estándar de 11.66 ± 2.12 brotes/explante) en los nudos cotiledonales del tratamiento 0.1 ANA/5 BAP a las 4 semanas, mientras que los hipocotilos y cotiledones únicamente formaron callo sin desarrollar brotes indirectos en todos los tratamientos.

Mientras que Villareal y Rojas (1996) trabajaron con *Mimosa tenuiflora* al usar nudos para su cultivo en medio MS al 100% complementado con 3% de sacarosa y 100 g/l de mio-inositol; con un pH ajustado a 5.5 y 0.8% de Bacto-Agar como gelificante, de los cuales estuvieron bajo 7 tratamientos con una concentración constante de AIA (0.1 mg/l) combinados con diferentes niveles de Kin (0,1,2,3,4, 5 y 6 mg/l), que posteriormente fueron incubados a una temperatura de 28° C en un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, en lo cual la respuesta

regenerativa se presentó a los 30 días, puesto que en su investigación señalaron que el tratamiento que dio mayor cantidad de brotes fue 0.1 AIA/5 Kin, dando un promedio y error estándar de 1.8 ± 0.6 brotes/explante.

Entretanto, algunos trabajos han empleado explantes obtenidos de plantas de campo o vivero para el cultivo *in vitro*, donde los riesgos de oxidación y contaminación son altos (Mroginski y Roca 1991), por esta razón, los métodos de desinfección son un factor importante para poder establecer los explantes en el cultivo, pues determinara si fueron o no efectivas (Nikoloff, 2015), como el caso de Batchelor *et al.*, (1989) que trabajaron con nudos extraídos de 3 especies del género *Prosopis* (*P. chinensis*, *P. cineraria* y *P. juliflora*), en el que no señalaron en su investigación problemas de contaminación u oxidación después de haber sido desinfectadas con alcohol metílico al 70% (por 1 minuto) y con hipoclorito de sodio al 5% (por 10 minutos), sumergidas (por 15 minutos) en agua destilada esterilizada con solución antioxidante (100 mg/l de ácido cítrico y ácido ascórbico, 50 mg/l de polivinilo y 100 mg/l de pirrolidona) y sembradas en medio MS al 100% con 8 g/l de agar y 1.6 g/l de glutamina bajo diferentes concentraciones de kinetina y BAP combinadas con IBA, ANA y AIA incubados a 25°C con 16 horas luz, de modo que su método de desinfección al parecer resulto ser efectivo, puesto que de las 3 especies se logró obtener brotes, de tal forma que los mejores tratamientos que dieron mayores resultados fueron 5 ANA/15 BAP (*P. chinensis*), 5ANA/10 BAP (*P. cineraria*) y 0.05 Kin/15 IBA (*P. juliflora*) con promedios (sin registrar error estándar) de 4.3 (*P. chinensis*), 3.2 (*P. cineraria*) y 1.5 (*P. juliflora*) brotes/explante.

A diferencia del trabajo mencionado anteriormente, Forlin *et al.* (2000) utilizaron como explante las hojas (pinnas) de *Desmanthus virgatus* obtenidas igual de plantas de invernadero que fueron desinfectadas con etanol al 70% (por 5 segundos) y con hipoclorito de sodio al 1.1% con una gota de Tween (por 5 minutos), que después se cultivaron en medio MS al 100% con 0.8% de agar y con un pH 5.7, suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas (ácido naftalenacético: ANA, ácido indolbutírico: IBA, ácido indolacético: AIA, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético: 2,4-D y picloram: PIC) y citocininas

(bencilaminopurina: BAP, kinetina: Kin, zeatina: ZEA y 2-isopenteniladenina: 2 – iP), e incubadas después a 27°C con 14 h luz y 10 h oscuridad, en el cual la mayoría de los cultivos se obtuvieron callos a los 30 días, pero los tratamientos 1 ANA/3 BAP y 1 IBA/3 BAP fueron los únicos que desarrollaron brotes indirectos entre los 50 y 60 días de cultivo, con un porcentaje de 24 (1 ANA/3 BAP) y 35% (1 IBA/3 BAP) de respuesta regenerativa exitosa; de tal forma que el método de desinfección que emplearon también resulto efectivo, a pesar de que se desconoce el porcentaje de contaminación y oxidación que pudieron haber presentado.

3. JUSTIFICACIÓN

Mimosa pudica es una fabácea que tiene importancia farmacológica, científica y ecológica en diversas partes del mundo, mientras que en México donde esta especie se encuentra distribuida de manera natural hasta Sudamérica, solo es utilizada como planta de ornato por la peculiaridad de sus hojas sensitivas y aprovechada por la comunidad rural e indígena con fines medicinales. Sin embargo, a pesar de ser una planta con diferentes usos en otros países, en México no se ha valorado su potencial. Esto ha sido una razón para que los científicos aún no tengan un interés sobre la importancia de la especie en cuanto a su aplicación en el área de cultivo de tejidos vegetales, donde el conocimiento general que se tiene registrado actualmente es escaso. De tal manera que en el presente trabajo, se pretendió desarrollar un proceso que permita su cultivo *in vitro* al utilizar explantes obtenidos de plántulas *in vitro* y de plantas adultas cultivadas en vivero, como una contribución al conocimiento científico para futuros estudios sobre dicha especie que pueda ser utilizada en diferentes fines; así como una referencia para otras especies pertenecientes al género *Mimosa*.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Cultivar explantes de *Mimosa pudica* mediante el uso de las técnicas básicas de establecimiento *in vitro* para la inducción regenerativa.

4.2. Particulares

- Desinfectar las semillas y los nudos extraídos de plantas adultas cultivadas en vivero para la germinación e inducción regenerativa bajo condiciones asépticas.
- Estudiar la respuesta germinativa de las semillas sometidas a condiciones de inducción (hidratación, estratificación e incubación) que permita obtener plantulas *in vitro* para la extracción de explantes.
- Describir el crecimiento de las plántulas germinadas para el estudio básico del desarrollo morfológico *in vitro*.
- Comparar la respuesta regenerativa de los explantes sembrados bajo diferentes tratamientos de ácido naftalenacético con kinetina y benzilaminopurina para determinar la concentración hormonal que genere mayor número de brotes y/o formen callo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización experimental

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, perteneciente al Jardín Botánico Exterior del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

5.2. Material biológico

Se utilizaron semillas maduras (Foto 2) obtenidas de plantas de jardín de casa que lograron desarrollar algunos frutos maduros, traídas de la ciudad de Puebla (19 semillas) y de Tultitlán, estado de México (18 semillas). También se emplearon 6 plantas adultas de aproximadamente 30 cm de altura, entre 4 a 8 ramas por planta, con un diámetro de 2 a 4 mm cada rama (Foto 3), que fueron obtenidas en un tianguis dedicado a la venta exclusiva de plantas de ornato, que se instala cada fin de semana en la plaza cívica del Boulevard 5 de Mayo, en la ciudad de Puebla.

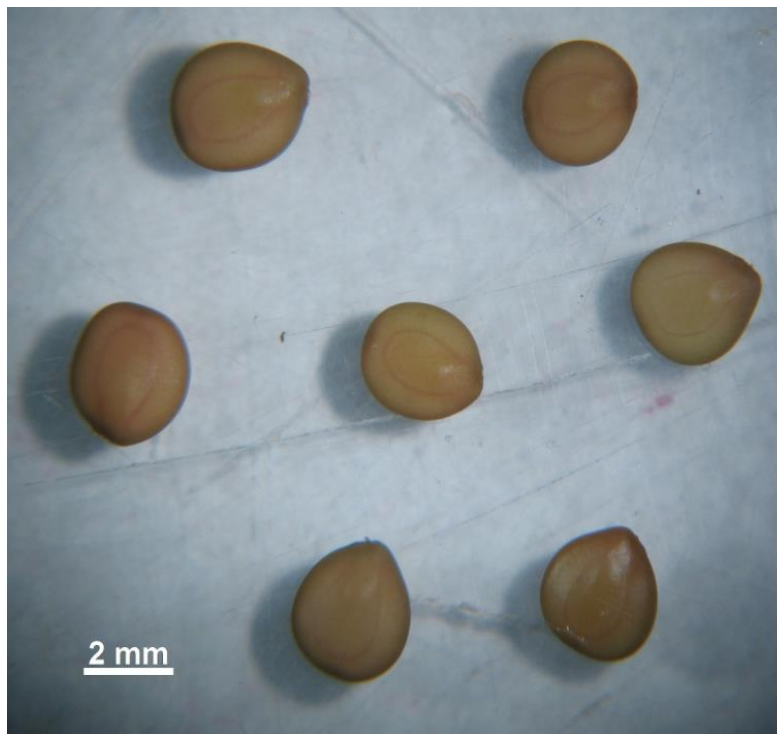


Foto 2. Semillas maduras de *Mimosa pudica* utilizados para su germinación *in vitro*.



Foto 3. Plantas adultas de *Mimosa pudica* resguardadas en un invernadero que dispone el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

5.3. Desinfección y siembra de semillas *in vitro*

Con la ayuda de un cortaúñas se retiró con cuidado el pericarpio que envolvía las semillas, luego se lavaron con agua destilada durante 2 minutos e inmediatamente fueron enjabonadas con líquido antibacterial “blumen” por 5 minutos, a continuación fueron sumergidas en un vaso de precipitados con 60 ml de etanol al 70% durante 30 segundos y finalmente se pasaron en otro vaso de precipitados con 100 ml de hipoclorito de sodio “Cloralex” al 25% con una gota de Tween 80, donde se mantuvo en constante agitación durante 20 minutos al utilizar el agitador magnético marca “THERMO SCIENTIFIC” a una velocidad de 50 rpm. Por último, bajo condiciones asépticas de una campana flujo laminar (CFL), se colocaron las semillas en frascos “Gerber” con 70 ml de agua destilada esterilizada y fueron refrigeradas (5° C) por 24 horas para su hidratación y estratificación.

Transcurrido el tiempo, nuevamente bajo las condiciones de una CFL, se enjuagaron 2 veces en nuevos frascos “Gerber” con 70 ml de agua destilada

esterilizada, posteriormente fueron sembradas de manera individual en frascos “Gerber” que contenían 25 ml de medio Murashige y Skoog (1962) modificado, con 50% de concentración de compuestos inorgánicas y 100% de orgánicos, 30 g/l de sacarosa, ajustado a 5.7 de pH y adicionado con 4 g/l de Gellan Gum como gelificante. Al término de la siembra, los frascos fueron sellados con ega-pack, rotulados (especie de la planta, nombre de la persona que sembró y la fecha) y colocados en una cámara de incubación a 25° C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad en espera de la respuesta germinativa.

