

EFECTO DEL pH Y EL PESO INICIAL DE IMPLANTE SEMBRADO EN LA MULTIPLICACIÓN CALLOGÉNICA DE *CANAVALIA ENSIFORMIS*

EFFECT OF pH AND THE INITIAL CULTURE WEIGHT ON THE CALLOGENIC MULTIPLICATION OF *CANAVALIA ENSIFORMIS*

Juan F. Saldarriaga^{1, 2}, Julián Lopez¹, Cindy Lopera¹, Liliana Botero¹

(1) Universidad de Medellín, Programa de Ingeniería Ambiental, Carrera 87 N° 30-65, Medellín - Colombia

(2) Universidad de País Vasco, Departamento de Ingeniería Química, Barrio Sarriena s/n, Leioa - España
(e-mail: juanfelorza@gmail.com)

Recibido: 19/12/2013 - evaluado: 12/02/2014 - aceptado: 14/03/2014

RESUMEN

Este trabajo evalúa el efecto del pH del medio de cultivo en la multiplicación callogénica de *Canavalia ensiformis*. Con el fin de obtener datos para un crecimiento óptimo de la biomasa callogénica, se determinaron dos rangos de trabajo, el primero comprendido entre 4.5 y 5.5 y el segundo entre 5.5 y 6.0, determinando el efecto que este producía en la multiplicación callogénica. Así mismo, se observó que la cantidad de callo sembrado inicialmente influye en el aumento de la biomasa. Luego de realizar un análisis de varianza a los datos de siembra obtenidos, se encontró que el mejor pH para el medio de cultivo es de 5.5, mientras que el peso del callo a ser sembrado debe ser mayor de 0.2500 gramos, con el fin de realizar una propagación adecuada de *C. ensiformis* para la obtención de metabolitos de interés comercial.

ABSTRACT

This paper evaluates the effect of pH of the culture medium in *Canavalia ensiformis* callogenic multiplication. In order to obtain data for optimal growth of biomass callogenic, two work ranges were determined, the first between 4.5 and 5.5 and second between 5.5 and 6.0, determining the effect it produced on callogenic multiplication. Also, it was observed that the amount of seed callus affects the increase of biomass. Then an analysis of variance to planting obtained data, it was found that the best pH for the culture medium is 5.5, whereas the weight of the callus to be sown should be greater than 0.2500 grams, in order to realize was made *C. ensiformis* propagation adequate for commercial production of metabolites of interest.

Palabras clave: *Canavalia ensiformis*; in vitro; cultivo; pH

Keywords: *Canavalia ensiformis*; in vitro; cultures; pH

INTRODUCCIÓN

C. ensiformis de nombre común canavalia o frijol gigante, es una planta robusta, resistente a la sequía anual, inmune a la mayoría de las plagas, se cultiva extensamente para forraje y abono verde. Las vainas jóvenes y las semillas inmaduras se utilizan como alimento para consumo humano, mientras que las semillas maduras se utilizan como alimento para el ganado (FAO, 2005). Esta ha sido utilizada a nivel agronómico como abono verde en asociación con *Rhizobium* y otros cultivos alternativos para la protección de especies recién sembradas, control de malezas y plagas, cobertura, reguladora del potencial hídrico, insecticida en especial para hormiga arriera (*dimetilhomoptercarpina* la cual actúa como antifúngico), con rendimientos de cultivo hasta de 10 ton/ha, a nivel ecológico evita la erosión hídrica y eólica, recupera suelos. La semilla posee hasta 30% de proteína cruda y aunque presenta varias sustancias antinutricionales como la canavanina (análogo de la arginina), L-canalina (proteína), ureasa y otros factores antiproteicos (Hwang *et al.*, 1996).

A nivel industrial ha sido usada para la obtención de ureasa (EC 3.5.1.5, urea amidohidrolasa), amino ácidos (excepto triptófano), almidón, hemicelulosa, azúcares, saponinas y lectinas como la concaavalina A, la cual es considerada antipirítica, hematoaglutinante e hipocolesterolemica (Mulinari *et al.*, 2007; Staniscuaski *et al.*, 2009; Mulinari *et al.*, 2011; Postal *et al.*, 2012). A nivel medicinal está siendo estudiada por sus potencialidades para la inhibición del crecimiento de tejidos humanos anormales mediante la producción de trigomelina, de igual manera se encuentra entre las 10 especies vegetales productoras de insulina (Kovacs, 1982; Ribeiroasilva *et al.*, 1986; Barjafidalgo *et al.*, 1991; Ribeiroasilva & Prado, 1993; Sridhar & Seená, 2006).

