

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Evaluación de Auxinas en Vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*

Por:

**MALLENI BLANCA PÉREZ MORALES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México.  
Octubre de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Evaluación de Auxinas en Vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*

Por:

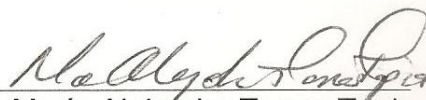
**MALLENI BLANCA PÉREZ MORALES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

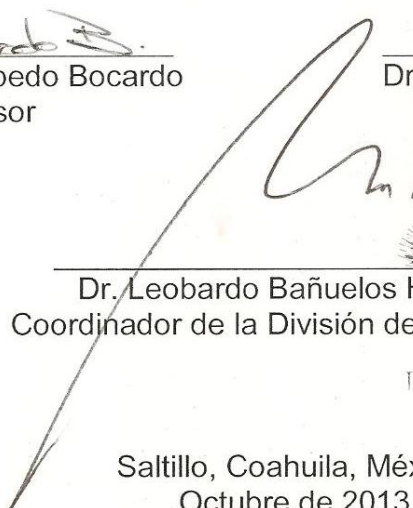
**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Aprobada

  
M.P. María Alejandra Torres Tapia  
Asesor Principal

  
M.C. Leticia Escobedo Bocado  
Coasesor

  
Dra. Francisca Ramírez Godina  
Coasesor

  
Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía  
Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.  
Octubre de 2013

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios** muchas gracias padre celestial por cada una de tus bendiciones, por guiar mi vida con energía, esto ha hecho que sea lo que soy, y te pido que me acompañes a lo largo de mi vida profesional.

**A la Virgen de Guadalupe** tú que eres madre te agradezco por escucharme y guiarme en todo momento.

**A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** mi “Alma Mater” por la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura y por brindarme apoyo en sus materiales, así como uso de sus instalaciones de la cual siempre me sentiré orgullosa y poner en alto a la universidad.

**A la M.P. Alejandra Torres Tapia.** Expresar mi más sincero agradecimiento por sus enseñanzas brindadas en esta investigación por su apoyo, paciencia, dedicación, exigencia y recomendaciones en la conducción y revisión de este trabajo para llevarlo a su conclusión, Dios la bendiga maestra.

**A la M.C. Leticia Escobedo Bocado.** Por su amistad incondicional ya que fue mi tutora y sobre todo los consejos, observaciones, comentarios y por compartir sus experiencias en clase y su apoyo en todo momento y brindarme su confianza y apoyarme durante mi estancia en esta universidad.

**A la Dra. Francisca Ramírez Godina.** Por su apoyo, colaboración comentarios y observaciones hechas durante el desarrollo de la presente investigación.

**Al Dr. Víctor Manuel Zamora Villa.** Por su apoyo y orientación en el análisis estadístico de los datos, su disponibilidad y valiosas opiniones en la interpretación de los resultados.

**A la Biol. Ana María Ochoa Rivera.** *Por brindarme su apoyo, dedicación, paciencia y tiempo y apoyarme en todo relacionado con materiales y equipo para la realización del trabajo experimental en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.*

## **DEDICATORIAS**

### ***A mi Madre***

#### ***Rosabel Magdalena Morales Morales***

*A ti madre por darme la vida todas tus atenciones y cuidados sabiendo que no existiría una forma de agradecer tu respeto, admiración, sacrificio y esfuerzo para darme lo mejor con todo tu corazón sin esperar nada a cambio, quiero que sientas que el objetivo logrado en esta investigación también es tuyo la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue tu apoyo y amor incondicional para mi formación profesional ¡GRACIAS MAMITA!*

### ***A mis Abuelos***

#### ***Martiniano Morales Chilel***

*A mi abuelo, por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por ser un padre el ejemplo para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Esta tesis es el resultado de lo que me has enseñado en la vida, ya que siempre has sido una persona honesta, entregada a tu trabajo, y un gran líder, una gran persona y por tu apoyo incondicional y es por ello que hoy te dedico este trabajo de tesis. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad en esta etapa de mi vida.*

#### ***Elvia Morales Vázquez***

*A ti abuela que con la sabiduría de Dios me has enseñado a ser quien soy. Gracias por tu cariño, esfuerzo para darme lo mejor y ser para mí como una segunda madre por enseñarme el camino de la vida, gracias por tus consejos, por el amor que me has dado y por tu apoyo incondicional. Gracias por todo tu amor y cariño.*

### **A mis Tíos**

**Heraldo Morales Morales y Ozebel Morales Morales**

*Porque día tras día mostraron ser excelentes seres humanos, porque a pesar de tener sus propios problemas cargaron con los míos, porque siempre estuvieron al tanto de todo, lo bueno y lo malo. Quiero que sepan que los quiero mucho y que son un ejemplo de humildad y de amor nunca olvidare lo que hicieron por mí y mi hijo no tengo con que pagarles lo que han hecho por mí y sobre todo el apoyo y cariño que me dieron los quiero mucho a los dos!*

### **A mi Hermano**

**Sarain Pérez Morales**

*A ti hermanito Gracias por estar conmigo en todos los momentos buenos y malos por tu comprensión, ayuda, cariño regaños, consejos y por tu gran apoyo desde del momento que crecimos juntos y sobre todo tu gran fortaleza para salir adelante y cumplir con todos tus objetivos, dios te bendiga hermano te quiero mucho Gracias por todo.*

### **A mi Hijo**

**Alexis Misael Montaña Pérez**

*Entre todos sus ángeles, Dios escogió el mejor, pedacito de vida, que a mi mundo ya venías, y al tenerte entre mis brazos, desbordante de alegría, fue el momento más hermoso, más eterno de mi vida y la fuerza para salir adelante y todo por ti para que el día de mañana no te falte nada, eres mi razón de vivir y darme la fortaleza día a día y eres un niño hermoso y cariñoso te quiero muchísimo Alexito gracias por darme la alegría y ser mi razón de existir.*

### **A Amado Montaña Gutiérrez**

*Gracias por estar en los momentos más difíciles de mí vida y sobretodo porque todavía puedo contar contigo, a pesar de que en ocasiones le diera prioridad a los asuntos académicos tú siempre fuiste paciente y supiste entender. Puede que las cosas entre nosotros hayan cambiado un poco pero siempre vas a poder contar conmigo, porque ese tipo de amor desinteresado que sólo tú has podido darme en esta época es escaso. Junto a ti no tengo que aparentar y tu familia me ha acogido como si fuera otra hija, nunca voy a olvidarte. Te quiero mucho.*

### **A la Sra. Alejandra Gutiérrez Gutiérrez y Sr. Misael Montaña Cruz**

*Por estar siempre a mi lado y por todo el apoyo que nos brindaron el tiempo que le dedicaron, apoyo que le brindaron a mi hijo, por todo lo que hicieron por mi día tras día y por ser las mejores personas, fueron unos padres durante todo este tiempo y sé que lo seguirán siendo. Ustedes han sido una muestra de fortaleza para mí y mi familia y nunca olvidare lo que hicieron por mí, por porque me recibieron como una hija y siempre viendo por mi y por cualquier cosa que yo necesitara, quiero que sepan que los quiero como a unos PADRES.*

### **A Tere Montaña Gutiérrez, Virgen Montaña Gutiérrez, Oscar Montaña Gutiérrez y Miguel García Jiménez**

*A todos ustedes muchas gracias por su gran apoyo a ti **Tere**, por ser la mayor te agradezco por tu confianza durante el tiempo que pase contigo y considerarme como hermana. A ti **Virgen** la más chica por tu gran amistad incondicional, confianza hacia mí, y échale ganas para cumplir tus objetivos y hacer lo que más te guste, por todos los momentos que pasamos juntas. A ti **Oscar** el único hombre por tu amistad y comprensión, confianza, consejos y que se cumpla todos tus propósitos. A ti **Miguel** por tu esfuerzo y ayuda en todo lo que necesite y respeto en todo momento.*

### **A Ashley y Betzi**

*A ustedes niñas hermosas por su gran cariño y quererme como una tía y gracias por permitirme quererlas y apoyarlas las quiero mucho como mis sobrinas y que sigan adelante para que el día de mañana sean mejores.*

### **A mis Padrinos**

#### **Inocencio y Dolores**

*Gracias por recibirme con los brazos abiertos y ser para mí como mis padres, por su gran cariño brindado y considerarme como una hija y velar por mí gracias padrinos por sus consejos, esfuerzos y sobre todo por sus grandes bondades los quiero mucho dios los bendiga.*

### **A mi madrina**

#### **María Lourdes López Gutiérrez**

*Mi mejor amiga te doy gracias por tu compañerismo, amistad, confianza y escucharme en los momentos más difíciles, por tu responsabilidad que pondrás sobre mi y aceptarme como una hija, mis mejores deseos para ti dios te bendiga madrina.*

### **A mis Amigos y Compañeros**

**Lourdes, Blanca, Rolendi, Nehemías, Roni, Magni, Luvín, Mirsain, Chael, Uriel y compañeros de la carrera de producción,** muchas gracias por su gran confianza, amistad y apoyo en lo que más necesite siempre contare con ustedes y mis mejores deseos a cada uno de ustedes donde quiera que se encuentren, gracias por estar conmigo en las buenas y malas por sus gran solidaridad.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	lii
ÍNDICE DE FIGURAS	lv
<b>RESUMEN</b>	v
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	1
Objetivo General	4
Hipótesis	4
<b>II.- REVISIÓN DE LITERATURA</b>	5
Importancia de la especie	5
Descripción de <i>Turbinicarpus valdezianus</i>	8
Cultivo de tejidos vegetales	10
Medios de cultivo	14
Reguladores del crecimiento vegetal	16
Auxinas	18
Efectos fisiológicos de las auxinas	20
Métodos de detección de reguladores de crecimiento vegetal	25
Detección Colorimétrica de Auxinas	27
<b>III.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
Ubicación del sitio experimental	32
Material genético	32
Metodología	32
Preparación del medio nutritivo Murashige y Skoog (1962)	33
Variable a evaluar	37
Tamaño de vitroplantas	37