5.4. Descripción del crecimiento de las plántulas germinadas *in vitro*

Para el estudio del desarrollo morfológico de las 11 plántulas que lograron germinar en medio MS 50/100, se llevó a cabo un registro semanal durante 35 días, en el cual, con ayuda de un estereoscopio con cámara digital integrada y conectada a la computadora se utilizó el programa Axion Vision Rel. 4.7 para cuantificar el tamaño (en mm y cm) de los órganos que alcanzaron a medir por semana.

5.5. Plántulas *in vitro*: selección, obtención y siembra *in vitro* de explantes para inducción regenerativa

La cantidad y el tipo de explante empleados para su cultivo en el testigo y 3 tratamientos con reguladores de crecimiento (kinetina y ácido naftalenacético: ANA) (Cuadro 2) fueron determinados por las 11 plántulas de 5 semanas de edad (35 días) obtenidas durante la germinación *in vitro*, de manera que al haber contado con poco material biológico, solo se utilizaron como explantes la yema apical, los peciolos y pinnas de la tercera hoja, con el único fin de que fuera posible inducir a los nudos de las plántulas en desarrollar nuevos brotes (ramas y hojas) cuando les fuese retirado la yema apical durante la podada y de esta manera haber obtenido mayor cantidad de material biológico con variación de explantes para su cultivo en los tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos empleados para la inducción de explantes extraídos de plántulas de *Mimosa pudica*.

Reguladores de crecimiento (mg/l)	
ANA	Kinetina
0	0
0	1.5
0.5	1
0.5	1.5

Una vez realizado la selección de dichos explantes, bajo las condiciones asépticas de la campana flujo laminar, las plántulas fueron podadas con la ayuda de unas tijeras metálicas puntiagudas, por lo que después se extrajeron con cuidado los explantes con unas pinzas, de tal forma que fueron sembrados de manera individual en cada uno de los 33 frascos “Gerber” con 25 ml de medio MS 50/100 ajustado a 5.7 de pH con gelificante Gellan Gum (4g/l) con sus respectivos tratamientos utilizados durante el proceso (Foto 4); cada tratamiento (a excepción del testigo) contó con 9 explantes en total (Cuadro 3).

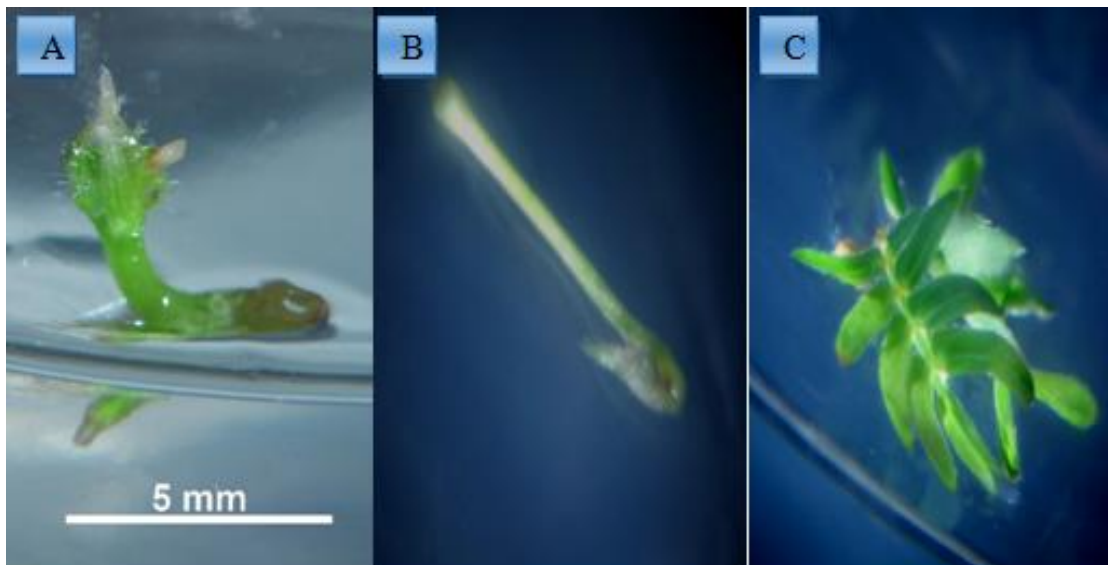


Foto 4. Explantes de plántulas *in vitro* sembrados en medio MS 50/100 bajo 3 tratamientos y el testigo: A) Yema apical; B), Peciolo; C) Pinna.

Cuadro 3. Numero de explantes obtenidos de plántulas para cada tratamiento.

Explante	Reguladores de crecimiento (mg/l)			
	Testigo	1.5 Kin	0.5 ANA/1 Kin	0.5 ANA/1.5 Kin
Yema apical	2	3	3	3
Peciolo	2	3	3	3
Pinna	2	3	3	3

Después de haber finalizado la siembra, tanto las plántulas podadas como los explantes en sus respectivos frascos fueron sellados con ega-pack, rotulados y guardados en la cámara de incubación (25 °C, fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad) en espera de la respuesta regenerativa de los explantes y la inducción de brotes de las plántulas a partir de sus nudos.

5.6. Plantas adultas: desinfección, obtención y siembra *in vitro* de los nudos para inducción regenerativa

Las plantas en bolsas de almácigo color negro estuvieron resguardadas durante 2 meses en el invernadero, en el que fueron regadas con agua destilada 3 veces por semana bajo una temperatura que oscilaba de 18 a 25 °C, por lo que antes de ser utilizadas para el cultivo *in vitro* se asperjaron con fungicidas Benomil y Cuprimicin (1g/l) durante una semana. Una vez realizado dicho proceso, se extrajeron de las ramas los nudos (0.5 a 1 cm) con ayuda de unas tijeras metálicas, a los cuales se les retiraron manualmente las estipulas y los peciolo de las hojas (Foto 5).



Foto 5. Nudos de *Mimosa pudica*: las líneas rojas punteadas indican los cortes realizados para su extracción de la planta; las estipulas y los peciololes fueron retiradas antes del proceso de desinfección.

Posteriormente los nudos fueron enjuagados con agua destilada por 5 minutos para eliminar el exceso de polvo y bajo las condiciones asépticas de la campana flujo laminar se realizó su desinfección; se utilizó 250 ml de agua destilada mezclado con jabón líquido antibacterial “blumen” por 10 minutos, luego se dejaron en 80 ml de solución yodo (1ml/l) por 10 minutos, inmediatamente se coloraron en 250 ml de jabón desinfectante “EsteriClean” por 20 minutos, después se sumergieron en 80 ml de etanol 70% por 1 minuto, y finalmente se pasaron a 200 ml de hipoclorito de sodio “Cloralex” al 25% por 20 minutos y se concluyó con 3 enjuagues en frascos “Gerber” con 80 ml de agua destilada esterilizada. Todo el proceso se realizó en agitación constante con una varilla de vidrio (excepto en etanol 70%); los agentes desinfectantes estaban contenidas en vasos precipitados y se emplearon unas pinzas para pasar los explantes a cada agente desinfectante. Una vez obtenidos los nudos de las ramas y realizada su desinfección, se procedió el corte de los extremos de los nudos con un bisturí para eliminar 1 ó 2

mm de tejido oxidado ocasionado por los cortes iniciales y el proceso de desinfección. Enseguida, fueron sembrados 120 nudos en frascos “Gerber” con 25 ml de medio MS al 100%, adicionado con 0.400 g/l de L-glutamina y 0.100g/l de hidrolizado enzimático de caseína, L-arginina, L-asparagina y ácido ascórbico (antioxidante), con gelificante Gellan Gum (4g/l) y ajustado a 5.7 de pH bajo el testigo y 7 tratamientos con diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) con benzilaminopurina (BAP) y kinetina (Cuadro 4). Finalizada la siembra, fueron sellados, rotulados y colocados en la cámara de incubación (25° C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad) en espera de la respuesta regenerativa de los nudos.

En cada tratamiento se ocuparon 5 frascos para sembrar con una pinza 3 nudos por cada frasco (15 nudos en total por tratamiento).

Cuadro 4. Tratamientos empleados para la inducción de los nudos extraídos de plantas adultas de *Mimosa pudica*.

Reguladores de crecimiento (mg/l)		
ANA	BAP	Kinetina
0	0	0
0	1	-----
0	1.5	-----
0.5	-----	-----
0.5	1	-----
0.5	1.5	-----
0.5	-----	1
0.5	-----	1.5

Todos los frascos de medio de cultivo, agua destilada e instrumental utilizados durante el establecimiento del cultivo fueron esterilizados en autoclave a una presión de 1.5Kg/cm² y con una temperatura de 120°C durante

6. RESULTADOS

6.1. Desinfección de semillas

El método de desinfección empleado para las 37 semillas resultó ser efectivo; en ninguna semilla establecida en los frascos “Gerber” con medio MS 50/100 se observó contaminación fúngica o bacteriológica durante el proceso de germinación.

6.2. Germinación *in vitro*

Durante el proceso de germinación algunas semillas se hincharon y les empezó a brotar la radícula de la testa a partir del día 2 hasta el día 6 después de su siembra (Foto 6), señal de que la etapa germinativa había comenzado en las 37 semillas, pero a partir del día 7 hasta el día 45 ninguna otra semilla mostró dichos signos de germinación alguna. El porcentaje de germinación obtenido de las semillas fue de 29.7% (Figura 4), de manera que el método empleado (hidratación, estratificación e incubación) para inducir la germinación resultó ser poco efectivo.