C. ensiformis presenta múltiples isoformas de ureasa (Follmer *et al.*, 2001; Pires-Alves *et al.*, 2003; Mulinari *et al.*, 2011). Mamiya *et al.* (1985), Mamiya *et al.* (1987) y Riddles *et al.* (1991), determinaron la estructura primaria de la subunidad del amino ácido 840 del componente principal de la ureasa de la canavalia JBURE-I y Riddles *et al.*, (1991), reportó la secuencia de nucleótidos de su ADNc. Esta ureasa posee actividad antifúngica en concentraciones submicromolar, la inhibición de la germinación de esporas y/o el crecimiento del número de micelios de hongos filamentosos. Ni los efectos entomotóxico ni fungitóxicos de ureasa son debido a la liberación de amoniaco, ya que el tratamiento de ureasas con p-hidroximercuribenzoato, un inhibidor irreversible de la actividad ureolítica, no interfieren con estas actividades (Becker-Ritt *et al.*, 2007; Follmer *et al.*, 2004).

Por otra parte, Follmer *et al.* (2001), demostró que la canotoxina (CNTX), es una proteína neurotóxica de *C. ensiformis*, siendo esta una isoforma de la ureasa. La CNTX muestra propiedades insecticidas (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Piovesan *et al.*, 2008) y fungitóxicas (Becker-Ritt *et al.*, 2007), lo que sugiere que esta ureasa puede estar involucrada en la defensa de la planta (Carlini & Grossi-de-Sa, 2002; Carlini & Polacco, 2008).

Se han realizado estudios sobre el cultivo de embriones, cotiledones y siembra de embriones con sus cotiledones en medio enriquecidos con 6-benzilamino purina (BAP), implementando pruebas de inmunodifusión para la detección de concaavalina A y canotoxinas, según los reportes, las canotoxinas fueron detectadas en los embriones en los primeros 30 días de cultivo y la concaavalina A fue detectada incluso luego de 90 días de cultivo en todos los cultivos (Sato *et al.*, 1993).

La absorción de nutrientes in vitro se ve afectada por diversos factores, tales como agentes gelificantes (Debergh, 1983), la descomposición de los carbohidratos y agentes quelantes (Schenk *et al.*, 1991). Además, el pH extracelular puede afectar la absorción de iones y al mismo tiempo las competiciones iónicas ya existentes (Pasqua *et al.*, 2002). Estudios han demostrado que bajos niveles de pH están asociados con la inhibición de la absorción de cationes, mientras que la captación de aniones puede ser ligeramente influenciada o no ser influenciada (Pasqua *et al.*, 2002). En particular, la atención se ha centrado en el efecto del pH sobre la absorción del nitrógeno por las raíces y en la manera en la que la forma predominante de nitrógeno (es decir, NH_4^+ o NO_3^-) en la solución nutritiva influye en la absorción de los otros iones (Raven & Smith, 1976; Zsoldos & Haunold, 1982; Lang & Kaiser, 1994; Pasqua *et al.*, 2002).

El uso y disponibilidad del nitrógeno en los tejidos vegetales varía de acuerdo con su fuente y las condiciones ambientales tales como la temperatura, el genotipo de la planta y el pH del medio (Orlikowska, 1992; Tan *et al.*, 2000). En particular, el uso de NH_4^+ en los medios de cultivo de tejidos afecta el pH del medio debido a que los iones H^+ son liberados y utilizados como forma de nitrógeno (Sathyanarayana & Blake, 1994). Esto puede afectar los procesos fisiológicos que influyen en la tasa de crecimiento de los brotes (Leifert *et al.*, 1992) y enraizamiento (Bennett *et al.*, 2003; Woodward *et al.*, 2006).

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes tipos de pH del medio de cultivo para determinar el óptimo en el cual la siembra de *C. ensiformis* logre un crecimiento adecuado y se logren cantidades suficientes con el fin de ser utilizada para aprovechamiento de sus metabolitos de interés. De esta manera se establecerán unos parámetros iniciales de siembra para dicha especie.

MATERIALES Y METODOS

C. ensiformis fue cultivada en frascos de vidrio (55 cm de diámetro por 70 cm de alto) en el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Medellín, a partir de semillas y vainas recolectadas en el municipio de San Pedro de Urabá, Colombia. En la Fig. 1 se muestran el inicio de la germinación (Fig. 1a), el inicio de la respuesta callogénica (Fig. 1b), así mismo, la respuesta callogénica del hipocotilo y las características friables de los callos obtenidos (Fig. 1c y Fig. 1d).

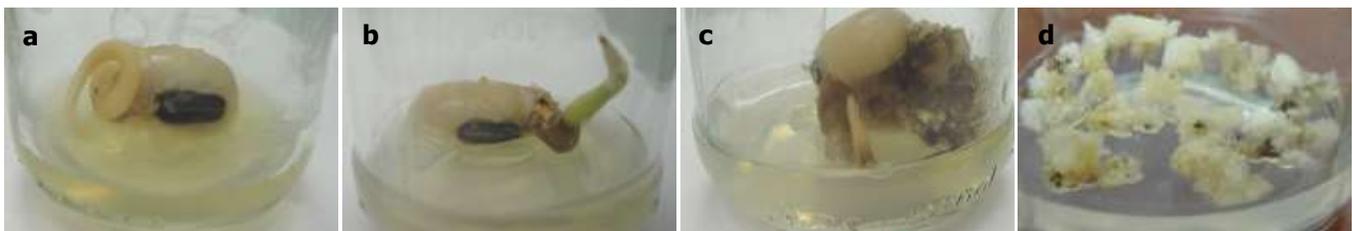


Fig. 1: Inducción callogénica de *C. ensiformis*. a) Inicio de la germinación; b) Inicio de la respuesta callogénica; c) Respuesta callogénica del hipocotilo; d) Características friable de los callos obtenidos.