Diámetro de las diferentes partes del brote (basal, media y superior)	37
Parámetro a evaluar	38
Cuantificación de auxinas	38
Diseño experimental y Análisis estadístico	41
<b>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	42
<b>V.- CONCLUSIONES</b>	49
<b>VI.- LITERATURA CITADA</b>	50

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
3.1	Composición del medio nutritivo de Murashige y Skoog, (1962).....	34
4.1	Análisis de varianza para la cuantificación de auxinas en diferentes tamaños y diferentes partes del brote de vitroplantas de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> .....	42
4.2	Prueba de medias LSD para la cuantificación de auxinas en tamaños de vitroplantas de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> .....	44
4.3	Prueba de medias LSD para la cuantificación de auxinas de las diferentes partes del brote de vitroplantas de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
2.1	Platas adultas de <i>Turbinicus valdezianus</i> .....	9
3.1	Campana de flujo laminar con instrumental a utilizar.....	35
3.2	Vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> completamente desarrolladas.....	35
3.3	Trasvase de brotes a un medio nutritivo Murashige y Skoog.....	36
3.4	Frascos de <i>Turbinicus valdezianus</i> en cuarto de incubación.....	36
3.5	Vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> clasificada en tamaños a) chico, b) mediano y c) grande.....	37
3.6	Diámetro de las diferentes partes del brote de vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> .....	38
3.7	Cortes de vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> para la cuantificación de auxinas.....	38
3.8	Pesado de muestras y macerado de las diferentes partes del brote en vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> .....	39
3.9	Filtrado de las diferentes partes del brote de vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> .....	40
3.10	Cuantificación de auxinas (AIA) de muestras de vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> .....	40
4.1	Cuantificación de auxinas (AIA) en tamaños y diámetro de diferentes partes del brote en vitroplantas de <i>Turbinicus valdezianus</i> .....	47

## RESUMEN

El género *Turbinicarpus* es uno de los de mayor interés desde el punto de vista fitoquímico, pues producen diversos alcaloides que podrían tener aplicaciones en farmacología, ya que no ha sido estudiado a fondo y por ende poco aprovechado, debido a la gran dificultad que representa el obtener tejidos de estas plantas en las cantidades requeridas para su extracción a causa de talla muy reducida, su baja tasa de crecimiento y su estatus de especies amenazadas. *Turbinicarpus valdezianus* es endémica de Coahuila y San Luis Potosí, es muy apreciada por los coleccionistas debido a su belleza, a la facilidad con la que produce flores y a su talla reducida. Lo anterior ha traído como resultado una intensa colecta ilegal que ha afectado a las poblaciones silvestres. La respuesta morfogénica del explante en cultivo de tejidos está en función de la adición de reguladores de crecimiento vegetal al medio nutritivo, que puede producir efectos notables sobre el metabolismo y el crecimiento celular, aún en cantidades muy reducidas. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la concentración de auxinas en diferentes tamaños y diámetros del brote de *Turbinicarpus valdezianus*. Se tomaron brotes de vitroplantas obtenidas de la micropropagación en medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con  $3 \text{ mgL}^{-1}$  Bencilaminopurina (BAP),  $1 \text{ mgL}^{-1}$  paclobutrazol (PBZ),  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de kinetina, 9 g de agar y 30 g de sacarosa ajustando a un pH de 5.7. Se seleccionaron vitroplantas considerando tres tamaños, chico (1.1 a 2 cm); mediano (2.1 a 2.7 cm) y grande (2.8 a 4.3 cm) y de cada tamaño se evaluaron diferentes partes del brote: parte basal, parte media y parte superior determinando el diámetro en centímetros.

El contenido de auxinas (AIA) se determinó por espectrofotometría, en partes por millón (ppm). Con respecto a tamaño de vitroplantas evaluadas: chico, mediano y grande no presentó diferencias estadísticas, sin embargo numéricamente, se encontró que el contenido de auxinas en mayor cantidad se encontro en el tamaño grande; en cuanto al diámetro de diferentes partes del brote evaluadas no presentaron diferencias estadísticas, pero numéricamente la parte basal del brote fue quien presentó mayor diámetro. El contenido de auxinas de los brotes de las vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* a los 30 días de desarrollo fluctuó entre 0.28 a 0.34 ppm.

**Palabras clave:** *Turbinicarpus valdezianus*, hormonas, cuantificación de auxinas, Acido indolacetico (AIA).

## I.-INTRODUCCIÓN

México es el país que presenta la mayor riqueza en especies de cactáceas, y en la región noreste caracterizada por una escasa precipitación se encuentra una amplia variedad de estas especies. En el área conurbana de Saltillo, Ramos Arizpe y Arteaga Coahuila se localizan alrededor de 13 especies de cactáceas vulnerables y en peligro de extinción por el crecimiento de la zona, dentro de las cuales se encuentra *Turbinicarpus valdezianus*, y teniendo como principio que la tecnología del cultivo de tejidos puede ser de gran valor en preservación y utilización de especies de cactáceas en vías de exterminio , el presente trabajo pretende proporcionar información que permita a los especialistas en el cultivo de tejidos poder controlar con certeza las condiciones de desarrollo *in vitro* en esta cactácea. Normalmente para la inducción de una respuesta morfogénica del explante en cultivo de tejidos es necesaria la adición de reguladores de crecimiento vegetal al medio de cultivo (Cote, 1981).

Los reguladores de crecimiento vegetal o fitorreguladores son compuestos orgánicos que pueden producir efectos notables sobre el metabolismo y el crecimiento celular aún en cantidades muy reducidas; se producen sobre todo en tejidos de crecimiento (meristemos de los ápices en desarrollo en el extremo de tallos y raíces) y suelen ejercer sus efectos en lugares alejados del lugar de

producción, la síntesis biológica de estas sustancias resulta de gran importancia ya que su aplicación permite el aumento de los rendimientos y la calidad de las cosechas en la agricultura. Los reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo *in vitro* de las plantas, son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y citocininas, ya que son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en cultivo de tejidos vegetales (Pérez *et al.*, 1999).

Esta característica está relacionada con la acumulación de metabolitos secundarios tales como ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB), siendo los miembros más conocidos de este grupo en la formación de raíces adventicias. Algunos factores que controlan los niveles de auxina libre pueden ser las peroxidasas con actividad de AIA-oxidasa (AIA-ox; la formación de ésteres o amidas entre auxinas y azúcares o aminoácidos presentes mediante transporte polar y/o su conjugación (Franhenberger y Arshad, 1995).

Tanimoto (2005) menciona que algunas auxinas de forma natural, otras son sintetizadas artificialmente, las primeras son generadas por microorganismos tales como: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc., como es el caso del ácido indolacético.

En cultivo de tejidos, el tener un conocimiento o descripción de la cantidad de hormona presente o generada por la vitroplanta nos ayudaría en la etapa de la elaboración efectiva del medio nutritivo para la propagación de los tejidos vegetales de determinadas especies; o para mantener en concentraciones óptimas la vitroplanta para su crecimiento y desarrollo. Para el estudio y



separación de las fitohormonas, se tienen diferentes metodologías entre ellas la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la espectrofotometría, donde la primera se obtiene en la fase reversa C18 siendo la más usada y reportada para este tipo de separación Sin embargo, el equipo es costoso, especializado y requiere mayor número de materiales y reactivos, mientras que la espectrofotometría es más convencional y fácil de interpretar (Birkemeyer *et al.*, 2003).

### **Objetivo general**

Evaluar la concentración de auxinas de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* de diferentes tamaños y partes del brote.

### **Hipótesis**

Se plantea la hipótesis de que en al menos en uno de los diferentes tamaños en alguna parte del brote de las vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* varía el contenido de auxinas (AIA).

## II.-REVISIÓN DE LITERATURA

### Importancia de la especie

Entre las muchas cactáceas mexicanas amenazadas, resultan de especial interés las del género *Turbinicarpus*, el cual es endémico de las partes centro y sur del Desierto Chihuahuense, el que se extiende desde la Meseta Central de México hasta los EU. Este género incluye varias especies y subespecies de cactus pequeños que son muy apreciadas por los coleccionistas debido a su belleza, a la facilidad con la que producen flores y a su talla reducida, que permite el mantenimiento de grandes colecciones en espacios mínimos. Lo anterior ha traído como resultado una intensa colecta ilegal que ha afectado a las poblaciones silvestres. Este fenómeno se agrava debido a que muchas de las especies de este género tienen áreas de distribución muy restringidas y su hábitat está siendo constantemente degradado. Algunas actividades humanas que se desarrollan en estas áreas de distribución, tal como la extracción de materiales pétreos, han afectado de manera importante a algunas especies del género (Anderson, 2001).

Hernández *et al.* (2007) mencionan que el género *Turbinicarpus* es uno de los de mayor interés desde el punto de vista fitoquímico, pues producen diversos alcaloides que podrían tener aplicaciones en farmacología.