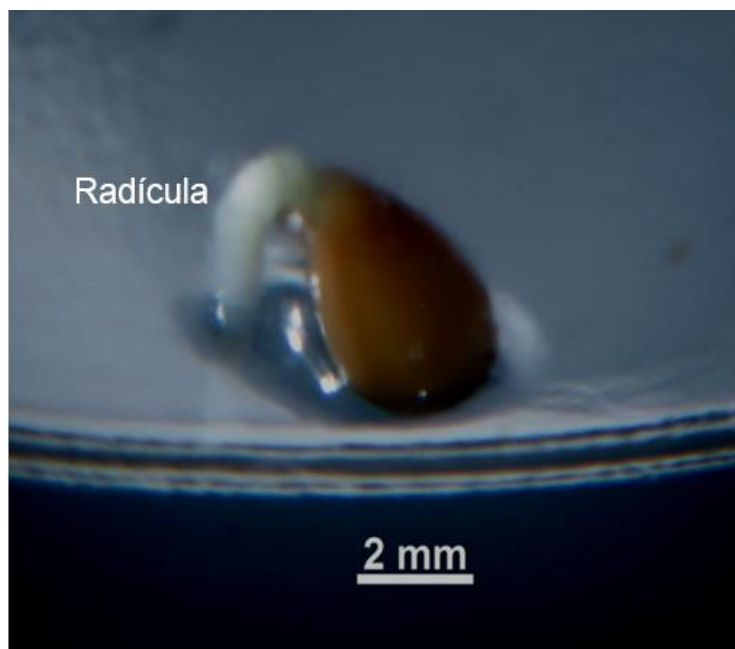


Foto 6. Germinación *in vitro* de semilla de *Mimosa pudica*; se aprecia la radícula que rompe la testa de la semilla.

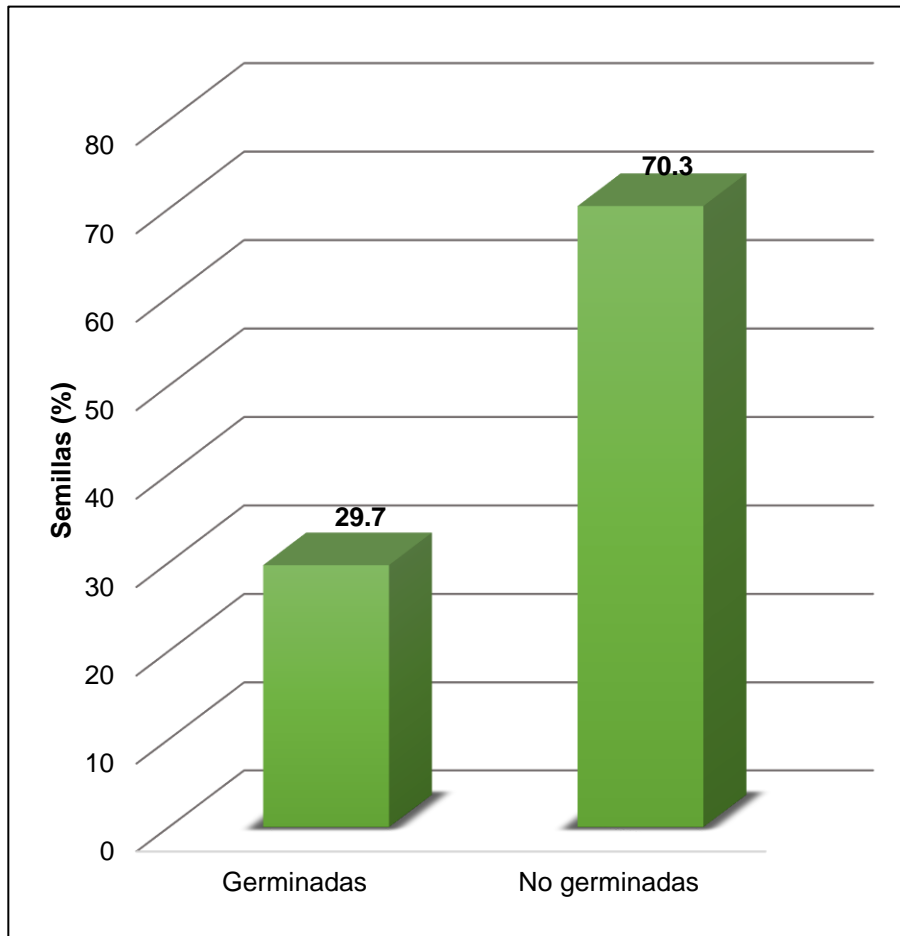


Figura 4. Porcentaje de germinación de semillas de *Mimosa pudica* al cultivarse *in vitro*.

6.3. Crecimiento de las plántulas y obtención de explantes

Entre los 6 y 8 días después de que solo germinaron 11 semillas (9 del lote 1 y 2 del lote 2); se observó su crecimiento antes y después de salir de la testa, donde el tamaño de la radícula tuvo un incremento de 4 mm de longitud, por lo que después de esta etapa ocurrió la formación del hipocótilo (2 a 2.5 cm de altura) y los cotiledones (5 mm de ancho) con la yema apical entre estas (Foto 7).

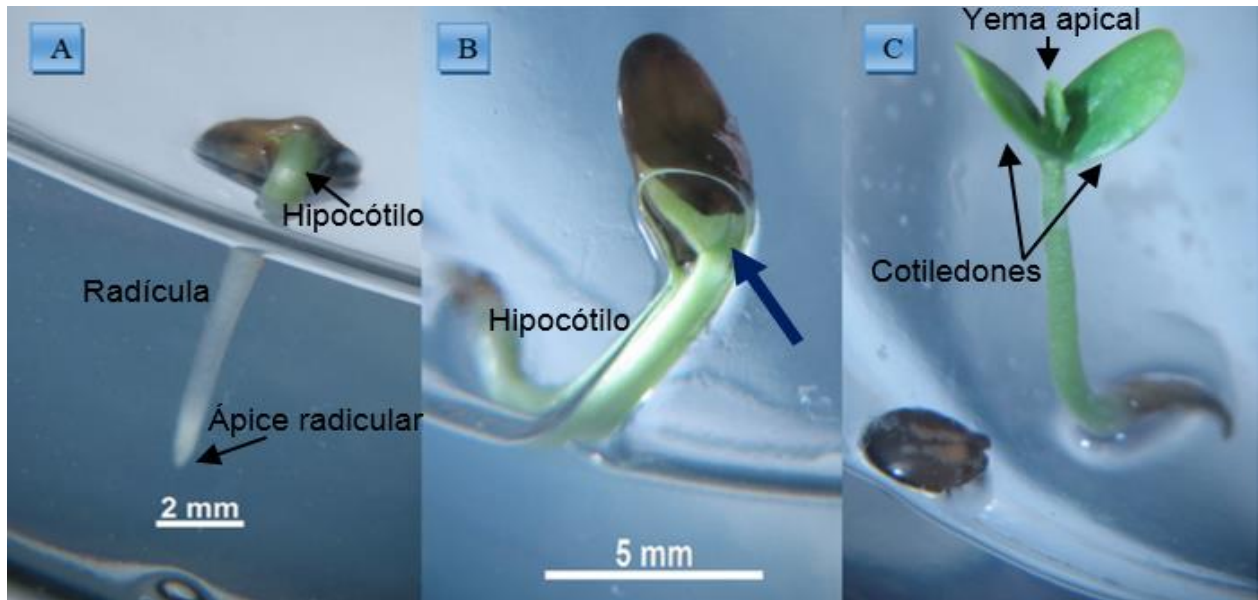


Foto 7. Plántula de *Mimosa pudica* en desarrollo durante los 6 a 8 días después de la germinación: A) La radícula alcanza un tamaño de 4 mm de largo; se puede apreciar el ápice radicular y el temprano desarrollo del hipocótilo fuera de la testa; B) El hipocótilo se forma por completo y los cotiledones todavía permanecen dentro de la testa (flecha azul); C) Los cotiledones se liberan por completo de la testa, donde se distingue la yema apical de la plántula.

En la segunda semana de edad, las plántulas formaron el epicótilo (< 1mm de longitud) y el primer nudo con su par de estipulas soldadas a los lados, donde emerge la primera hoja compuesta de 6 folíolos (1.5 a 2 cm de largo), que a su vez, la mayoría de las plántulas tenían preformada la segunda hoja (Foto 8).



Foto 8. Plántula de *Mimosa pudica* de 2 semanas de edad; se aprecia el hipocótilo, el epicótilo, el nudo con su par de estipulas (flecha roja), la primera hoja y la segunda hoja preformada en la yema apical.

Durante la tercera semana de edad, la raíz primaria (3 a 4 cm de largo) comenzó a desarrollar raíces secundarias y el epicótilo aumento un poco de tamaño (< 4 mm de largo) en las plántulas. Se siguió después la formación del entrenudo (3 a 5 mm de largo) y el segundo nudo con estipulas, donde la segunda hoja preformada completo su desarrollo (3 cm de largo aprox.), que a diferencia de la primera hoja, se convirtió en una hoja tipo bipinnada (4 pares de foliolúlos/pinna).

A la cuarta semana de edad se desarrolló por completo la tercera hoja bipinnada (3 cm de largo; 5 pares de foliolúlos/pinna), que a simple vista pareció que compartía con la segunda hoja el mismo nudo, en esta etapa del desarrollo no se apreció con claridad el entrenudo que separaba el segundo con el tercer nudo, era muy reducido (<2 mm) (Foto 9).



Foto 9. Plántula de *Mimosa pudica* de 4 semanas de edad: A) Se aprecian los foliolúlos de la segunda y tercera hojas bipinnadas y las raíces secundarias, donde estas brotaron de la raíz primaria cuando la plántula tenía tres semanas de edad; B) El entrenudo que separa el segundo y el tercer nudo es muy pequeño (flecha morada), lo que hace parecer que la segunda y tercera hoja se originaron en el mismo nudo (flecha roja).

Cuando las plántulas cumplieron la quinta semana de edad (35 días), el entrenudo que delimitaba el segundo y tercer nudo, logró aumentar un poco su tamaño (4 mm de largo), además de que alcanzaron un promedio de 4.51 ± 0.12 cm de altura. Por otra parte, las 11 plántulas que fueron resguardadas en la cámara de incubación en espera de que los nudos fueran activados para obtener nuevos brotes tras haberles retirado la yema apical durante la poda murieron a los 5 días después de haberles realizado dicho proceso, donde todas presentaron una deshidratación severa en toda su anatomía, lo que causó una pérdida total del poco material biológico aséptico que se tenía para su utilización en el cultivo.