Para determinar el efecto del pH sobre el crecimiento de los callos, estos fueron sembrados en sales MS (Murashige & Skoog, 1962) usadas como medio basal modificado con vitaminas (0.25 g/L piridoxina, 0.02 g/L tiamina, 0.25 g/L ácido nicotínico, 1.0 g/L glicina y 0.1 g/L mio-inositol) y suplementado con 3.0% (w/v) de sacarosa. El pH inicial del medio se ajustó con NaOH 1N y HCl 0.1N, luego fueron esterilizados en autoclave (121°C, 18 PSI, 20 min).

El trabajo fue dividido en dos rangos de pH, para los cuales se realizó un diseño experimental de tipo factorial, en el primer rango se tomaron pH de 4.5, 5.0 y 5.5 y en el segundo rango pH de 5.5, 5.7 y 6.0; así mismo, se tuvo en cuenta el peso inicial de callo, siendo divididos en cinco rangos (R1 = 0.0001g - 0.0500g, R2 = 0.0501g - 0.1000g, R3 = 0.1001g - 0.1500g, R4 = 0.1501g - 0.2000g, R5 = 0.2001g - 0.2500g) para el primer caso de pH evaluados y para el segundo caso de pH, se tomó solo un rango de pH y fueron mayor a 0.2500 g, debido a que luego de evaluar los cinco rangos en los demás pH se encontró que solo en siembras mayores en donde se observa un mayor incremento de la biomasa con respecto a la inicial. Todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado.

Para esto se tomaron 72 cajas de petri esterilizadas a 121 °C, 18 PSI durante 20 minutos, se pesaron vacías y luego con el explante, inmediatamente fueron cultivados a 23 ± 1 °C con luz blanca continua durante un mes. Después de este tiempo, se procedió a pesar los callos nuevamente y por diferencia de peso se obtuvo el crecimiento de la biomasa en el tiempo.

En total se evaluaron 72 explantes mediante un análisis de varianza con el software estadístico STATGRAPHICS V.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados generales mostraron que el pH del medio de cultivo afecta el incremento de biomasa callogénica. En la Tabla 1 y la Fig. 2, se observa que el pH de 5.5 evidencia mejores resultados en el crecimiento callogénico de *C. ensiformis* con un media de incremento de 0.3132 g (243.02%), mientras que el pH de 4.5 presentó menos aumento de la biomasa (0.1276 g), y por último el pH de 5.0 que tuvo un crecimiento medio con respecto a los demás pH (0.2037 g en promedio), porcentajes mucho menores al presentado por el pH de 5.5 de casi 250%.

Para realizar un análisis de los resultados de la siembra en diferentes medios de cultivo afectado por el pH se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA), demostrando que el factor determinante en el efecto de la multiplicación callogénica es el peso inicial de siembra del callo (Tabla 2), siendo el peso inicial del callo el factor que más contribuye a la varianza de los datos en la multiplicación callogénica, contribuyendo con un 83.20% de la variación total en el crecimiento. Por tanto, se procedió a dividir en cinco rangos de peso las muestras (R1 = 0.0001g - 0.0500g, R2 = 0.0501g - 0.1000g, R3 = 0.1001g - 0.1500g, R4 = 0.1501g - 0.2000g, R5 = 0.2001g - 0.2500g), esto con el fin de incrementar la sensibilidad de la prueba con respecto al pH y evaluar simultáneamente cual es el mejor rango de tamaño de callo para la siembra que permita lograr un mejor efecto en la multiplicación callogénica.

Tabla 1: Variación de la biomasa callogénica de *C. ensiformis* a diferentes pH de cultivo.

| Factor | pH 4.5 | pH 5.0 | pH 5.5 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|
| Peso inicial de biomasa (g) | 0.1296 | 0.1296 | 0.1289 |
| Peso final de biomasa (g) | 0.2572 | 0.3333 | 0.4421 |
| Incremento promedio de biomasa (g) | 0.1276 | 0.2037 | 0.3132 |
| Porcentaje de crecimiento (%) | 98.46 | 157.13 | 243.02 |