Estos compuestos no han sido estudiados a fondo, y mucho menos aprovechados, debido a la gran dificultad que representa el obtener tejido de estas plantas en las cantidades requeridas para su extracción a causa de su talla muy reducida, su baja tasa de crecimiento, y su estatus de especies amenazadas ( Štarha et al.,1999).

### **Clasificación taxonómica de *Turbinicarpus valdezianus***

Según, Glass y Moller (1977) *Turbinicarpus valdezianus* se clasifica en:

<u>Reino:</u>	<u>Plantae</u>
<u>Subreino:</u>	<u>Tracheobionta</u>
<u>División:</u>	<u>Magnoliophyta</u>
<u>Clase:</u>	<u>Magnoliopsida</u>
<u>Subclase:</u>	<u>Caryophyllidae</u>
<u>Orden:</u>	<u>Caryophyllales</u>
<u>Familia:</u>	<u>Cactaceae</u>
<u>Subfamilia:</u>	<u>Cactoideae</u>
<u>Tribu:</u>	<u>Cacteae</u>
<u>Género:</u>	<i>Turbinicarpus</i>
<u>Especie:</u>	<i>Valdezianus</i>

### **Descripción del género *Turbinicarpus***

El género *Turbinicarpus* incluye 34 especies, con cerca de 16 variedades o formas (Guzmán *et al.*, 2003) *T. valdezianus* es una especie en protección especial, conforme a la norma vigente NOM-059-ECOL-2001, que debe propagarse preferentemente a través de la proliferación de brotes *in vitro*. Son Plantas pequeñas, más o menos globosas, generalmente simples; provistas de

tubérculos o rara vez con costillas divididas en tubérculos, aréolas monomorfas. Espinas escasas, suaves, no pungentes. Flores en las aréolas del ápice del tallo, blancas o de color rosa; pericarpelo desnudo, a veces con una escama diminuta hacia su porción superior; estambres numerosos. Fruto con una baya irregularmente dehiscente. Semillas de 1 a 1.5 mm de longitud; testa negra y verrugosa, sin arillo (Bravo y Sánchez, 1991).

*Turbinicarpus* fue descrito por Buxbaum (1952) y Curt (1958) el nombre se origina del latín *turbinatus*, trompo y del griego *carpos*, fruto, haciendo referencia a la forma general de las plantas. Se ha relacionado estrechamente con los géneros *Neolloydia* y *Thelocactus*, e incluso se ha llegado a proponer que estas especies no son más que formas juveniles de *Neolloydia* con la capacidad de florece y fructificar a una edad temprana, esta idea no ha sido aceptada del todo por los estudiosos de las cactáceas y se decidió mantener este género independiente con 24 especies y un híbrido natural. La conservación de las cactáceas del género *Turbinicarpus* se ve también obstaculizada por su lento crecimiento y la pobre capacidad de recuperación de las poblaciones naturales. Esta situación se debe en gran medida a una muy baja producción de semillas aunada a su baja tasa de germinación, que sólo alcanza el 8% en algunas de las especies del género. Esto último se debe tanto a la pérdida de viabilidad como a la existencia de diversos mecanismos de latencia (Flores *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2008).

### **Descripción de *Turbinicarpus valdezianus***

*Turbinicarpus valdezianus* es de origen mexicano (Coahuila, San Luís Potosí), generalmente es una cactácea de crecimiento reducido y lento, de vida solitaria, ya que rara vez se le encuentra agrupado, son plantas simples. Tallo tuberculado, globoso de alrededor de 5 cm de altura y 3 mm de diámetro. Espinas radiales y centrales bien definidas. Espinas radiales de 15 a 17, de alrededor de 5 mm de longitud, aciculares blancas, vítreas, algo plumosas, radiadas horizontalmente en torno de la areola, entrelazadas con las areolas vecinas, ocultando en parte el tallo, espina central 1 cm, de cerca de 1.5 cm de longitud, gruesa, de 1mm de diámetro, con la superficie escabrosa provista de diminutos tricomas, blanquecina, erecta, pero torcida y curva, cubriendo el ápice, flores y frutos no vistos (Bravo y Sánchez, 1991).

*Turbinicarpus valdezianus* habita en pequeñas colinas de piedra caliza cubiertos de vegetación desértica, a alturas de alrededor de 1.1 a 2.0 metros. A pesar de que estas cactáceas no crecen demasiado producen flores grandes, bonitas y muy vistosas de diferentes colores dependiendo de la variedad (Figura 2.1). *Turbinicarpus valdezianus* es una especie de la familia de las cactáceas, cuya localidad tipo es Saltillo, Coahuila y se clasifica como amenazada.



**Figura 2. 1. Plantas adultas de *Turbinicarpus valdezianus*.**

El crecimiento urbano y la posible colecta indiscriminada han disminuido drásticamente el tamaño poblacional de dicha especie en los lugares donde se reportó originalmente. En exploraciones preliminares, hemos localizado a *Turbinicarpus valdezianus* en el Cañón de las Bayas, Municipio de Arteaga, Coah. Y, por su inaccesibilidad, parece ser un lugar que puede funcionar como reservorio de variabilidad para dicha especie, y posiblemente como lugar para reubicación de poblaciones amenazadas localizadas cerca de la mancha urbana. Esta estructura proporciona micro-ambientes de sombra y humedad al tallo, sus tejidos internos sirven de almacenaje de agua, éstos se contraen y expanden en función de la disponibilidad de agua (Mauseth, 2000).

Cabe mencionar que algunas especies de este género presentan una distribución muy restringida, ocupando en algunas ocasiones solamente unas cuantas lomas o laderas, y debido a que son plantas muy pequeñas con formas caprichosas, fáciles de cultivar y florecen con facilidad son muy buscadas por los coleccionistas, quienes no vacilan en coleccionar ejemplares de formas ilegal en campo, eso ha llevado a algunas especies al borde de la extinción en su hábitat natural (Elizondo *et al.*, 1990).

Sin embargo como una noticia alentadora, se tienen registros de poblaciones que han sido colectadas hasta desaparecer y se han recuperado gracias a la reserva de semillas que existe en el suelo de estas localidades. Este género se distribuye solo en México desde Coahuila hasta Guanajuato. En Nuevo León ocurren cerca de 10 especies. Existen unas 24 especies de este género que se distribuyen desde el suroeste de Estados Unidos hasta el noroeste de México. Para este diagnóstico se consideraron siete especies que se encuentran distribuidas en el desierto Chihuahuense (Neutelings, 1982).

### **Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos es una herramienta de gran valor para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y por otro lado tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material (George, 2008).

Hurtado y Merino (1994) citan que el cultivo de tejidos se refiere al cultivo de células, tejidos u órganos de plantas en un medio que le aporte los nutrientes necesarios para su desarrollo. Esta técnica se basa en la “totipotencialidad celular” que parte de la premisa: “toda célula viviente de un organismo multicelular es capaz de desarrollarse si le dan las condiciones externas apropiadas.



La célula tiene la habilidad de desarrollarse, regenerando un organismo entero”. La nueva planta será genéticamente idéntica a la planta madre, el desarrollo de esta se da en un periodo corto (Rodríguez, 2005).

### **Micropropagación**

La micropropagación es parte de la biotecnología que a nivel mundial se ha utilizado ampliamente en especies de interés económico. Es una técnica que utiliza el cultivo de tejidos vegetales para multiplicar rápida y masivamente una especie de interés basándose en el concepto de totipotencia, en el que se promueve el desarrollo de un organismo completo, considerando la diferenciación celular y potencial genético del genotipo. Mediante esta técnica se puede obtener plantas con diferentes propósitos en cantidades suficientes, siendo una nueva opción para multiplicar genotipos que cuentan o tienen dificultad para propagarse con métodos convencionales (Sánchez *et al.*, 2004).

Pierik *et al.* (1990) mencionan que con la micropropagación se pueden producir y transportar plantas libres de enfermedades, tiende a ser mucho más rápida en comparación con otros métodos de multiplicación vegetativa y permite la propagación vegetativa donde es difícil o imposible por técnicas convencionales. Actualmente existen muchas técnicas para la modificación genética de plantas *in vitro*. Estas técnicas también dependen de la micropropagación tanto para la regeneración como para la multiplicación de nuevas características.

Torres (1996) menciona que el proceso de la micropropagación está constituido por 5 etapas.

Fase 0: Preparación de la planta madre.

Fase I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia.

Fase II: Multiplicación de brotes

Fase III: Enraizamiento

Fase IV: Aclimatización

### **Fase 0: Preparación de la planta madre**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

### **Fase I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia**

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación.

## **Fase II: Multiplicación de los brotes**

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados, de esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

## **Fase III: Enraizamiento *in vitro***

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. El enraizamiento *in vitro* aprovecha los brotes diferenciados de la etapa anterior, colocándose en un medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas, vitaminas y reguladores de crecimiento de modo que dichos brotes emitan raíces (Hudson, 1992).

## **Fase IV: Aclimatización**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatización. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales (Preece y Sutter, 1991).

## Medios de cultivo

Fuentevilla (2004) indica que la composición química del medio de cultivo es un factor importante en la morfogénesis. Éste se compone de macro y microelementos, aminoácidos, vitaminas, fitohormonas, carbohidratos y un gelificante, la constitución del medio de cultivo depende de la planta (genotipo), de las interacciones de éste con el ambiente (factores físicos), del tamaño del explante y del objetivo o etapa de la micropropagación”. No existe un medio de cultivo universal a ser utilizado en la propagación de plantas *in vitro*, sin embargo, el medio basal MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) con alguna variación de sus ingredientes ha sido el más utilizado para esta técnica.