6.4. Plántulas *in vitro*: respuesta regenerativa de los explantes

El 93.9% de los explantes se perdieron por oxidación; los peciolo fueron los primeros en sufrir este problema a partir del día 4 al día 7 después de la siembra, del que se tuvo una pérdida total en cada tratamiento; para el caso de las pinnas la oxidación se presentó a las 2 semanas después de la siembra, donde solo 3 explantes del tratamiento 0.5 ANA/1.5 Kin lograron permanecer con vida por 2 meses, en el que desafortunadamente ninguno presentó algún tipo de respuesta regenerativa durante ese lapso de tiempo.

Las yemas apicales (6.1% de los explantes que lograron sobrevivir) casi fueron la excepción, ya que al igual que los peciolo y las pinnas también sufrieron oxidación a los 10 días después de la siembra, del que solo 2 explantes del tratamiento 1.5 Kin se mantuvieron con vida hasta la segunda semana, donde presentaron respuesta regenerativa al haber formado un brote de aspecto anormal y callo de color blanco en la base del explante (Foto 10).

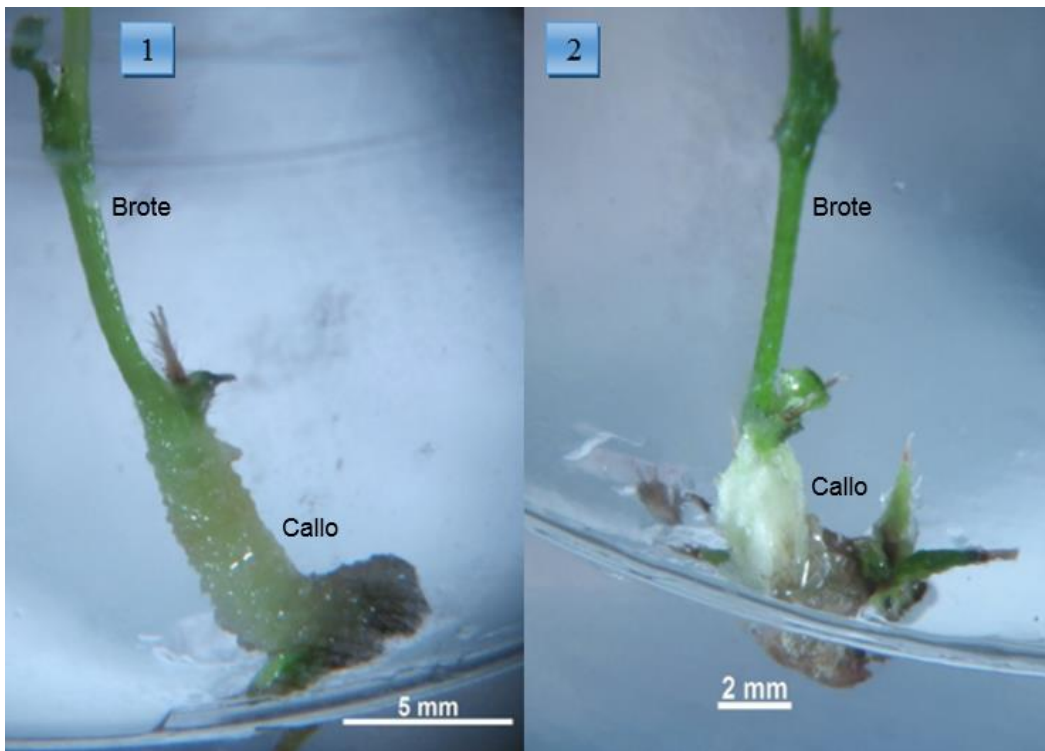


Foto 10. Explantes obtenidos de las yemas apicales 1 y 2 del tratamiento 1.5 Kin a las 2 semanas después de su establecimiento; ambos formaron un brote anormal y callo en la base del explante.

Los brotes de ambos explantes presentaron el tallo alargado con las hojas atrofiadas (Foto 11), mientras que los callos a excepción continuaron con su desarrollo hasta la cuarta semana después de la siembra, donde el explante 1 presentó el callo alargado y curvado, con una longitud aproximada de 4 cm, mientras que el explante 2 el callo no creció más de 1 cm y alcanzó una altura de 2.5 cm; al transcurrir la quinta semana después de su establecimiento los callos de ambos explantes comenzaron a sufrir oxidación a excepción de los brotes anormales, que continuaron con vida hasta la sexta semana, donde ambos explantes se perdieron (Foto 12).

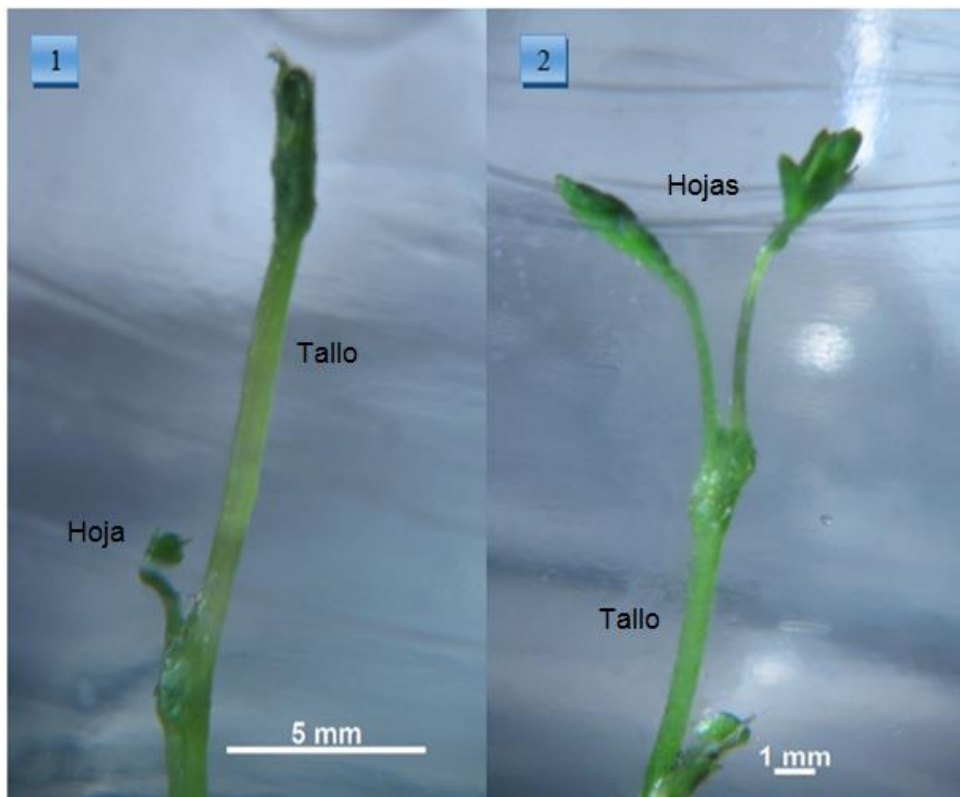


Foto 11. Brotes regenerados de los explantes 1 y 2 provenientes de la yema apical a las 2 semanas después de su establecimiento; ambos brotes muestran un desarrollo anormal en el tallo y las hojas.

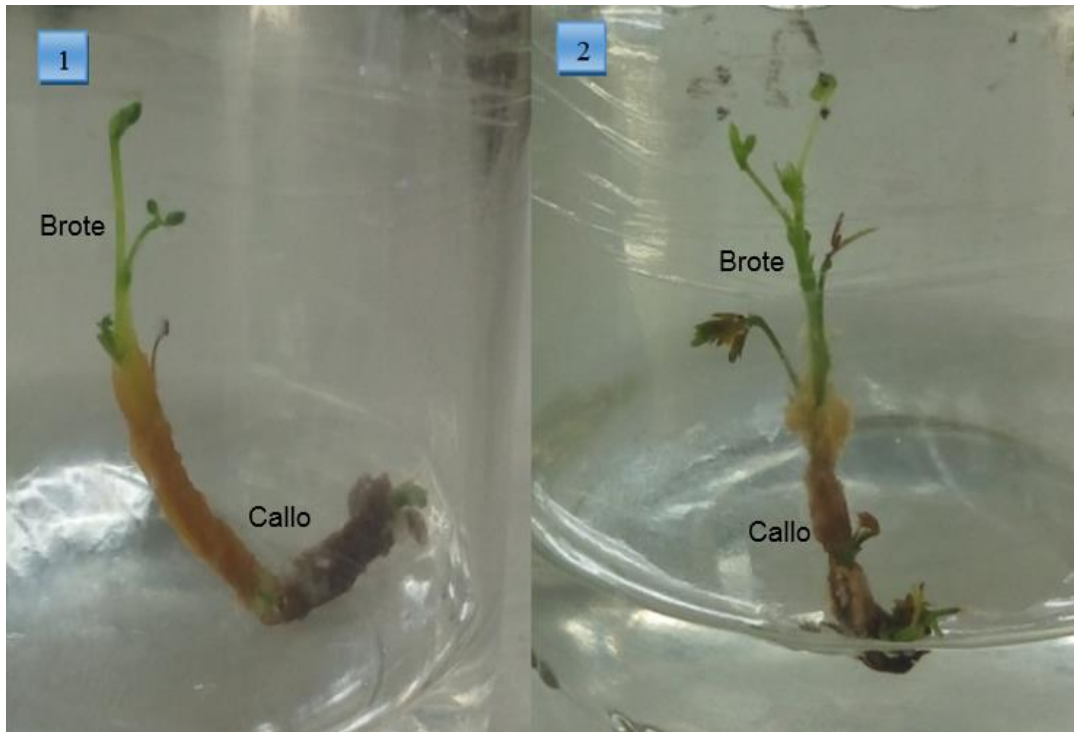


Foto 12. Explantes de yema apical 1 y 2 del tratamiento 1.5 Kin regenerados a la quinta semana después de su establecimiento; los callos comenzaron a oxidarse por completo y los brotes con desarrollo anormal se mantuvieron con vida hasta la sexta semana.

6.5. Plantas adultas: desinfección y respuesta regenerativa de los nudos

El método de desinfección empleado en los nudos extraídos de plantas adultas tratadas con fungicidas Benomil y Cuprimicin (1g/l) para el cultivo *in vitro* fue poco efectivo, dado que en el testigo y los 7 tratamientos donde se establecieron dichos explantes presentaron problemas de contaminación a partir del día 2 hasta el día 7, con un promedio de $35.8 \pm 6.56\%$, mientras que la oxidación se hizo presente a las 2 y 3 semanas con un $41.6 \pm 8.17\%$; pese a ello, se pudo obtener respuesta regenerativa de aquellos nudos que lograron sobrevivir a dichos problemas de cada tratamiento a las 4 semanas, de tal forma que su promedio obtenido fue de $22.5 \pm 6.7\%$ (Figura 5).