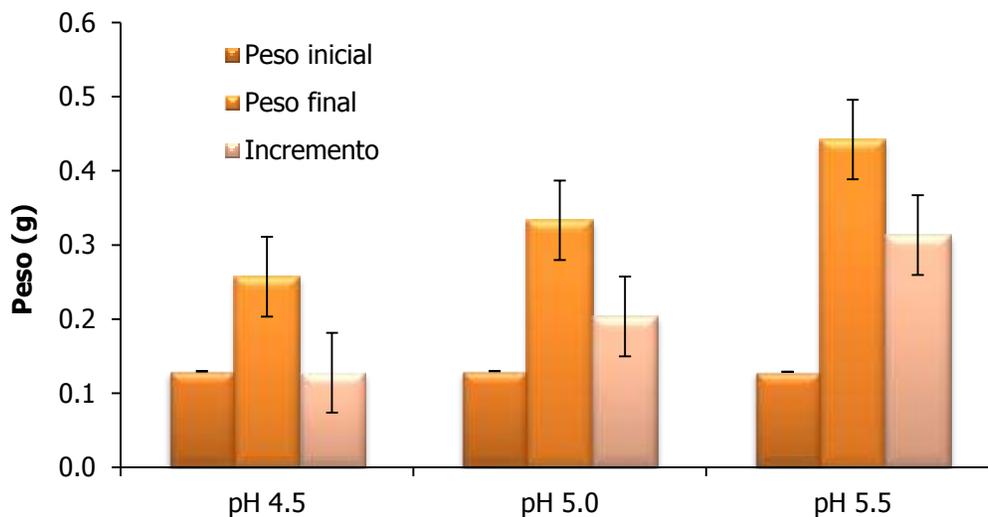


Fig. 2: Efecto del pH y la biomasa inicial sobre el incremento de la biomasa de *C. ensiformis* (Valores promedio y error típico).

Tabla 2: Análisis de Varianza para crecimiento

| Fuente | Suma de Cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado Medio | Componente de la Varianza | Por ciento |
|--------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------------------------|------------|
| TOTAL (CORREGIDO) | 2.1618 | 69 | | | |
| pH | 0.3148 | 2 | 0,1574 | 0,0056 | 16,80 |
| Peso callo inicial | 1.8470 | 67 | 0,0276 | 0,0276 | 83,20 |

En la Tabla 3, se muestran los análisis de varianza para cada uno de los rangos explicando el efecto del peso inicial del callo en la siembra, por ejemplo en el rango R1 se ve que el peso inicial es el factor que más contribuye a la varianza con un 100% de la variación total en la multiplicación callogénica. Igual ocurre con los demás rangos mostrando porcentajes desde el 74% hasta el 97%.

Aunque el peso inicial del callo es un factor importante en el efecto del crecimiento callogénico de *C. ensiformis*, en la Fig. 3 se puede observar que el pH también tiene un efecto, siendo la variable de mayor peso el pH 5.5 con respecto a los otros dos pH evaluados, ya que se presenta un mayor crecimiento de biomasa con respecto al peso inicial sembrado, mientras que para los demás pH se dan promedios de crecimiento similares.

Tabla 3: Análisis de Varianza para el efecto crecimiento para los diferentes rangos

| Rango | Fuente | Suma de Cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado Medio | Componente de la Varianza | Por ciento |
|-------|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------------------------|------------|
| R1 | TOTAL (CORREGIDO) | 0.1797 | 9 | | | |
| | pH | 0.0031 | 2 | 0.00157 | 0 | 0.00 |
| | Peso inicial | 0.1765 | 7 | 0.02522 | 0.0252 | 100.00 |
| R2 | TOTAL (CORREGIDO) | 0.6345 | 20 | | | |
| | pH | 0.1729 | 2 | 0.0864 | 0.0089 | 25.83 |
| | Peso inicial | 0.4616 | 18 | 0.0256 | 0.0256 | 74.17 |
| R3 | TOTAL (CORREGIDO) | 1.3290 | 23 | | | |
| | pH | 0.2990 | 2 | 0.1495 | 0.0126 | 20.46 |
| | Peso inicial | 1.0300 | 21 | 0.0490 | 0.0490 | 79.54 |
| R4 | TOTAL (CORREGIDO) | 0.7729 | 13 | | | |
| | pH | 0.1492 | 2 | 0.0746 | 0.0039 | 6.45 |
| | Peso inicial | 0.6237 | 11 | 0.0567 | 0.0567 | 93.55 |
| R5 | TOTAL (CORREGIDO) | 0.2415 | 9 | | | |
| | pH | 0.0578 | 2 | 0.0289 | 0.0008 | 2.95 |
| | Peso inicial | 0.1838 | 7 | 0.0263 | 0.0263 | 97.05 |