Mroginski (2008) menciona una parte importante del cultivo *in vitro* son los Medios de Cultivo ya que en ellos se encuentran las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Un medio de cultivo es una solución acuosa en donde se encuentran disueltas sales minerales que aportan los elementos esenciales Macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y Micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co). Normalmente es imprescindible una fuente de carbono, generalmente la sacarosa, debido a la escasa actividad fotosintética de los tejidos *in vitro*. Además, el medio puede ser enriquecido con Aminoácidos, Vitaminas y Reguladores del Crecimiento. Los medios de cultivo se preparan a partir de soluciones concentradas 10 o 100 veces (Soluciones Madre o Stock). En la solución madre se pueden mezclar varias sales minerales siempre que no se produzcan problemas de precipitación. Algunos elementos, como el Fe, se utilizan en forma de quelatos para mantener su disponibilidad

durante el cultivo. Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción. Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro*. Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento (Krikorian, 1991).

#### **Adición de hormonas en el medio de cultivo y el metabolismo de la planta.**

Aunque la composición del medio de Murashige y Skoog da buenos resultados en el cultivo *in vitro* de la mayoría de las especies, se debe seleccionar una combinación de nutrientes en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemos, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos (Jenik y Barton, 2005).

## **Reguladores del crecimiento vegetal**

Los reguladores de crecimiento o fitohormonas, son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan en muy bajas concentraciones en sitios distantes de donde son producidos, interviniendo en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo y la caída de hojas, entre otros (Purves *et al.*, 2002).

Estos reguladores están directamente involucrados en procesos metabólicos o en el proceso de desarrollo tal es el caso de la producción de amilasa y la inducción de la floración entre otros, pero al actuar en bajas concentraciones modifican dichos procesos, donde sus efectos varían según su interacción con otros reguladores de crecimiento vegetal, de esta forma regulan o influyen en un rango de procesos celulares y fisiológicos entre los que se cuentan la división celular, diferenciación celular, desarrollo de frutos, tropismos, dormancia de semillas, germinación de semillas, senescencia abscisión de las hojas entre otras (Salisbury y Roos, 2000).

A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales.

Por lo tanto es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal (Woodward y Bartel, 2005).

Weaver (1996) menciona que los fitorreguladores son todos los compuestos orgánicos (no considerados nutrientes) que en pequeñas cantidades son capaces de fomentar, inhibir o modificar cualquier proceso fisiológico de la planta. El término fitorregulador puede incluir un rango amplio de compuestos, puede aplicarse en los dos casos tanto para los compuestos naturales producidos dentro de la planta, como para los compuestos sintetizados artificialmente, el término hormona vegetal o fitohormona únicamente se limita al primer caso.

Los efectos de los fitorreguladores no son absolutamente específicos, su respuesta hacia los cultivos *in vitro* depende del tipo de explante y del genotipo de la planta. El desarrollo y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción entre el balance de fitorreguladores adicionados al medio y las fitohormonas producidas internamente. Existen siete clases de reguladores de crecimiento vegetal entre los cuales se encuentran auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinosteroides, ácido abscísico, etileno y ácido jasmonico. Las cuales participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Tanimoto, 2005).

## Auxinas

Estas hormonas son un grupo de compuestos que estimulan la elongación de la planta. El ácido indolacético (AIA) es una auxina que realiza una acción directa sobre la elongación y es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. Su acción principal radica en determinar el crecimiento de la planta y favorecer la maduración del fruto (en el caso del AIA) y el proceso del enraizamiento (ácido indol butírico – AIB). Las auxinas se sintetizan principalmente en el ápice del tallo, en las yemas, ramas jóvenes y en general en los meristemas a partir del aminoácido triptófano. Ayudan a que los tallos débiles se desarrollen y que se formen raíces adicionales de soporte para complementar el sistema radicular, el ácido indolil-3-acético (AIA) es sintetizado en la planta L-triptófano, el cual puede estar libre o formado parte de proteínas (Teale y Palme, 2006).

Las auxinas constituyen un grupo pequeño de hormonas vegetales, originalmente identificada por su rol en respuestas trópicas. Actualmente se sugiere que posee propiedades morfogenéticas análogas a hormonas presentes en el reino animal, participando en procesos que incluyen desarrollo de embrión, raíz y fruto, diferenciación de sistema vascular, crecimiento trópico y dominancia apical este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del peciolo parece también prevenir la abscisión (Dharmasiri *et al.*, 2005).



La auxina ha sido implicada en la regulación de diferentes procesos fisiológicos, entre los que se incluye promoción del crecimiento y diferenciación celular, longitud de la planta; estimulación y maduración de frutas, floración, senectud, geotropismo; la auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta (Friml, 2003). Las auxinas sintéticas más usadas son: el ácido naftalenacético (NAA) utilizadas en concentraciones de 0.1 a 5 mgL<sup>-1</sup>, el ácido indolbutírico (IBA) de 0.1 a 5 mgL<sup>-1</sup>, los ácidos 4-clorofenoxiacético (CPA) y 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) de 0.05 a 0.5 mgL<sup>-1</sup>, y el ácido indolacético (AIA) de 1 a 50 mgL<sup>-1</sup>, participan ampliamente en un sin número de procesos, sin embargo los principales son el alargamiento y la división de las células, la formación de brotes, raíces y tejidos callosos (Hurtado y Merino, 2000).

En forma natural, las concentraciones más altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento, sin embargo también se encuentran auxinas ampliamente distribuidas por la planta, sin duda provenientes de las regiones meristemáticas. La auxina natural más común es el ácido indolacético (AIA) pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas naturales en los tejidos como son el ácido 4-cloroindol-3-acético y el ácido indol-3-acrílico (Dobrev *et al.*, 2005).

## **Metabolismo de las auxinas**

Son conjugadas con azúcares, aminoácidos y péptidos. Los conjugados de Auxinas actúan como formas de almacenamiento inactivas de Auxinas: dicotiledóneas: Auxina-Acido Aspártico, Auxina-Glucosa: Monocotiledóneas: Auxina-Glicósidos, no conjuga con aminoácidos (Gray, 2004).

## **Biosíntesis de auxinas en las plantas**

Las auxinas son producidas en las plantas a partir del catabolismo del triptófano lo cual se observó ensayos en donde al colocar triptófano este era catabolizado por el tejido en AIA, aumentando su concentración en el mismo Son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo (Taiz, 2006). Las más utilizadas son:

AIB: (ácido indol-3-butírico) = diferenciación de raíces

ANA: (ácido naftalenacético) = diferenciación de raíces

AIA: (ácido indolacético) = Prolongación de explantes

2,4-D: (ácido diclorofenoxiacético) = inducción de callos.

## **Efectos fisiológicos de las auxinas**

### **Crecimiento y formación de raíces.**

Debido a que las auxinas influyen tanto la división, crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, en algunos de ellos interactuando con otras fitohormonas. Diversos bioensayos han sido descritos para analizar respuestas a auxinas, los cuales han sido útiles

en la identificación de compuestos con actividad típica de auxinas y de plantas mutantes con defectos en la síntesis, metabolismo o respuestas a auxinas. Uno de los ensayos que caracterizan el efecto de auxinas en el desarrollo es la regulación del crecimiento radicular el cual es definido desde el desarrollo embrionario. Mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleoptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias. La concentración óptima para el promover elongación de tallos es entre  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, sin embargo, en raíces esta concentración es muy alta y retarda su crecimiento (Jenik y Barton, 2005).

Las auxinas además promueven la biosíntesis de la hormona etileno que inhibe el crecimiento radicular. Niveles menores a  $10^{-9}$  M de IAA serían capaces de inducir crecimiento de raíz, pero no ocurriría a niveles normales endógeno más altos. El proceso de rizogénesis está íntimamente asociado a la división celular. Una práctica común en horticultura es aplicar auxinas para favorecer el enraizamiento de esquejes. En técnicas de cultivo de tejidos se utilizan auxinas y citocininas para promover la división celular y la diferenciación de raíces y tallos, respectivamente. Las auxinas estimulan a la división de células localizadas en el periciclo en la zona justo arriba de la zona de elongación para provocar la formación de raíces laterales. Este fenómeno también se aplica en la formación de raíces adventicias la cual puede ocurrir en varios tejidos donde existan un grupo de células en activa división (Barcello, 1995).

## **Regulación de tropismos**

Mientras el crecimiento puede ser definido como un proceso irreversible derivado de la elongación celular, los tropismos son movimientos de crecimiento direccionales en respuesta a un estímulo también direccional. El efecto que tienen las auxinas sobre el crecimiento de tallos y raíces es importante para controlar los tropismos. Estas respuestas se concretan con curvaturas, giros o inclinaciones que realizan los tallos y raíces hacia un estímulo de luz (fototropismo), de gravedad (geotropismo o gravitropismo), o de contacto (tigmotropismo). En el caso del fototropismo, la auxina que se produce en el ápice, en vez de ser transportada hacia la base, es transportada lateralmente hacia el lado sombreado. Asimismo, se han encontrado varias proteínas que actuarían como receptoras para el fototropismo (fototropinas). Una de ellas, NPH1, es fosforilada en un gradiente lateral durante la exposición a luz azul lateral. De acuerdo con el modelo clásico, la fosforilación en gradiente de NPH1 induciría de alguna manera el movimiento de auxina hacia el lado no iluminado del tallo o coleoptilo. Sin embargo, la regulación de la respuesta fototrópica es más compleja, pues la actividad de ésta y otras fototropinas varía dependiendo la calidad de luz y la acción de fitocromos (Esmon *et al.*, 2005).