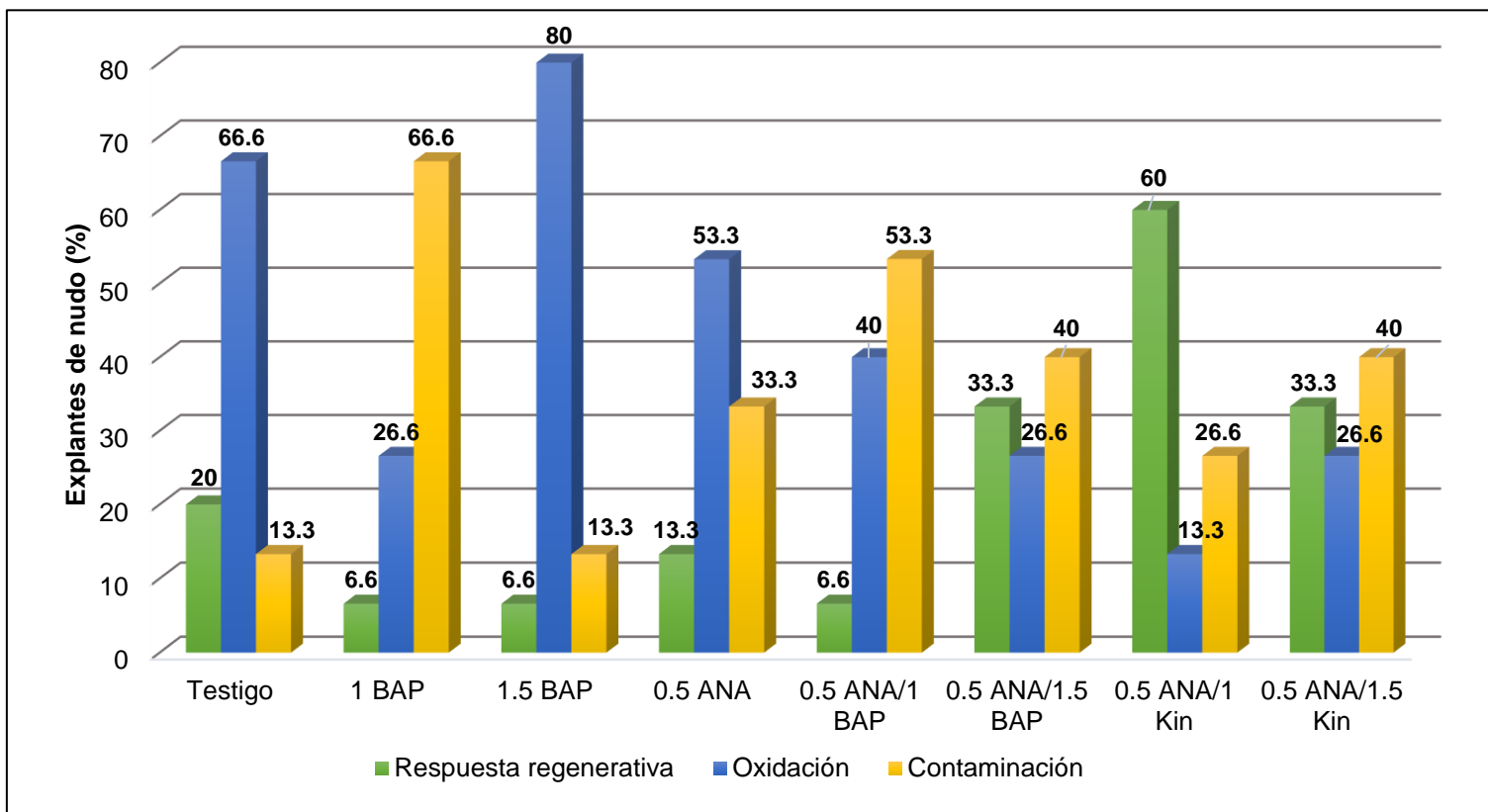


Figura 5. Porcentaje de contaminación, oxidación y respuesta regenerativa que presentaron los nudos en cada uno de los tratamientos.

Respecto a los nudos que lograron dar una respuesta regenerativa, se observó que en todos los tratamientos se obtuvieron brotes por vía directa, a lo cual cada explante dio de 1 a 3 brotes, pero solamente 3 explantes del tratamiento 0.5 ANA/1 Kin y 1 del tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP presentaron callo en la base y los extremos de dichos explantes a las 6 semanas, a pesar de que estos ya tenían formado antes los brotes (Foto 13); de todos los explantes regenerados solo uno del tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP se convirtió completamente en callo de color blanco-café a los 2 meses, sin haber dado indicios de formación de brotes vía indirecta (Foto 14).

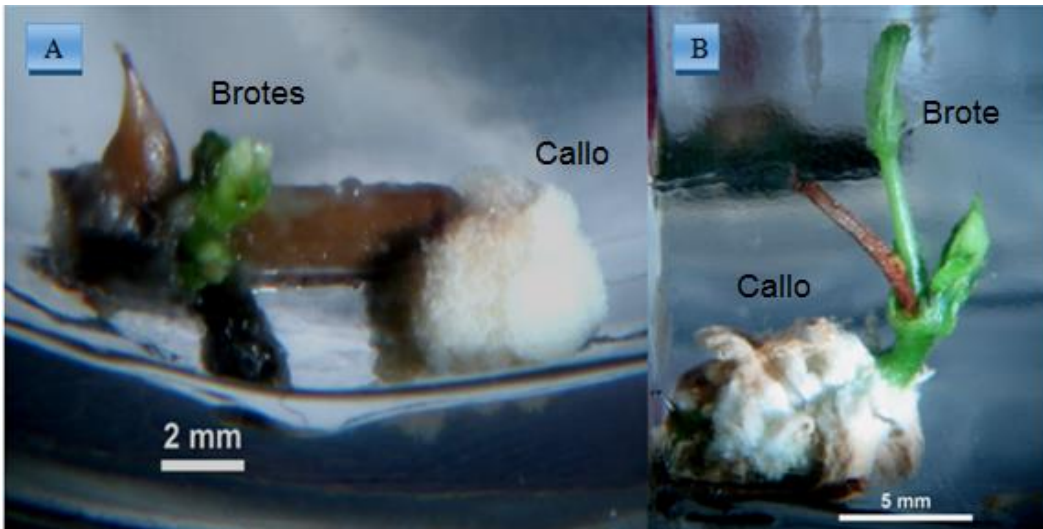


Foto 13. Regeneración *in vitro* de explantes de nudo de los tratamientos 0.5 ANA/1.5 BAP (A) y 0.5 ANA/1 Kin (B); la formación de los brotes se presentó a las 4 semanas, mientras que en algunos explantes se dio el desarrollo de callo a las 6 semanas.



Foto 14. Callo de nudo del tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP formado a los 2 meses después de su establecimiento; en algunas zonas del callo se aprecia la oxidación y sin ninguna formación de brotes por vía indirecta.

Sin embargo, los brotes del testigo presentaron una coloración verde claro, pero se mostraron débiles y con un mal desarrollo, mientras que los brotes del tratamiento 0.5 ANA fue todo lo contrario, tuvieron un buen desarrollo aunque su coloración fue pálida, de los cuales se tornaron a verde amarillento (Foto 15).

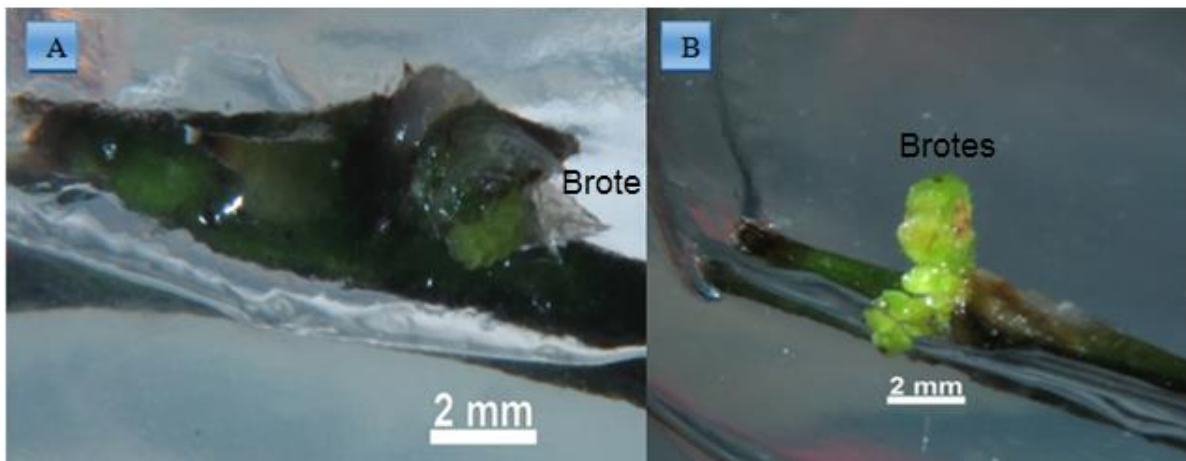


Foto 15. Regeneración *in vitro* de explantes de nudo de los tratamientos testigo (A) y 0.5 ANA (B) a las 4 semanas; los brotes del tratamiento testigo presentaron un mal desarrollo, en cambio, los brotes del tratamiento 0.5 ANA se tornaron a una coloración verde amarillenta.

Los demás tratamientos (1 BAP, 1.5 BAP, 0.5 ANA/1 BAP, 0.5 ANA/1.5 BAP, 0.5 ANA/1 Kin y 0.5 ANA/1.5 Kin) tuvieron un buen desarrollo de los brotes durante la etapa inductiva, por lo que todos presentaron un color verde claro, (Foto 16). Solo 2 explantes pertenecientes al tratamiento 0.5 ANA/1 Kin mostraron una respuesta regenerativa distinta al resto, ya que a pesar de haber formado un brote con presencia de callo en la base, se observó que en uno se logró desarrollar completamente una hoja bipinnada, a pesar de que esta tenía los foliolúlos malformados (Foto 17).