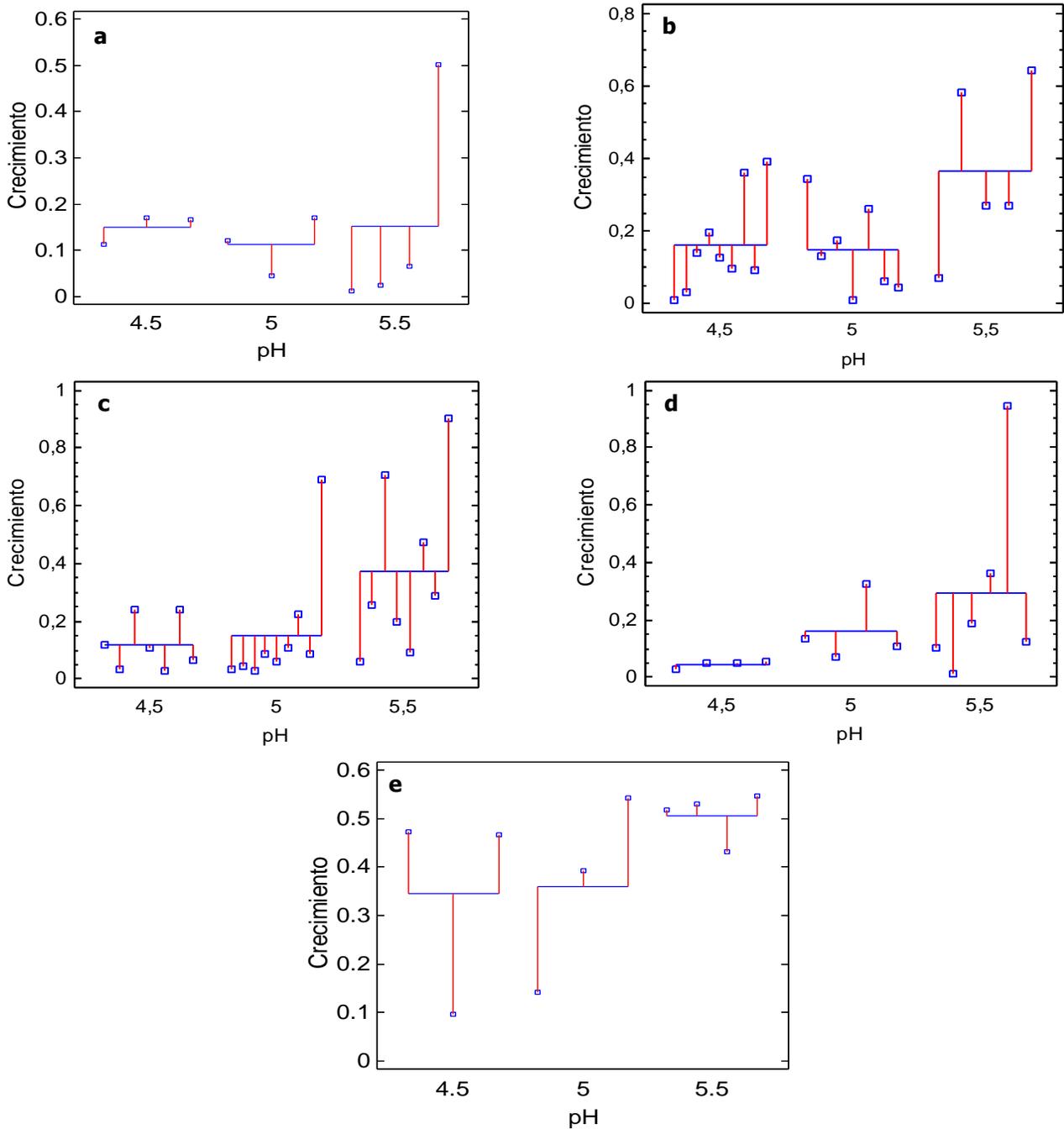


Fig. 3: Gráfico de componentes de varianza para los diferentes rangos. a) Rango R1; b) Rango R2; c) Rango R3; d) Rango R4; e) Rango R5.

De igual manera se realizó a las muestras un análisis de rangos múltiples, buscando con esto determinar cuáles medias son significativamente diferentes a otras en el factor pH. Entre el pH 4.5 y 5.0 no existen diferencias estadísticamente significativas, mientras que el pH 5.5 presenta diferencias con respecto a los otros dos pH (Fig. 3), estos resultados fueron obtenidos en *Eucalyptus marginata* (Woodward *et al.*, 2006).

Al evidenciar que el factor más importante en la multiplicación callogénica es el tamaño inicial de callo sembrado y que en los pH evaluados se presenta una gran diferencia entre el pH 5.5 y los demás pH (Fig. 4), se concluyó que los pH evaluados no incluyen rangos óptimos de cultivo y que posiblemente la tendencia de respuesta óptima se presente en rangos mayores, por lo que se procedió a evaluar el efecto del pH en un rango de peso mayor a 0.2500 gramos y un pH de 5.5, 5.7 y 6.0.