Una vez en el lado opuesto de la luz, la auxina es transportada en forma basipétala a la zona de elongación, donde aceleraría el crecimiento de esa zona con respecto a la zona iluminada, provocando la curvatura hacia la luz. De forma similar, el mismo modelo se puede aplicar para explicar las respuestas de tallos y raíces a la gravedad.

Durante la respuesta geotrópica, si una planta en crecimiento se coloca de lado, el tallo tiende a curvarse hacia arriba y las raíces hacia el suelo. Cuando la planta está en posición horizontal, la fuerza de la gravedad hace que la auxina se distribuya mayormente en la parte inferior del tallo o raíz. Mientras en el tallo las auxinas estimulan el crecimiento de la parte inferior (ocasionando una curvatura hacia arriba), en raíces un mayor nivel de la hormona inhibe el alargamiento de las células, por lo tanto, las de la cara superior se alargan más y la raíz se curva hacia abajo. Esta re-distribución de auxina en la raíz podría deberse a la percepción de la gravedad por algunas células que se localizan en el casquete, caliptra o cofia. Estas células (estatocitos) contienen los llamados estatolitos correspondientes a amiloplastos que sedimentan en respuesta al vector gravitacional. Una ubicación basal de los estatolitos ocasionaría un transporte polar de auxina a lo largo del lado inferior desde la cofia hacia la zona de elongación de la raíz, donde retardaría el crecimiento (Hou *et al.*, 2004).

### **Dominancia apical.**

La distribución en gradiente de auxina desde el ápice primario hacia la base de la planta reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo así lo que se denomina como dominancia apical (Thimann, 1977).

### **Abscisión de órganos.**

Las auxinas tienen un efecto general negativo sobre la abscisión de los órganos, retardando especialmente la caída de hojas, flores y frutos jóvenes.

El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece prevenir la abscisión inhibiendo la acción de la hormona etileno, principal efector de la formación de la zona de abscisión. Cuando los tejidos foliares envejecen, la producción de auxinas decrece, dando paso así a la acción del etileno y progresión de la abscisión. Sin embargo, también se han descrito casos en que aplicaciones de auxina exógena en el lado opuesto de la zona de abscisión (cerca al tallo) acelerarían el efecto del etileno sobre la abscisión (Van y Otead, 1997).

### **Desarrollo de flores y frutos.**

Plantas que son tratadas con inhibidores de transporte de auxinas o plantas mutantes defectuosas en transportar auxina muestran deformidades en las inflorescencias y en la arquitectura floral, lo que sugiere que esta hormona es necesaria para un adecuado desarrollo de flores. De igual manera la aplicación de auxina en forma exógena induce el desarrollo floral en varias especies. Asimismo, auxina contribuye con el crecimiento normal de frutos. Un ejemplo clásico lo constituyen aquenios de frutilla que fallan en completar su crecimiento (cuaje) cuando se les ha retirado las semillas, fuentes de auxina endógena. Sin embargo, la aplicación de auxina a estos frutos sin semillas es capaz de restaurar el desarrollo de frutos normales. Además auxina tendría un efecto positivo sobre la maduración de algunos frutos al promover de alguna manera la síntesis de etileno (Pfluger y Zambryski, 2004).

### **Diferenciación vascular.**

Las auxinas controlan la división celular en el cambium donde ocurre la diferenciación de las células que darán origen a los elementos de floema y xilema. Su mayor efecto se advierte en la diferenciación del xilema. El número de elementos de xilema que se forman en tallos decapitados tratados con AIA es proporcional a la cantidad de hormona aplicada (Bhalerao *et al.*, 2002).

### **Métodos de detección de reguladores de crecimiento vegetal**

Las hormonas vegetales se encuentran en las plantas en bajas concentraciones si se comparan con otros metabolitos secundarios como alcaloides terpenos, entre otros. Por lo que la identificación química de las mismas puede verse limitada por las técnicas usadas para su extracción y purificación. Ya sea por la baja concentración en que se presentan o por la sensibilidad de las técnicas espectroscópicas requeridas para su identificación química. Los métodos más usados para la detección de reguladores de crecimiento vegetal, especialmente giberelinas incluye el uso de costosos equipos, lo que genera un sesgo en la investigación al estar ligada a altos costos. Es por esto que se buscan técnicas que involucren procedimientos más sencillos y al alcance de cualquier laboratorio, como es el caso de la detección colorimétrica que involucra un reactivo específico y un espectroscopio (Birkemeyer *et al.*, 2003).

## **Espectrometría de Masas**

Jork (1991) indica que la Espectrometría de Masas es una potente técnica analítica instrumental basada en el diferente comportamiento que presentan los iones que se forman por diferentes técnicas de ionización, al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Así dichos iones son separados en función de su relación masa/carga y detectados. Las técnicas de ionización empleadas pasan por el bombardeo de electrones (Impacto Electrónico), bombardeo de átomos de Cs (FAB), transferencia de protones a través de choques con moléculas previamente ionizadas tales como metano, amoníaco, isobutano y metanol (Ionización Química) y aplicación de campos eléctricos intensos a una fase móvil líquida previamente nebulizada a presión atmosférica (Electrospray, APcl). En cuanto a la separación de iones (analizador de masa), este proceso se realiza mediante campos magnéticos (sector magnético) permitiendo en este caso trabajar en alta resolución, esto es, llegar a determinar masas iónicas con hasta cuatro decimales, cuadrupolos, triples cuadrupolos (con posibilidad de realizar experimentos de masas/masas tales como determinar iones padre, iones hijo, pérdida de neutros y MRM) y trampa de iones. Los equipos permiten la introducción directa de muestras mediante sonda de sólidos calefactadas e introducción a través de técnicas de Cromatografía de Gases (GC-MS) y Cromatografía Líquida (HPLC-MS).



## **Detección colorimétrica de auxinas**

### **Reactivo de salkowsky**

El reactivo de salkowsky, ha sido ampliamente utilizado para establecer la presencia de grupos indol, en solución a partir de tejidos vegetales y extractos de cultivos microbianos, entre otros. Es un método netamente colorimétrico basado en la oxidación que produce el ácido perclórico a las moléculas de indol, generando una coloración que va de la gama de los rosados a fucsia, evidenciando la presencia de moléculas con grupo indol presumibles como compuestos auxinicos (Glickmann y Dessauxy, 1995).

La detección y cuantificación de compuestos indólicos, en particular el caso del AIA, se ha estudiado mediante técnicas muy disímiles, entre las que se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía en capa delgada (y algunos métodos colorimétricos como el derivado de Salkowsky (Thakuria *et al.*, 2004).

Bric *et al.* (1991) desarrollaron una metodología para detectar colonias productoras de AIA basada también en el reactivo de Salkowsky. Se ha informado acerca de la producción de antisueros policlonales contra un conjugado AIA-BSA (seroalbúmina bovina) muy poco utilizado en la detección de esta hormona (Sandberg *et al.*, 1987).

El reactivo de Salkowsky, ha sido ampliamente utilizado para establecer la presencia de grupos indol, en solución de tejidos vegetales y extractos de cultivos microbianos, entre otros. Es un método netamente colorimétrico basado

en la oxidación que produce el ácido perclórico a las moléculas de indol presumibles como compuestos auxínicos (Mantilla, 2007).

Rojas y Ramírez (2000) mencionan generalmente un medio que contenga altos niveles de auxinas inducirá la formación de callos. También la combinación de auxinas y citocininas puede promover la formación de callos, pero si se reduce la concentración de auxinas y se incrementa la concentración de citocininas se induce la formación de brotes. La eficacia de estas fitohormonas de origen biológico se ha comprobado en diversos estudios en los que se ha demostrado que su aplicación produce un aumento en los rendimientos y la calidad de las cosechas (Frankenberger y Arshad, 1995).

Salisbury y Ross (2000) mencionan que la relación auxina– citocinina es importante para controlar la dominancia apical, debido a que concentraciones altas favorecen el desarrollo de yemas y las concentraciones bajas favorecen la dominancia apical. Las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución.

una inducción de formación de callos basal conforme las concentraciones de auxinas aumentaban. Se sabe que las auxinas son un factor esencial en la proporción del crecimiento de las raíces, debido a que, en general, el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que incrementa su crecimiento ( Moebuis *et al.*, 2003)

También es conocido que las raíces a las que se les ha inhibido el crecimiento por medio de la aplicación de inhibidores sintéticos o naturales pueden reanudarlos si se les aplica auxinas. Entre los efectos auxínicos en las plantas, se encuentra la formación de raíces. Numerosos estudios han demostrado que los contenidos de auxinas en el medio de cultivo inducen el crecimiento de este órgano (Mantell *et al.*, 1993).

La intervención de las auxinas en el enraizamiento de plantas en el estado inicial de crecimiento de las raíces se divide en dos estados: cuando la auxina se encuentra activa, se encuentra presente continuamente, y proviene de brotes terminales o laterales o de una aplicación externa. La segunda etapa o etapa inactiva es cuando la auxina se encuentra en la raíz alrededor de cuatro días más, pero no tiene ningún efecto adverso en su formación. Ocurrido todo esto, comienza la etapa de elongación de los primordios radiculares, donde la nueva raíz atraviesa la corteza hasta emerger de la epidermis del tallo, para lo cual, la nueva raíz ya ha formado su sistema vascular que se encuentra fusionado a los tejidos vasculares del tallo; una vez que se ha llegado a esta etapa, no hay mayor respuesta a las auxinas (García *et al.*, 2007).