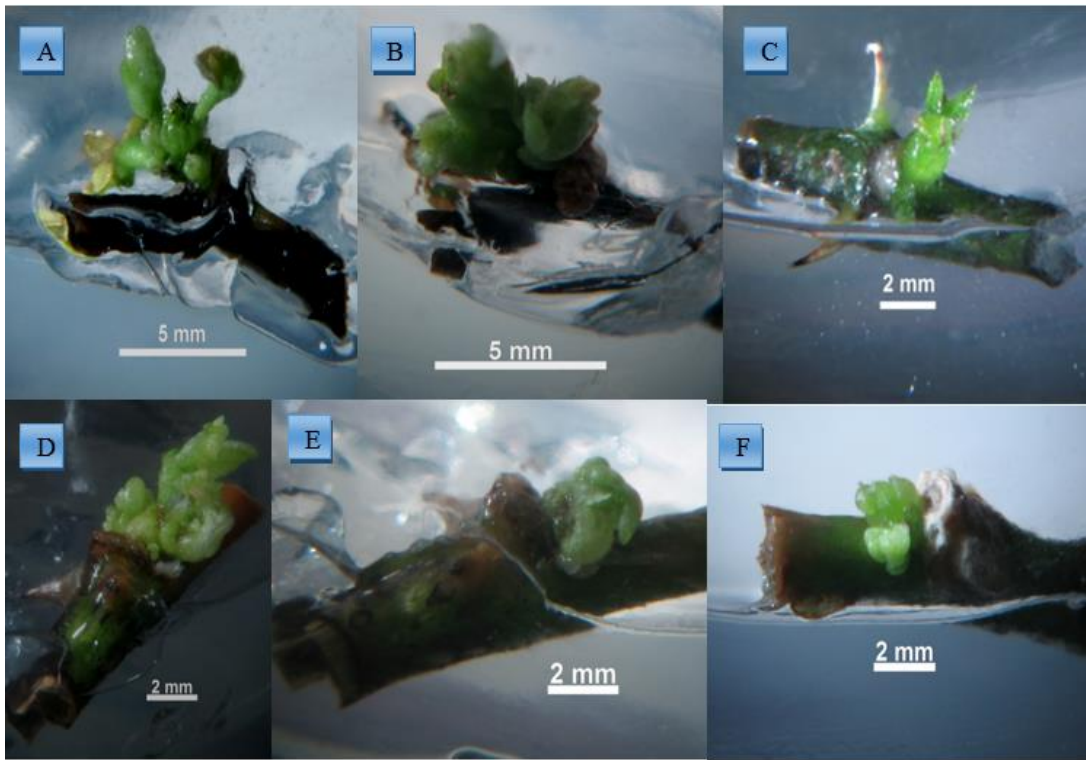


Foto 16. Regeneración *in vitro* de explantes de nudo bajo los tratamientos 1 BAP (A), 1.5 BAP (B), 0.5 ANA/1 BAP (C), 0.5 ANA/ 1.5 BAP (D), 0.5 ANA/1 Kin (E) y 0.5 ANA/1.5 Kin (F); todos los brotes obtenidos en dichos tratamientos mostraron una coloración verde claro.



Foto 17. Explante de nudo del tratamiento 0.5 ANA/1 Kin con presencia de callo en la base y con un brote que desarrollo una hoja bipinnada atrofiada.

El otro brote del tratamiento 0.5 ANA/1 Kin formo un tallo largo sin hojas de aproximadamente 3 cm de largo, que presento el primer nudo y la yema apical con sus estipulas, por lo cual se observó que en el nudo le había emergido un nuevo brote. Sin embargo, algo curioso se observó en la base del tallo, dado que en esta zona le aparecieron pequeños callos en forma de espinas con indicios de dar origen a las raíces adventicias del brote (Foto 18).

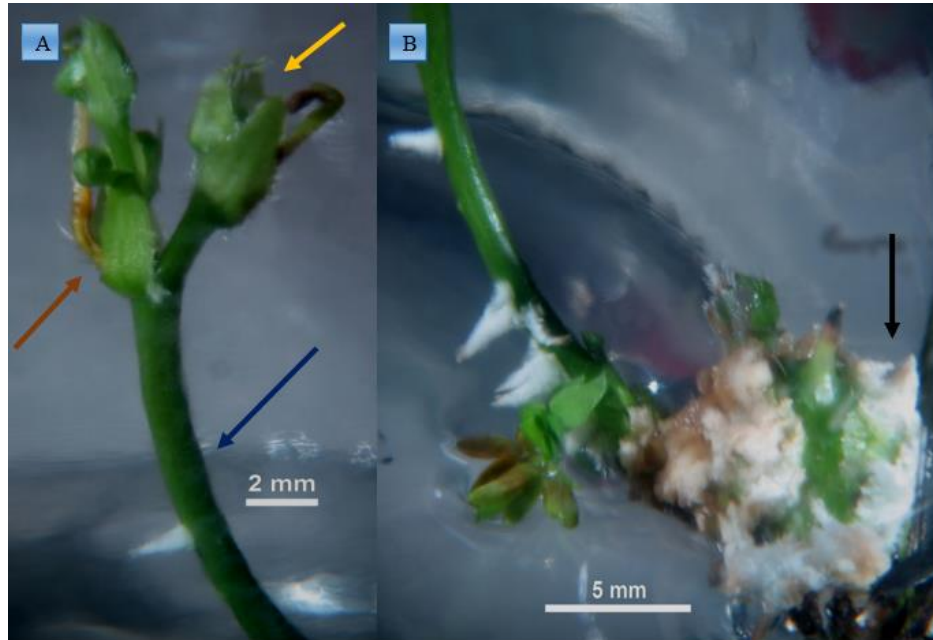


Foto 18. Explante de nudo del tratamiento 0.5 ANA/1 Kin con presencia de callo en la base (flecha negra) y con un brote que desarrollo un tallo largo sin hojas (flecha azul): A) primer nudo con brote nuevo (flecha café) y yema apical (flecha amarilla) acompañados por las estipulas; B) callos con apariencia de espina en la base del tallo.

De todos los tratamientos solo 26 de 120 explantes lograron responder y sobrevivir a la contaminación y oxidación, por lo cual se obtuvo un total de 52 brotes regenerados *in vitro*; el tratamiento 0.5 ANA/1 Kin fue el que presentó mayor formación de brotes, con un total de 20 brotes regenerados (brotes/explante= 1.33 ± 0.33), mientras que el tratamiento 0.5 ANA/1.5 Kin ocupó el segundo lugar al haber regenerado en total 10 brotes (0.67 ± 0.25 brotes/explante), de ahí el tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP quedó en tercer lugar al solo haber regenerado 9 brotes en total (0.60 ± 0.27 brotes/explante); el resto de los tratamientos tuvieron ≤ 3 brotes regenerados en total, por lo cual el promedio (\bar{X})

obtenido de cada uno de estos tratamientos fue de 0.13 y 0.2 brotes/explante (Cuadro 5).

Cuadro 5. Regeneración de brotes vía directa a partir de explantes de nudo de *Mimosa pudica* a las 4 semanas de cultivo.

Tratamiento	No. de explantes que regeneraron brotes/ No. total de explantes	No. total de brotes regenerados	$\bar{X} \pm$ E.E. brotes/explante
Testigo	3/15	3	0.2 \pm 0.10
1 BAP	1/15	3	0.2 \pm 0.19
1.5 BAP	1/15	3	0.2 \pm 0.19
0.5 ANA	2/15	2	0.13 \pm 0.08
0.5 ANA/1 BAP	1/15	2	0.13 \pm 0.12
0.5 ANA/1.5 BAP	**4/15	9	0.60 \pm 0.27
0.5 ANA/1 Kin	*9/15	20	1.33 \pm 0.33
0.5 ANA/1.5 Kin	5/15	10	0.67 \pm 0.25

*3 explantes formaron callo en su base después de haber desarrollado brotes.

** 1 explante formó callo sin brotes.

Luego de haber cumplido 2 meses desde que se indujo la respuesta regenerativa en los 8 tratamientos, se prosiguió a resembrarlos al utilizar nuevamente medio MS 100% con sus mismos elementos adicionales en frascos “Gerber” grandes (25ml/frasco), ocupados anteriormente con el que se llevó a cabo la inducción regenerativa, pero con la única excepción de que no tenían reguladores de crecimiento; el fin de esto fue en promover a que los brotes continuaran con su desarrollo hasta convertirse en plántulas completas, además de observar la respuesta que tendrían los callos formados en algunos explantes de los tratamientos 0.5 ANA/1.5 BAP y 0.5 ANA/1Kin, si era posible o no inducir la formación de brotes por vía indirecta; aunque durante ese lapso de tiempo que se dejaron los explantes regenerados en sus respectivos tratamientos se presentó la oxidación y la contaminación, de manera que se perdió el 61.5% (16 explantes) de nudos regenerados, de modo que solo el 38.5% (10 explantes) lograron sobrevivir

a dichos problemas, entre estos el callo del tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP (Cuadro 6).

Cuadro 6. Explantes de nudo con respuesta regenerativa que lograron sobrevivir 2 meses antes de la resiembra.

No. explantes	Tratamiento
1	1.5 BAP
2	0.5 ANA/1.5 BAP
*4	0.5 ANA/1 Kin
**3	0.5 ANA/1.5 BAP

*2 explantes con brotes y callo en la base.

**1 explante convertido en callo.

Al cabo de 2 meses desde que fueron establecidos el 38.5% de los explantes regenerados sobrevivientes y el callo del tratamiento 0.5 ANA/ 1.5 BAP al nuevo medio MS 100% sin reguladores de crecimiento, solo un explante que presento callo perteneciente al tratamiento 0.5 ANA/1Kin se obtuvo el desarrollo de una plántula sin raíces de aproximadamente 5 cm de altura a partir del único brote que tenía, de modo que sus hojas bipinnadas no estaban atrofiadas y eran de color amarillento, además de que el callo no mostro indicios de aumento de masa celular, por lo que este se oxidó al mes después de la resiembra (Foto 19).



Foto 19. Plántula formada a partir del único brote que regeneró el explante de nudo con presencia de callo del tratamiento 0.5 ANA/1 Kin a los 2 meses desde su resiembra a medio MS 100% sin reguladores de crecimiento.