Efecto del pH 5.5, 5.7 y 6.0 con un rango de siembra mayor a 0.2500 g

En la Tabla 4, se observa que el pH 5.5 arroja mejores resultados en el crecimiento callogénico de *C. ensiformis*, con un porcentaje de crecimiento de 161.91%, mayor a los presentados por los otros dos pH, lo que indica que este es el pH que mejor se comporta en el crecimiento callogénico de canavalia. De igual manera se observa que a pH 5.7 se da un incremento muy similar al del pH 5.5, pero a un pH de 6.0 se ve disminuido el incremento (0.4395 g).

Tabla 4: Variación de la biomasa callogénica de *C. ensiformis* a diferentes pH de cultivo y un rango de siembra mayor de 0.2500 g.

| Factor | pH 5.5 | pH 5.7 | pH 6.0 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|
| Peso inicial de biomasa (g) | 0.5590 | 0.8011 | 0.8403 |
| Peso final de biomasa (g) | 1.4641 | 1.6347 | 1.2798 |
| Incremento promedio de biomasa (g) | 0.9051 | 0.8336 | 0.4395 |
| Porcentaje de crecimiento (%) | 161.91 | 104.05 | 52.30 |

El análisis de componentes de varianza para un rango mayor a 0.2500g para el efecto del crecimiento arrojó que el factor que más contribuye a la varianza es el peso inicial con un 98.86% de la variación total en la multiplicación callogénica (Tabla 4). De igual manera, se observa que este tamaño de callo disminuye nuevamente la sensibilidad del pH, posiblemente debido a las limitaciones que tienen los tejidos para nutrir las células ante el crecimiento de los callos.

Se procedió a realizar una prueba de rangos múltiples con el fin de determinar cuáles medias son significativamente diferente a otras en la variable pH, presentándose en la Fig. 5 que el pH 5.5 no es significativamente diferente con respecto al pH 5.7, mientras que el pH de 6 presenta menos crecimiento de biomasa después de 30 días de cultivo.

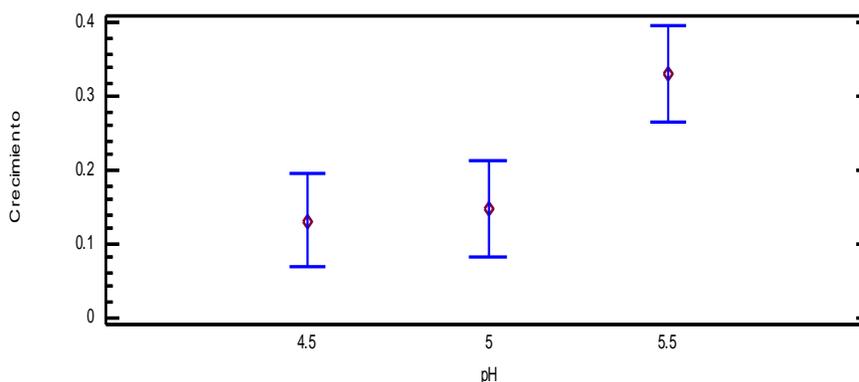


Fig. 4: Gráfico de medias del factor pH por crecimiento de callo

Tabla 4: Análisis de Varianza para Crecimiento rango de siembra mayor a 0.2500 gramos

| Fuente | Suma de Cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado Medio | Componente de la Varianza | Porcentaje |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------------------------|------------|
| TOTAL (CORREGIDO) | 26,7696 | 35 | | | |
| pH | 1,7282 | 2 | 0,8641 | 0,0088 | 1,14 |
| Peso inicial | 25,0414 | 33 | 0,7588 | 0,7588 | 98,86 |