Las hormonas de las plantas son reguladores producidos por las mismas plantas que, en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos (Weaver, 1996). Las hormonas vegetales son producidas sobre todo en los tejidos en crecimiento, especialmente el meristema en el extremo de tallos y raíces además que las hormonas estimuladoras de crecimiento son las auxinas, giberelinas y citoquininas (Villego, 1992).

El ácido indolacético (AIA) es una sustancia de crecimiento sintetizada por la propia planta pero hay otras, de composición y efectos muy similares y que probablemente se transforman en AIA en el interior de la planta estos compuestos estimulan la división celular y por tanto, el crecimiento de los tejidos. Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas, las cuales están en crecimiento activo, siendo éste el sitio de síntesis (Huitrón, 2005).

Liscum y Reed (2002) mencionan que la concentración de las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células, tanto en la raíz hasta el tallo, una vez llegado a éste punto ya no hay mayor respuesta a las auxinas. Los cultivos de tejidos adaptados; tras varias transferencias en un medio con auxinas, se hacen frágiles y semitransparentes a la vez que son capaces de sintetizar su propia auxina, pero que puede variar con la edad y las condiciones ambientales Guerrero *et al.* (2001)

En la mayoría de los casos causa una respuesta de tipo general, lo cual puede conducir a un mayor tamaño de la planta por su capacidad de inducir la extensión de las células de los brotes. Sin embargo, la respuesta puede ser variable, dado que el desarrollo de la planta involucra varios procesos simultáneos que están influenciados por la constitución genética, el medio ambiente y el manejo del cultivo (Hernández, 2007).

Las células que están en contacto una con otra (contacto intracelular) en cierto tejido, pueden cada una de ellas en cierto momento, producir hormonas

(auxina), la cual es transportada a la célula cercana del siguiente tejido, que al recibir la señal de la hormona empieza a producir por sí misma estas y a su vez transporta hormonas a la célula vecina situada más abajo, dando lugar al desarrollo del cambium y el crecimiento en grosor de la planta, se incrementa la extensibilidad de la pared celular por el aumento y ensanchamiento de la célula en respuesta a la turgencia que provoca la entrada de agua en la vacuola y por el depósito de nuevos materiales, cuya síntesis y transporte también parecen ser regulados por hormonas (Hager, 2003).

### **III.-MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Ubicación del sitio experimental**

El presente trabajo se llevó a cabo en dos etapas, la primera, obtención de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales y la segunda, selección del material vegetal y cuantificación de auxinas de las vitroplantas en el Laboratorio de producción y bioquímica de semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, ambos pertenecientes al Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicado en Buenavista, Saltillo, Coahuila México, con una latitud de 25° 00 y 101' longitud oeste, a una latitud 1742 msnm.

#### **Material genético**

En esta investigación se utilizaron 18 Vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* desarrolladas en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la UAAAN.

#### **Metodología**

##### **Limpieza general del laboratorio de cultivo de tejidos**

Antes de establecer el experimento, fue necesario realizar una limpieza profunda del Laboratorio, en especial del área de siembra para lograr

condiciones de asepsia total, y de esta manera evitar la contaminación del material vegetal.

### **Esterilización de la cristalería e instrumental a utilizar**

Se esterilizó toda la cristalería utilizada, como frascos de gerber con tapa, cajas petri, vasos de precipitados, instrumental de siembra y medio nutritivo.

El proceso de esterilización se llevó a cabo en una autoclave a una temperatura de 121 ° C y a una presión de 1 Kg/cm<sup>2</sup> por un lapso de 60-90 minutos, aproximadamente.

Las espátulas, pinzas y bisturís se esterilizaron conforme se fueron empleando por medio de inmersiones de alcohol, seguidas por flameo con mecheros de alcohol.

### **Preparación del medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962)**

Se preparó el medio nutritivo MS al 100% de su concentración, para ello se colocaron las soluciones de macronutrientes, micronutrientes, hierro y vitaminas, además se agregaron 3 mgL<sup>-1</sup> Bencilaminopurina (BAP), 1mgL<sup>-1</sup> paclobutazol, 2mgL<sup>-1</sup> de kinetina, 30 g de sacarosa y 9 g de agar. El pH del medio nutritivo se ajustó a 5.7 y luego se vació en frascos de vidrio tipo gerber, aproximadamente 20 ml en cada uno, por último se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos. La composición del medio MS se describe en el Cuadro 3.1.

**Cuadro 3.1 Composición del medio nutritivo de Murashige y Skoog, (1962).**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>
<b>Macronutrientes</b>	
Nitrato de amonio (KH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650
Nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> )	1900
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	332.23
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	370
Ortofosfato de sodio de (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
<b>Micronutrientes</b>	
Yoduro de potasio (KI)	0.000830
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.20
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O)	17
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	8.6
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	0.000250
Sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O)	0.000025
Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O)	0.000025
<b>Solución de Hierro</b>	
Ácido etilendiaminotetracético (Na <sub>2</sub> EDTA)	37.30
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	27.80
<b>Vitaminas</b>	
Inositol	100.00
Ac- nicotínico	0.50
Piridoxina-HCl	0.50
Tiamina-HCl	0.10
Glicina	2.00
<b>Reguladores de crecimiento</b>	
Bencilaminopurina	3
Kinetina	2
Paclobutrazol	1
<b>Carbohidratos</b>	
Sacarosa	30000
<b>Solidificante</b>	
Agar	9000
<b>PH</b>	
<b>Ph = 5.7</b>	



### Obtención de vitroplantas a partir de brotes

El trasvase de las vitroplantas al medio nutritivo fue mediante el siguiente procedimiento:

1. Limpiar la campana de flujo laminar con antibacterial y alcohol al 70% para evitar contaminación (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Campana de flujo laminar con instrumental a utilizar.**

2. Tomar vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* completamente desarrolladas seleccionando las más vigorosas (Figura 3.2).



**Figura 3.2. Vitroplantas de *T. valdezianus* completamente desarrolladas.**

3. Trasvasar de 4-5 brotes de con ayuda de pinzas desinfectadas, en frascos de gerber con medio nutritivo de Murashige y Skoog (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Trasvase de brotes a medio nutritivo Murashige y Skoog.**

4. Sellar y colocar los frascos en el cuarto de incubación a temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , un fotoperiodo de 12 horas luz a una intensidad lumínica de 2800 lux y 12 horas oscuridad por 30 días (Figura 3.4).



**Figura 3.4. Frascos de vitroplantas de *T. valdezianus* en el cuarto de incubación.**

## Variables a evaluar

### Tamaño de vitroplantas

Se seleccionaron vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* y se clasificaron en tres tamaños los cuales fueron considerados como tratamientos, chico (1.1 a 2 cm); mediano (2 a 2.7 cm) y grande (3 a 4.3 cm), la clasificación se realizó tomando en cuenta la longitud de la planta completa, teniendo 6 vitroplantas por cada tamaño (Figura 3.5).

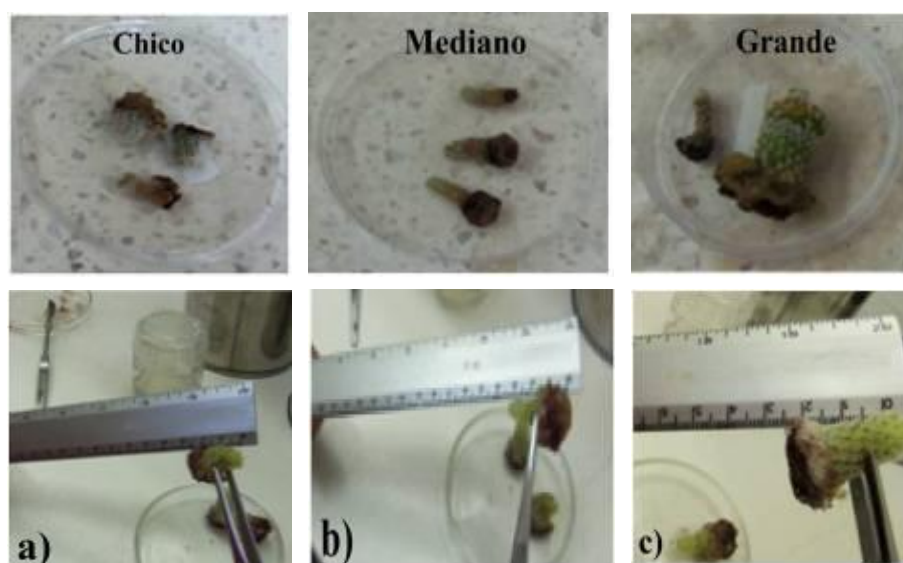


Figura 3.5. Vitroplantas de *T. valdezianus* clasificadas en tamaños: a) chico, b) mediano y c) grande.

### Diámetro de las diferentes partes del brote (basal, media y superior)

Se midió con un vernier el diámetro de las diferentes partes del brote (basal, media y superior) de las vitroplantas seleccionadas por tamaño como se observa a continuación (Figura 3.6).