El resto de los explantes se perdieron por oxidaron a las 3 semanas desde su resiembra, pese a ello, el callo del tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP resistió a este problema, ya que solo tenía un aproximado de 20% de masa celular viva no diferenciada, por lo que logró adaptarse al nuevo medio de cultivo y proliferar en su desarrollo al mes de su establecimiento (Foto 20), alcanzando a los 3 meses un diámetro de 3 cm y una altura de 1.5 cm aproximadamente, en el que su coloración se tornó a blanco amarillenta con unas zonas verdosas y marrones, pero no hubo indicios de formación de brotes vía indirecta.

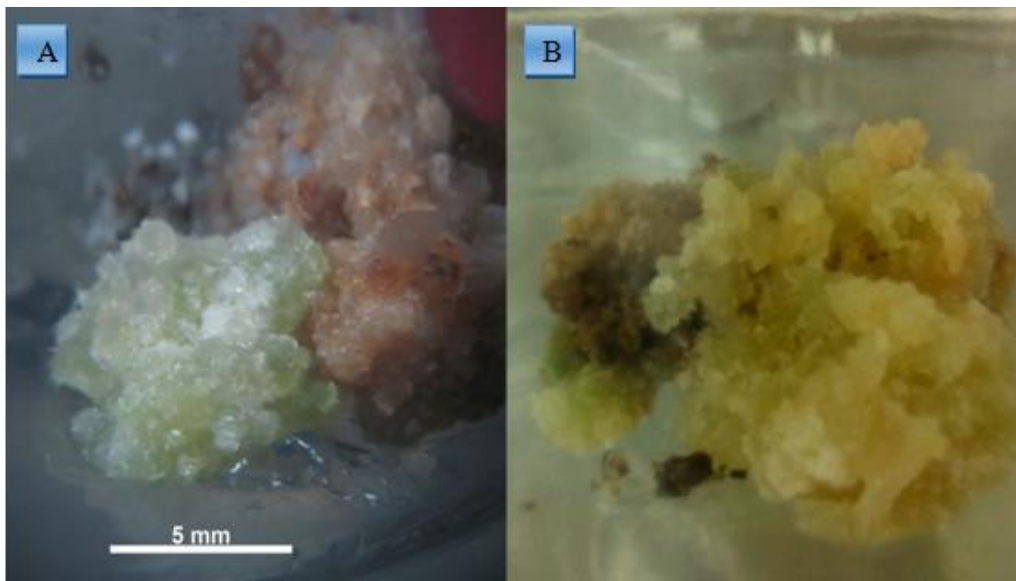


Foto 20. Callo de nudo de *Mimosa pudica* del tratamiento 0.5 ANA/ 1.5 BAP resembrado en medio MS 100% sin reguladores de crecimiento; el 20% de masa celular que sobrevivió a la oxidación proliferó al mes de su establecimiento (A) sin mostrar indicios de formación de brotes a los 3 meses después de la resiembra (B).

7. DISCUSIÓN

El método de desinfección que llevó a cabo Afshan (2011) para la siembra *in vitro* de semillas de *Mimosa pudica* fue más severo que la del presente trabajo, dado que incluyó sulfato de estreptomina al 25% (por 25 minutos) y utilizó cloruro de mercurio al 1% (por 5 minutos) en lugar de hipoclorito de sodio, de igual modo resultó ser efectivo.

Una posible razón por lo cual la mayoría de las semillas no lograron germinar se debió a que no eran viables o sufrieran algún daño al momento de su desinfección (Levitus *et al.*, 2010; Nikoloff, 2015), aunque de igual forma influyeron las condiciones de incubación (temperatura y fotoperiodo) proporcionados durante el desarrollo germinativo, por lo que afectó de manera directa dicho proceso. Por otro lado, las semillas no fueron escarificadas para facilitar su germinación, de manera que el porcentaje de germinación sobre dicha especie fue bajo en comparación con los resultados obtenidos por Chauhan y Johnson (2009), que obtuvieron una mayor respuesta germinativa (93.7%) al haber escarificado las semillas e incubadas a una temperatura de 35° C diurna/25° C nocturna en un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad continua.

Respecto a la inducción germinativa, Afshan (2011), utilizó diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG₃) diluidas en agua destilada esterilizada (2, 5 y 10 mg/l) para su remojo durante la noche, de tal forma que el tiempo de germinación *in vitro* sobre medio MS 100% fue similar al del presente trabajo, con la diferencia de que dicha etapa empezó a partir del día 4 después de la siembra. Sin embargo, Afshan no menciona el porcentaje de semillas que lograron o no germinar *in vitro* por cada concentración de AG₃.

Con base en las investigaciones de Levitus *et al.*, (2010) respecto a los problemas que pueden afectar los explantes durante su establecimiento en los cultivos; la oxidación de los peciolos, las pinnas y las yemas apicales después de haber sido establecidos en los tratamientos se pudo deber a que las plántulas *in vitro* de donde fueron extraídas no tuvieron un desarrollo fisiológico normal durante su incubación sobre medio MS 50/100, puesto que tenían los tallos muy delgados y

las hojas pálidas. De manera que dichos explantes se mostraron débiles y pequeños con poco tejido que al momento de la siembra no lograron soportar el estrés ocasionado por la disección y el cambio de condiciones, de tal forma que les ocasiono su muerte; asimismo, el estrés pudo también haber influido en la muerte de las plántulas después de realizarse la poda. De acuerdo con Abdelnour-Esquivel y Escalant (1994), se debe asegurar que las plantas *in vitro* de cualquier especie a utilizar estén en perfectas condiciones fisiológicas para extraer los explantes, con el fin de que dichos explantes sobrevivan y den una respuesta regenerativa, además de posibilitar a las plantas *in vitro* en inducir a desarrollar nuevos brotes para incrementar rápidamente nuevo material biológico aséptico sin generar mucho estrés.

Afshan (2011) utilizo plántulas *in vitro* de *Mimosa pudica* de 10 días de edad para extraer el hipocótilo, el epicótilo y los nudos cotiledonales para su cultivo bajo diferentes concentraciones de auxinas (ANA, AIA) y citocininas (BAP, Kin). No tuvo problemas de oxidación y contaminación en sus cultivos cuando fueron establecidos, por lo que obtuvo el 82% de respuesta regenerativa exitosa. También tuvo un caso similar respecto a la regeneración anormal de los explantes, ya que los nudos cotiledonales y el epicótilo mostraron regeneración de brotes a las 4 semanas después de su establecimiento, pero presentaron anomalías tanto en el tallo como en las hojas, por lo que después desarrollaron callo en la base de dichos explantes. Sin embargo, no describió el crecimiento y desarrollo morfológico de las plántulas, por lo que se desconoce si durante ese tiempo que dejo crecer a las plántulas lograron superar la longitud del epicótilo en comparación con los ya registrados en el presente trabajo, dado que a las 2 semanas de edad, todavía era demasiado pequeño para su utilización como explante.

Por otra parte, Hassan *et al.* (2010) que trabajaron también con *Mimosa pudica* para su establecimiento en el cultivo *in vitro*, pero a diferencia de Afshan (2011) utilizaron plantas adultas para extraer los nudos y las yemas apicales, no hicieron mención alguna de que dichos explantes hayan presentado contaminación u oxidación, pero sí de la respuesta regenerativa, donde los 13 tratamientos

(excepto el testigo) bajo diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) con ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) utilizados en su investigación se obtuvieron promedios de 46.2 ± 6.68 (nudo) y $38 \pm 5.99\%$ (yema apical) de brotes regenerados entre la tercera y octava semana después de su establecimiento, por lo que al parecer, el método de desinfección que llevaron a cabo fue más sencillo y efectivo, dado que solo emplearon agua de grifo, jabón líquido (por 30 minutos), etanol 70% (por 1 minuto) y cloruro de mercurio al 0.1% (por 8 minutos) para realizar tal proceso, que en comparación con el método realizado en el presente trabajo fue severo y poco efectivo.

En contraste con los métodos de desinfección realizados por Batchelor *et al.*, (1989) y Forlin *et al.* (2000) para establecer los explantes de sus plantas de estudio (*Prosopis chinensis*, *P. cineraria*, *P. juliflora* y *Desmanthus virgatus*) ocuparon hipoclorito de sodio en menor concentración y aplicado a no mayor de 10 minutos durante el proceso, por lo que posiblemente no genero deterioro en los explantes.

Los resultados obtenidos del número de brotes/explante del presente trabajo fueron distintos a los Gharyal y Maheshwari (1982), dado que ellos obtuvieron mayor respuesta regenerativa al establecer los nudos y yemas apicales en medio N6 con 0.5 2,4-D/1 BAP, de modo que cada nudo produjo de 3 a 5 brotes, mientras que la yema apical dio de 3 a 4 brotes (citado por Parrott, *et al.*, 1992). Sin embargo, Afshan (2011) también obtuvo mayor respuesta regenerativa al producir de 3 a 4 brotes/explante, con la diferencia de que los nudos cotiledonales fueron los mejores explantes que dieron dicha respuesta regenerativa sobre medio MS con 0.5 ANA/1 Kin, pero con la similitud de que tardaron 4 semanas después de la siembra en responder.

Para el caso de Hassan *et al.* (2010), sus resultados fueron eficientes, dado que en sus tratamientos (a excepción del testigo, que no regenero ningún brote) cada nudo produjo de 3 a 5 brotes y la yema apical de 3 a 4 brotes, de tal forma que el tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP fue el que dio mejor respuesta regenerativa, con promedios de 20.4 ± 1.20 (nudo) y 12.2 ± 1.15 (yema apical) brotes por explante, además de que ninguno de los explantes regenerados en cada tratamiento

desarrollo callo, de tal forma de que los brotes regenerados lograron convertirse en plántulas a las 12 semanas de cultivo sin ser resembrados. Sin embargo, las condiciones que proporcionaron dichos autores a los explantes para su establecimiento en el cultivo *in vitro* no fueron tan diferentes con los empleados en el presente trabajo, además de que en el medio MS que ocuparon no incluyeron antioxidante e ingredientes extras para el enriquecimiento nutricional del medio de cultivo.