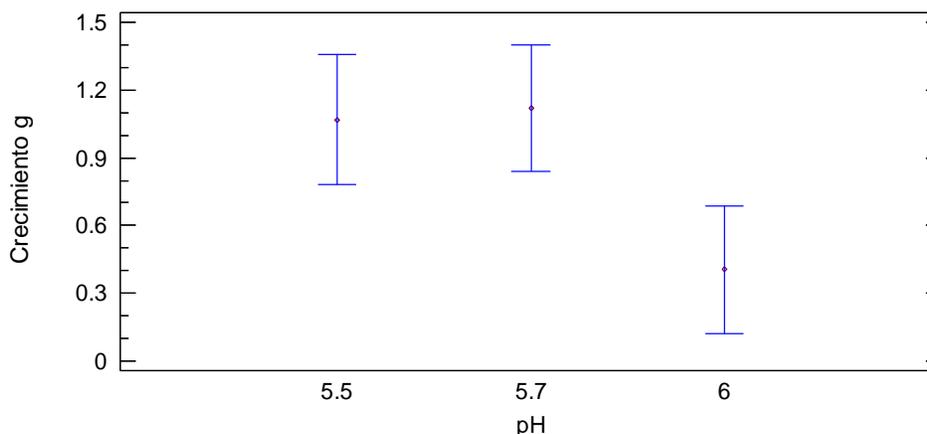


Fig. 5: Gráfico de medias del factor pH por crecimiento de callo

Estudios anteriores encontraron que la causa de acidez en el medio es debido al amonio y que los nitratos causan alcalinidad (Chaillou *et al.*, 1991; Skirvin *et al.*, 1994; Bennett *et al.*, 2003; Woodward *et al.*, 2006). En este trabajo, el amonio tuvo mayor impacto sobre el pH del medio de cultivo, debido a que los callos se desarrollan mucho mejor en este tipo de cultivos, mostrando similares resultados en cultivos in vitro de plantas diferentes en otros estudios (Goff & Yunker, 1988; Woodward *et al.*, 2006). En los análisis estadísticos se evidencia que el pH 5.5 es el que mejores resultados de crecimiento callogénico arroja, siendo el más óptimo para el cultivo de *C. ensiformis*.

De acuerdo a los análisis de varianza realizados se observa que es el efecto de siembra inicial el que más afecta el crecimiento callogénico, por tanto existe un potencial para investigar más a fondo el papel que juega el tamaño de siembra frente al pH óptimo sobre el efecto del crecimiento en cada uno de los rangos. Encontrar el pH óptimo permite de una manera proporcionar una condición inicial y ayuda para la siembra y multiplicación de *C. ensiformis* para el estudio de obtención de metabolitos de interés como es la CNTX/JBURE-I.

CONCLUSIONES

Determinar las condiciones de cultivo in vitro de *C. ensiformis*, representa una valiosa herramienta para el estudio y producción de importantes isoformas de ureasas. Su independencia de las condiciones ambientales permite el suministro continuo de materiales, así como el uso de un número de estrategias para estimular la producción específica de un metabolito importante o molécula como es el caso de la CNTX/JBURE-I. Los resultados de este estudio muestran que el pH del medio de cultivo influye en el crecimiento de *C. ensiformis*. En los análisis estadísticos se puede observar como en los pH 4.5 y 5.0 la respuesta en el crecimiento es menor con respecto al pH 5.5 y al evaluar el rango de pH entre 5.5 y 6, también se encontró una mejor respuesta de crecimiento en el medio pH 5.5, por lo cual se evidencia que es en el pH 5.5 donde se encuentra el óptimo crecimiento callogénico

de *C. ensiformis*. De igual manera, al evaluar el segundo rango de pH, se concluyó que es el pH 5.5 el que mayor efecto positivo presenta sobre el crecimiento con respecto a los pH 5.7 y 6.0. Finalmente se concluye que el mejor pH para el medio de cultivo es de 5.5 mientras que el tamaño de siembra influye de igual manera en el crecimiento del callo, por lo cual se recomienda la siembra de callo mayor a 0.2500 gramos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero mediante convenio específico Universidad de Medellín – Universidad CES.

REFERENCIAS

1. Barjafidalgo, C., Guimaraes, J.A. & Carlini, C.R. (1991). Lipoxigenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *canavalia-ensiformis* seeds. *Toxicon*, *29*, 453-459.
2. Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A.H.S., Mitidieri, S., Feder, V., Wassermann, G.E., Santi, L., *et al.* (2007). Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, *50*, 971-983.
3. Bennett, I.J., McDavid, D.A.J. & McComb, J.A. (2003). The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. *Biologia Plantarum*, *47*, 355-360.
4. Carlini, C.R. & Grossi-De-Sa, M.F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, *40*, 1515-1539.
5. Carlini, C.R., Oliveira, A.E.A., Azambuja, P., Xavier, J. & Wells, M.A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models: Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *Journal of Economic Entomology*, *90*, 340-348.
6. Carlini, C.R. & Polacco, J.C. (2008). Toxic properties of urease. *Crop Science*, *48*, 1665-1672.
7. Chaillou, S., Vessey, J.K., Morotgaudry, J.F., Raper, C.D., Henry, L.T. & Boutin, J.P. (1991). Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *Journal of Experimental Botany*, *42*, 189-196.
8. Debergh, P.C. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue-culture medium. *Physiologia Plantarum*, *59*, 270-276.
9. FAO (2005). Some commonly used cover crop species. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/ag/ca/2b.html>, acceso 30/11/2013.
10. Ferreira-Dasilva, C.T., Gombarovits, M.E.C., Masuda, H., Oliveira, C.M. & Carlini, C.R. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect Cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *44*, 162-171.
11. Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., *et al.* (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal*, *360*, 217-224.
12. Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Olivera-Severo, D. & Carlini, C.R. (2004). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases - Biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, *271*, 1357-1363.