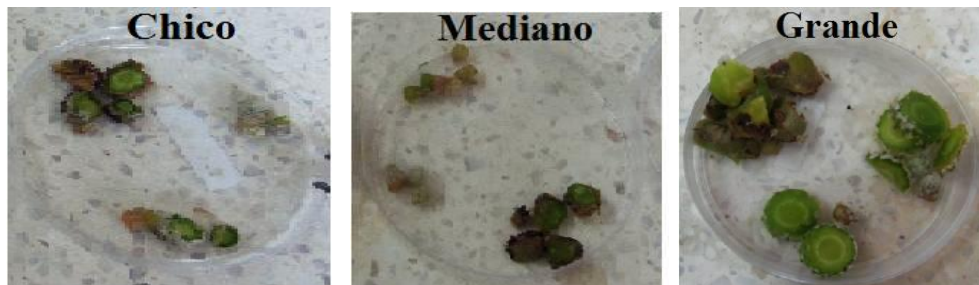
**Figura 3.6. Diámetro de las diferentes partes del brote de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.**

Las vitroplantas se colocaron en frascos de gerber estéril de acuerdo al tamaño, los cuales se llevaron a refrigeración a una temperatura de 5 °C, con la finalidad de evitar la contaminación y mantenerlas sanas, para proseguir a la cuantificación de auxinas.

### **Parámetro a evaluar**

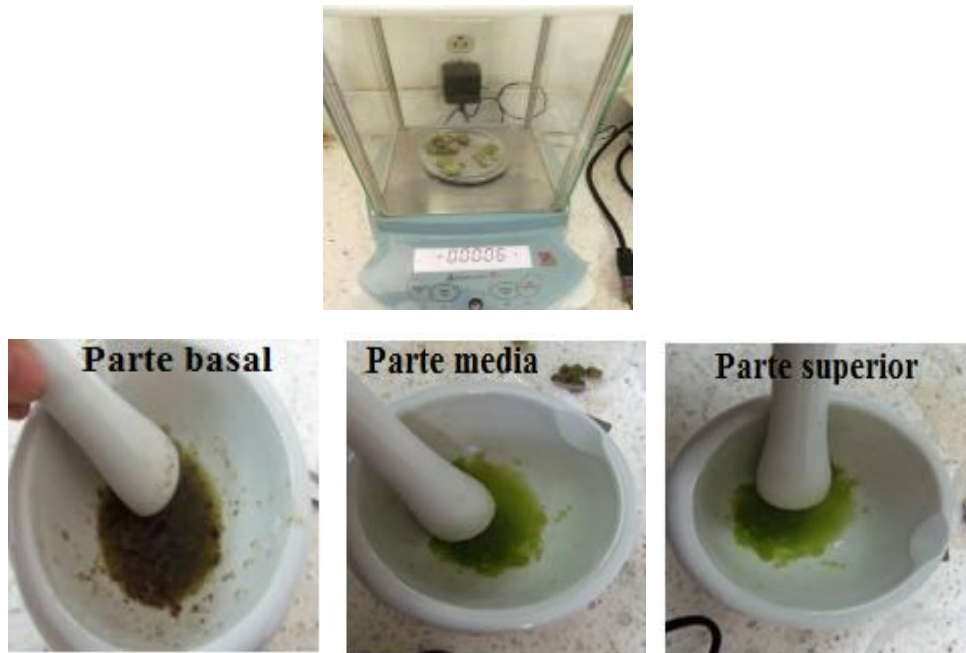
#### **Cuantificación de Auxinas**

Para la cuantificación se consideraron las vitroplantas de acuerdo al tratamiento (tamaño) y repetición, haciendo cortes pequeños de cada parte del brote en una caja petri de vidrio con la ayuda de un bisturí (Figura 3.7).



**Figura 3.7 Cortes de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* para la cuantificación de auxinas.**

Se pesó 1 g de cada muestra en una balanza analítica de 0.0001 g de precisión; se colocó cada muestra en un mortero de porcelana de acuerdo al tamaño y repetición; procediendo después al macerado y agregando 3 mL de agua destilada estéril (Figura 3.8).



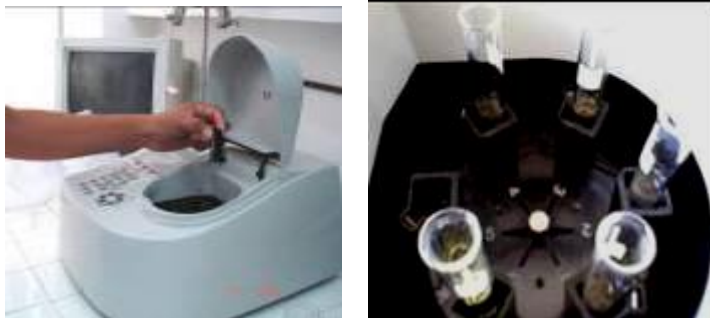
**Figura 3.8 Pesado de muestras y macerado de las diferentes partes del brote en vitroplantas de *T. valdezianus*.**

Una vez macerado, se filtró cada extracto a través de un papel filtro Watman No.1 sobre un embudo; del filtrado se colocaron 2 mL de muestra en un tubo de ensaye de 13 x100, se agregó 1 mL de reactivo Salkowsky y se dejó reposar por 30 minutos a medio ambiente (Figura 3.9).



**Figura 3.9 Filtrado de las diferentes partes del brote de vitroplantas de *T. valdezianus***

Se cuantificaron las muestras en Thermo Spectronic Scientific BioMate 3 Spectrophotometer 335905P, a una longitud de onda de 535 nm, registrando la absorbancia y concentración en ppm (Figura 3.10).



**Figura 3.10. Cuantificación de auxinas (AIA) de muestras de las diferentes partes del brote en vitroplantas de *T. valdezianus*.**

## Diseño experimental y Análisis estadístico

Se estableció un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial, donde el primer factor correspondió a tamaños de brote (chico, mediano y grande), y el segundo factor correspondió al diámetro de diferentes partes del brote (basal, media y superior), con 3 repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza (ANVA) y posteriormente se hizo una prueba de medias “Mínima diferencia significativa de Fisher” (LSD) con un nivel de significancia de 0.05 % utilizando el programa SAS.

Sea el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, 3, \dots, t \\ j = 1, 2, 3, \dots, n \end{array}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del tratamiento i.

$\varepsilon_{ij}$  = Error aleatorio, donde  $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

Análisis de la Varianza para el modelo  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$

Ho:  $\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_t$

Ha: al menos un efecto de un tratamiento es diferente de los demás.

#### IV.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos en la cuantificación de auxinas de las vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* estudiadas, se encontró en el análisis de varianza que no existe diferencia entre los tratamientos dados por los tamaños de las vitroplantas, y diferentes partes del brote estudiadas, así como en la interacción tamaño por estructuras morfológicas, teniendo un Coeficiente de Variación de 17.44 %; como se muestra en el Cuadro 4.1.

**Cuadro 4.1. Análisis de varianza para la cuantificación de auxinas en diferentes tamaños y diferentes partes del brote de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft
<b>Modelo</b>	8	0.028	0.003	0.64	0.7325
<b>Tamaño brote</b>	2	0.015	0.007	1.43	0.2659 NS
<b>Diámetro del brote</b>	2	0.001	0.0007	0.13	0.8779 NS
<b>Tamaño*Diámetro del brote</b>	4	0.011	0.0028	0.51	0.7315 NS
<b>Error Exp.</b>	18	0.100	0.0056		
<b>Total</b>	26	0.129			
<b>C.V. =</b>	<b>17.44 %</b>				

NS = No significativo



La prueba de comparación de medias para la cuantificación de auxinas de *Turbinicarpus valdezianus* en cuanto a tamaños de vitroplantas, se obtuvo un solo grupo, es decir son estadísticamente iguales, sin embargo numéricamente, el tamaño grande sobresalió de las demás por contener mayor concentración de auxinas. Queda por definir tanto en órgano o tejido como se lleva a cabo la biosíntesis de las auxinas en condiciones naturales y la distribución de la auxina en la planta, donde se hace notar que lo que se mide en un momento dado es el balance entre síntesis, metabolismo y transporte, también conviene añadir que el hecho de que un órgano sea capaz de sintetizar AIA a partir de triptófano, mediante distintas líneas de evidencias se ha podido llegar a sugerir cuáles son los órganos o tejidos más probables en llevar a cabo la síntesis de AIA en la planta.

Blilou *et al.* (2005) reportan que buena parte de las auxinas se conjugan a otros compuestos orgánicos (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas...), provocando cambios morfológicos en la planta, además de caracterizarse por su movilidad en el organismo vegetal partiendo desde un lugar de origen ó síntesis a otro para realizar su acción; esta característica se denomina transporte de la auxina, independientemente del tejido, la concentración de auxina, varía con la edad.

**Cuadro 4.2. Prueba de medias LSD para la cuantificación de auxinas en tamaños de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.**

<b>Agrupamiento</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Media</b>
A	Grande	0.34422
A	Chico	0.30789
A	Mediano	0.28511

\*valores con la misma letra son estadísticamente iguales

El Cuadro 4.6 correspondiente a la prueba de comparación de medias para la cuantificación de auxinas de *Turbinicarpus valdezianus* en cuanto a las diferentes partes del brote: basal, media y superior indica que estos tratamientos fueron estadísticamente iguales, pero numéricamente se puede apreciar que si hay diferencias en las diferentes partes del brote, además las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución, aunque la auxina se encuentra en toda la planta la más alta concentración se localiza en la raíz. Huitrón (2005) y Skoog y Miller (1965) reportan que el ácido indolacético (AIA) es sintetizado por la propia planta pero hay otras, de composición y efectos muy similares y que probablemente se transforman en AIA en el interior de la planta, estimulan la división celular y por tanto, el crecimiento de los tejidos aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas, las cuales están en crecimiento activo, siendo éste el sitio de síntesis debe existir un balance metabolismo y transporte de la misma; donde el órgano raíz, debe contener una concentración óptima.