Cabe señalar que en los trabajos citados sobre el cultivo *in vitro* realizados en fabáceas mimosoideas (Batchelor *et al.*, 1989; Sinha y Mallick, 1993; Nandwani, 1995; Villareal y Rojas, 1996), el promedio y error estándar de número de brotes por explante (a excepción de Batchelor *et al.*, 1989, que no registraron error estándar) fueron superiores a los obtenidos con el presente trabajo, puesto que modificaron el medio MS en cuanto a tipo de gelificante y pH, pero sin variar tanto las condiciones de temperatura y fotoperiodo para el cultivo, además de no haber tenido problemas de oxidación y contaminación que pudieran alterar significativamente sus resultados.

Por otra parte, Forlin *et al.* (2000) lograron regenerar brotes indirectos a partir de callos de hojas de *Desmanthus virgatus* con los tratamientos 1 ANA/3 BAP y 1 IBA/3 BAP antes de ser resembrados. El tratamiento 1.5 Kin empleado en las pinnas de la especie del presente estudio que sobrevivieron a la oxidación no fue adecuada para estimular alguna respuesta regenerativa, aunque en el caso de Gharyal y Maheshwari (1982) sí pudieron obtener callo de pinnas con el tratamiento 0.5 2,4-D/1 BAP pero sin haber regenerado brotes indirectos (citado por Parrott, *et al.*, 1992).

8. CONCLUSIONES

- Se logró con éxito el establecimiento *in vitro* de las semillas de *Mimosa pudica* sobre medio 50/100 para la germinación en un 100% de asepsia. En cambio, la desinfección de los explantes de nudo obtenidos de plantas adultas no erradico por completo la contaminación y aumento la oxidación, aun así, algunos explantes lograron sobrevivir a dichos problemas y consiguieron dar respuesta regenerativa en los cultivos.
- La hidratación, estratificación e incubación aplicadas en las semillas para inducir la germinación no produjeron suficientes plántulas para la extracción de explantes, por lo que se recomienda probar con otros métodos de inducción que garanticen un alto porcentaje germinativo.
- El crecimiento juvenil de *Mimosa pudica* bajo condiciones *in vitro* permitió estudiar el tiempo que demoran en desarrollar sus estructuras vegetativas, de tal modo que el presente trabajo contribuye al generar conocimiento sobre esta especie en cuanto al desarrollo morfológico *in vitro*.
- El tratamiento 0.5 ANA/1.5 Kin no fue el apropiado para inducir algún tipo de respuesta regenerativa en las pinnas de plántulas *in vitro*, mientras que los 2 explantes de yema apical respondieron eficazmente al tratamiento 1.5 Kin, dado que cada explante logró formar un brote atrofiado vía directa y callo en su base.
- El tratamiento que tuvo mayor promedio y error estándar de brotes/explante de nudo que no presentó altos índices (%) de contaminación y oxidación fue 0.5 ANA/1 Kin con 1.33 ± 0.33 . Sin embargo, junto con el tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP fueron los únicos que formaron callo en algunos explantes que habían desarrollado brotes antes, a excepción de un explante del tratamiento 0.5 ANA/1.5 BAP, en el cual se convirtió en callo por completo.

9. LITERATURA CITADA

Abdelnour Esquivel, A., & Escalant, J. V. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales.

Adema M. (2015). Plantas de probeta; Capitulo 5: Establecimiento de cultivos *in vitro*- plantas madres y explantes. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). pp. 81-91.

Afshan, T. (2011). In-vitro Shoot regeneration in *Mimosa pudica* L. Vegetos-An International Journal of Plant Research, 24(2), 149-151.

Aguilar, A. y Zolla, C. (1982). Plantas Tóxicas de México, México, IMSS, Ira ed., 271 pp.

Azmi, L., Singh, M. K., & Akhtar, A. K. (2011). Pharmacological and biological overview on *Mimosa pudica* L. International journal of pharmacy & life sciences, 2(11).

Balmer, R. T., & Franks, J. G. (1975). Contractile characteristics of *Mimosa pudica* L. Plant physiology, 56(4), 464-467.

Barneby, R. C. (1991). *Sensitivae censitae*: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World (Vol. 65).

Barrera Nereyda A. (1971). Plantas medicinales utilizadas en las comunidades de San Juan Guichicovi, Oax., Oaxaca, Centro Coordinador Indigenista-San Juan Guichicovi, Oax., Oaxaca, 1-16.

Batchelor, C. A., Yao, D., Koehler, M. J., & Harris, P. J. C. (1989). In vitro propagation of *Prosopis* species (*P. chilensis*, *P. cineraria* and *P. juliflora*). In *Annales des Sciences Forestieres* (Vol. 46, No. Supplement, pp. 110s-112s). EDP Sciences.

Boeri P. (2015). Plantas de probeta; Capítulo 3: Medio de cultivo-reguladores de crecimiento. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). pp. 46-72.

Burkart, A. (1978). Leguminosas. En L.R. Parodi (ed.), Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Ed. Acme, Buenos Aires. pp. 467-538.

Burkart, A. (1979). Leguminosas Mimosoideas. En R. Reitz (ed.), Fl. II. Catarinense fasc. LEGU: 1-299.

Calatayud García, Adela (1990). Estudio etnobotánico de Plantas Medicinales en una comunidad Nahua de la Sierra de Sta. Martha, Veracruz., Xalapa, Veracruz, Fac. de Biología, UV, 132.

Camargo–Ricalde, S. L., Grether, R., Martínez–Bernal, A., & García–García, V. Barrios–del–Rosal S. (2001). Especies útiles del género *Mimosa* (Fabaceae–Mimosoideae) en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 68, 33-44.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay.

Cedres-Gazó M. y Sharry S. (2015). Plantas de probeta; Introducción. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). pp. 6-12.

Chauhan, B. S., & Johnson, D. E. (2009). Germination, emergence, and dormancy of *Mimosa pudica*. *Weed Biology and Management*, 9(1), 38-45.

Forlin, S. M., Rey, H. Y., & Mroginski, L. A (2000). Cultivo de tejidos de *Desmanthus virgatus*: obtención de plantas a partir de hojas.

Ganapathi, A., Anbazhagan, V. R., Amutha, S., & Anand, R. P. (2003). In Vitro Organogenesis. In *Improvement Strategies of Leguminosae Biotechnology* (pp. 65-85). Springer Netherlands.

Gómez Salazar L. del C. y Chong de la Cruz I. (1985). Conocimiento y usos medicinales de la flora de Amatlán, municipio de Tepoztlán, Morelos, Tesis Lic., México, D.F., Facultad de Ciencias, UNAM, 185.

Hassan, A. S., Sultana, R., Jahan, M. A. A., & Khatun, R. (2010). In vitro mass propagation of *Mimosa pudica* L., using shoot tip and nodal explants. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 45(2), 95-100.

Joseph, B., George, J., & Mohan, J. (2013). Pharmacology and traditional uses of *Mimosa pudica*. International journal of pharmaceutical sciences and drug research, 5(2), 41-44.

Kumar, N., Kaur, P., Das, K., & Chakroborty, (2009). *Mimosa pudica* L. a sensitive plant. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 1(2), 1-7.

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

Lira Saldívar R. H. (2007). Fisiología Vegetal 2º Edición Editorial Trillas. Universidad Agraria Antonio Narro. México. pp. 1-212.

Martínez Alfaro M. A. (1987). Investigaciones en plantas medicinales en la Sierra Norte de Puebla", Cuadernos de Extensión Académica, Núm. 36, 59-63.

Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Martínez-Bernal A., Grether R. y González-Amaro R. M.(2008). Leguminosae I; Mimosoideae: *Mimosa*. Flora de Veracruz. Departamento de Biología, División CBS. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. pp. 2-129.

Mroginski, L. A. y Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.

Muller, L. E., Cecil, J. E., Hemmes, C. L., González, U., Nanda, K. K. y Kochar, V. K. (2000) . Manual de laboratorio de morfología vegetal (No. CATIE 571.3 M958). CATIE, Turrialba (Costa Rica).

Nandwani, D. (1995). In vitro micropropagation of a tree legume adapted to arid lands *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*. In Annales des sciences forestières (Vol. 52, No. 2, pp. 183-189). EDP Sciences.

Nikoloff N. (2015). Plantas de probeta; Capítulo 7: Problemas en el cultivo de tejidos vegetales. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). pp. 102-111.

Ortiz Gil, G.(1987). Las Plantas Medicinales de la Cuenca del Río Usumacinta, Tabasco, Memorias del X Congreso Mexicano de Botánica, 161.

Parrott, W. A., Bailey, M. A., Durham, R. E., & Mathews, H. V. (1992). Tissue culture and regeneration in legumes. Biotechnology and crop improvement in Asia. ICRISAT, Patancheru, 115-148.

Rodríguez, C. B., y Porras, M. M. (2002). Botánica sistemática Compilación. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 176-201.

Rzedowsky, J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. Acta Botánica Mexicana 14:3-21.

Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.

Sinha, R. K., & Mallick, R. (1993). Regeneration and multiplication of shoot in *Albizia falcataria*. Plantcell, tissue and organ culture, 32(2), 259-261.

Sousa, J. D. S. D., Bastos, M. D. N. D. C., & Rocha, A. E. S. (2009). Mimosoideae (Leguminosae) on the coast of Pará. *Acta Amazonica*, 39(4), 799-811.

Stevens W. D., Ulloa, C., Pool, A. & Montiel O. M. (2001). Flora de Nicaragua (Vol. 85, No. 1, p. 943). St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.

Villarreal, M. L., & Rojas, G. (1996). In vitro propagation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, a Mexican medicinal tree. *Plant cell reports*, 16(1-2), 80-82.

Villaseñor R. J. L. y F. J. Espinosa G. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Volkov, A. G., Foster, J. C., Ashby, T. A., Walker, R. K., Johnson, J. A., &Markin, V. S. (2010). *Mimosa pudica*: electrical and mechanical stimulation of plant movements. *Plant cell & environment* 33(2), 163-173.

Waterhouse, D. F. (1994). Biological control of weeds: Southeast Asian prospects (Vol. 125). Canberra: ACIAR.

Weintraub M. (1952). Leaf movements in *Mimosa pudica* L. *The New Phytologist*, 50(3), 357-382.

Xuan, T. D., Tawata, S., &Khanh, T. D. (2013). Herbicidal Activity of Mimosine and Its Derivatives. In *Herbicides—Advances in Research* (Vol. 15, pp. 299-312). InTech.