13. Goff, W.L. & Yunker, C.E. (1988). Effects of pH, buffers and medium-storage on the growth of babesia-bovis invitro. *International Journal for Parasitology*, *18*, 775-778.
14. Hwang, D., Kim, S.G. & Kwon, Y.M. (1996). Canavanine synthesis in the in vitro propagated tissues of *Canavalia lineata*. *Plant Cell Reports*, *16*, 180-183.
15. Kovacs, P. (1982). Influence of different fixing agents on lectin binding by the tetrahymena. *Acta Histochemica*, *71*, 245-252.
16. Lang, B. & Kaiser, W.M. (1994). Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate-nitrogen or ammonium-nitrogen. *New Phytologist*, *128*, 451-459.
17. Leifert, C., Pryce, S., Lumsden, P.J. & Waites, W.M. (1992). Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *30* (3), 171-179.
18. Mamiya, G., Takishima, K., Masakuni, M., Kayumi, T. & Ogawa, K. (1987). Complete amino-acid-sequence of jack bean urease. *Journal of Protein Chemistry*, *6*, 55-59.
19. Mamiya, G., Takishima, K., Masakuni, M., Kayumi, T., Ogawa, K. & Sekita, T. (1985). Complete amino-acid sequence of jack bean urease. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, *61*, 395-398.
20. Mulinari, F., Becker-Ritt, A.B., Demartini, D.R., Ligabue-Braun, R., Staniscuaski, F., Verli, H., *et al.* (2011). Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, *1814* (12), 1758-1768.
21. Mulinari, F., Staniscuaski, F., Bertholdo-Vargas, L.R., Postal, M., Oliveira-Neto, O.B., Riden, D.J., *et al.* (2007). Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, *28*, 2042-2050.
22. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473-497.
22. Orlikowska, T. (1992). Effects of mineral-composition and acidity of media, saccharose level, brand and quantity of agar on rooting of fruit rootstocks invitro. *Biologia Plantarum*, *34*, 45-52.
23. Pasqua, G., Manes, F., Monacelli, B., Natale, L. & Anselmi, S. (2002). Effects of the culture medium pH and ion uptake in in vitro vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco. *Plant Science*, *162*, 947-955.
24. Piovesan, A.R., Staniscuaski, F., Marco-Salvadori, J., Real-Guerra, R., Defferrari, M.S. & Carlini, C.R. (2008). Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *38*, 1023-1032.
25. Pires-Alves, M., Grossi-De-Sa, M.F., Barcellos, G.B.S., Carlini, C.R. & Moraes, M.G. (2003). Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant and Cell Physiology*, *44*, 139-145.
26. Postal, M., Martinelli, A.H.S., Becker-Ritt, A.B., Ligabue-Braun, R., Demartini, D.R., Ribeiro, S.F.F., *et al.* (2012). Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. *Peptides*, *38*, 22-32.
27. Raven, J.A. & Smith, F.A. (1976). Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist*, *76*, 415-431.

28. Ribeiro dasilva, G., Carlini, C.R., Piresbarbosa, R. & Guimaraes, J.A. (1986). Blood-glucose alterations induced in rats by canatoxin, a protein isolated from jack bean (*canavalia-ensiformis*) seeds. *Toxicon*, 24, 775-782.
29. Ribeiro dasilva, G. & Prado, J.F. (1993). Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. *Toxicon*, 31, 1131-1136.
30. Riddles, P.W., Whan, V., Blakeley, R.L. & Zerner, B. (1991). Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. *Gene*, 108, 265-267.
31. Sathyanarayana, B.N. & Blake, J. (1994). The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on invitro rooting of jackfruit (*artocarpus-heterophyllus* lam). Physiology, growth and development of plants in culture Conference entitled "Physiology, growth and development of plants and cells in culture", Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer, pp. 77-82.
32. Sato, A., Barcellos, G.B.S., Riedel, E.C., Carneiro, J.A., Carlini, C.R. & Esquibel, M.A. (1993). The presence of concanavalin-a and canatoxin in *canavalia-ensiformis* dc tissue-culture. *Plant Cell Reports*, 12, 233-236.
33. Schenk, N., Hsiao, K.C. & Bornman, C.H. (1991). Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant-tissue culture media. *Plant Cell Reports*, 10, 115-119.
34. Skirvin, R.M., Mcpheeters, K.D. & Norton, M. (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *Hortscience*, 29, 1232-1237.
35. Sridhar, K.R. & Seena, S. (2006). Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* - A comparative study. *Food Chemistry*, 99, 267-288.
36. Staniscuaski, F., Brugge, V.T., Carlini, C.R. & Orchard, I. (2009). In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *Journal of Insect Physiology*, 55, 255-263.
37. Tan, X.W., Ikeda, H. & Oda, M. (2000). The absorption, translocation, and assimilation of urea, nitrate or ammonium in tomato plants at different plant growth stages in hydroponic culture. *Scientia Horticulturae*, 84, 275-283.
38. Woodward, A.J., Bennett, I.J. & Pusswonge, S. (2006). The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on in vitro shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. *Scientia Horticulturae*, 110, 208-213.
39. Zsoldos, F. & Haunold, E. (1982). Influence of 2,4-d and low pH on potassium, ammonium and nitrate uptake by rice roots. *Physiologia Plantarum*, 54, 63-68.