Friml (2003) menciona debido a que las auxinas además de tener influencia en la división, están involucradas en muchos procesos del desarrollo algunos de ellos interactuando con otras fitohormonas, existe una relación entre las auxinas y las citocininas ambas se contrarrestan, las citocininas favorece la formación de brotes lo que es inhibido por las auxinas, las auxinas la formación de raíces lo que es contrarrestado por las citocininas, de los cuales es también posible inducir la formación de brotes y/o raíces.

**Cuadro 4.3. Prueba de medias LSD para la cuantificación de auxinas de las diferentes partes del brote de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.**

<b>Agrupamiento</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Media</b>
A	Parte basal	0.32189
A	Parte media	0.31144
A	Parte superior	0.30389

\*valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Numan *et al.* (2002), reportan que mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleoptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias. La concentración óptima para el promover elongación de tallos es entre  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, sin embargo, en raíces esta concentración es muy alta y retarda su crecimiento.

Para los medios de enraizamiento se incluyen especialmente las hormonas AIA, AIB en concentraciones de 100mg/L en el caso de la piña y la concentración varía según sea la especie o el método de aplicación y sus efectos dependen de varios factores, como son la edad, estado fisiológico, tipo de sustratos, esterilización del medio y las condiciones ambientales (Salisbury y Ross, 1994).

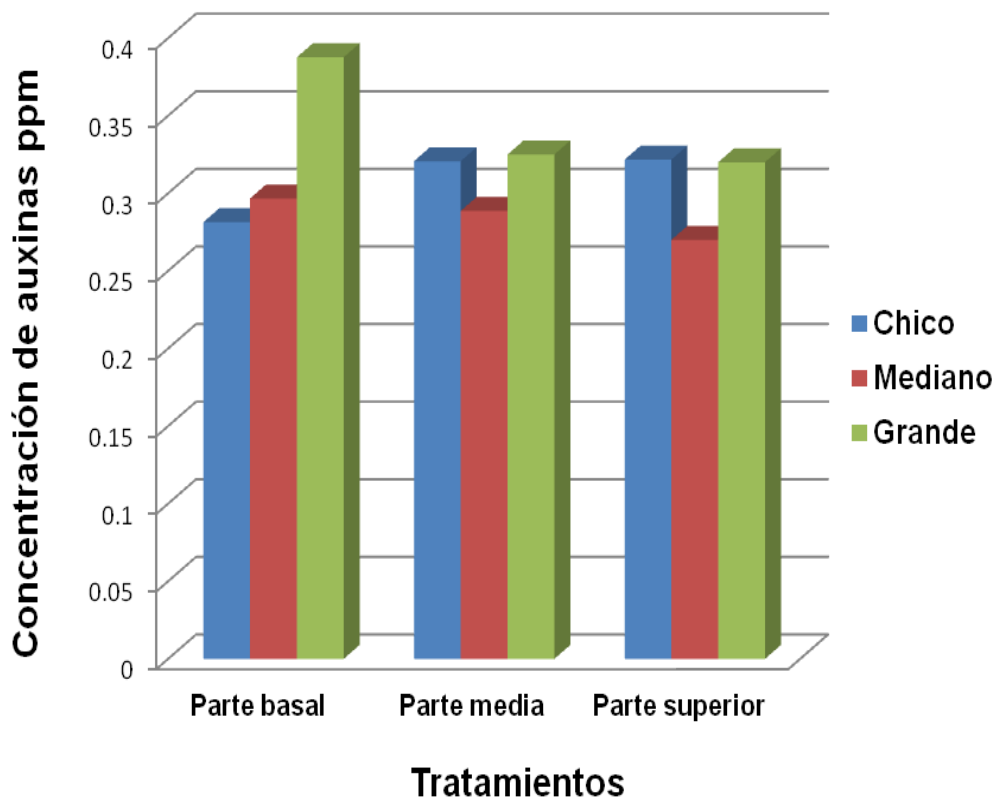
La concentración es de vital importancia, pues puede activar o inhibir el enraizamiento y afectar la planta hasta la muerte (Scott, 1972; Rojas y Ramírez, 1987; Hu y Wang, 1983).

Villee (1992) indica que auxinas estimulan el crecimiento de la parte inferior, queda por definir qué en cada órgano o tejido se lleva a cabo la biosíntesis, mientras que en raíces existe un mayor nivel de la hormona por el cual inhibe el alargamiento de las células. Yuan et al. (2003) no encontraron diferencias significativas en la concentración endógena de auxina del pedicelo de frutos maduros en naranja valencia, lo cual se explica como resultado de la baja concentración endógena de auxina en la madurez.

Olivella et al. (2001) por su parte encontraron concentraciones de AIA en hojas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus en diferentes estadios; jóvenes (7 días), adultas (20 días) y maduras (60 días) en rangos de 39-52, 36-48 y 43-48 nmols.g<sup>-1</sup> de peso seco respectivamente, no encontrando diferencias significativas entre éstas.

Laskowski et al., (2008) determinaron contenidos de AIA en pedicelo y fruto de *Citrus sinensis* var. Salustina. Encontraron concentraciones máximas de 500 ng.g<sup>-1</sup> de materia seca con disminución lenta después de la antesis (118 días) hasta 77 ng.g<sup>-1</sup> de ms en pedicelo, mientras que por unidad, la concentración fue de 4 ng por pedicelo (48 días) con disminución hasta los 2 ng/pedicelo. Para el caso del fruto las concentraciones oscilaron entre 53 y 77 ng.g<sup>-1</sup> de ms disminuyendo hasta los 20 ng .g<sup>-1</sup> de ms a los 62 días después de la antesis.

La cuantificación de auxinas de las vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* a los 30 días de desarrollo fue de 0.28 a 0.34 ppm, mayor a lo encontrado por Orozco (2013) en *E. micromeris* que obtuvo concentraciones que van desde 0.18 a 0.28 ppm y para *O. denegrii* de 0.13 a 0.17 ppm, lo que indica que el contenido de auxinas fue más alto en brotes cultivados *in vitro* de *T. valdezianus* con respecto a *E. micromeris* y *O. denegrii* como se observa en la Figura 4.1; debido a que el medio nutritivo que se utilizó contenía hormonas y posiblemente haya afectado en el contenido de auxinas en este estudio.



**Figura 4.1** Cuantificación de auxinas (AIA) en tamaños y diámetro de diferentes partes del brote in vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.

Harberd (2000) es importante destacar que las respuestas en crecimiento de varios órganos de las plantas a concentraciones de auxinas no son similares, que las raíces y los tallos son notablemente diferentes en su sensibilidad a las auxinas, las concentraciones de auxinas que estimulan el crecimiento del tallo pueden inhibir el alargamiento de la raíz.

Johnson y Emino (1979) cultivaron 8 especies diferentes de cactáceas, entre ellas *Hylocereus calcaratus*, en medio MS con alto contenido de sales y reguladores de crecimiento, obteniendo elongación de brotes y desarrollo de raíz en esta especie. Cada tipo de regulador, cada concentración y cada combinación de reguladores dió respuestas de crecimiento distintas.

Varios autores han encontrado la importancia de la aplicación de agentes inductores como las auxinas, así como también la utilización de otros reguladores del crecimiento vegetal, que se conoce juegan un rol importante, que la mejor respuesta para la producción de brotes en cultivo *in vitro* de algunas especies de cactáceas se presenta con bajas concentraciones de auxina, o en ausencia de la misma (Ríos *et al.*, 2005).

Estos resultados nos permiten inferir en forma práctica las concentraciones a utilizar en forma experimental en esta especie, pero cabe señalar que es necesario hacer investigaciones futuras, realizar estudios del papel decisivo que tienen las auxinas en una serie de procesos del desarrollo y crecimiento vegetal (Acosta, 2004).

## V.-CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, en relación a la concentración de auxinas en diferentes tamaños y diferentes partes del brote (basal, media y superior) de las vitroplantas estudiadas en *Turbinicarpus valdezianus* se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Con respecto al contenido de auxinas (AIA) en cuanto a tamaños de vitroplantas: chico, mediano y grande evaluados; no se presentaron diferencias estadísticas, pero numéricamente la más grande sobresalió con mayor contenido de auxinas.
2. Con respecto al contenido de auxinas (AIA) en cuanto al diámetro de diferentes partes del brote: basal, media y superior, de las vitroplantas evaluadas; no presentaron diferencias estadísticas, pero numéricamente la parte basal del brote sobresalió en cada una de ellas.
- 3.- El contenido de auxinas de los brotes de las vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus* a los 30 días de desarrollo fluctuó de 0.28 a 0.34 ppm; por lo que se recomienda realizar nuevamente este estudio en un medio nutritivo libre de hormonas.

## VI.-LITERATURA CITADA

**Acosta, M. 2004.** Función del transporte polar y lateral en la formación de gradientes longitudinal y radial de auxina. Relación con el crecimiento, el enraizamiento y los valores de ploidía celular. Universidad de Murcia. En: Metabolismo y modo de acción de fitohormonas. Ed. Universidad de Salamanca, España pp. 41.

**Anderson F. E. 2001.** La familia de Cactus. Timber pp. 665-673.

**Bhalerao RP, J Eklöf, K Ljung, A Marchant, M Bennett y G Sandberg. 2002.** Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. Plant Journal 29: 325–332.

**Barcello Coll Juan. Madrid.1995.**Fisiología Vegetal 7° edición. Ediciones PIRAMIDE pg: 354-357.

**Bric JM, Bostock RM, Silverstonet SE. 1991.**Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrana. Appl Environ Microbiol; 57(2): pp.535-538.

**Birkemeyer C., Kalasa A., Kopka J., 2003.** Comprehensive Chemical Derivatization for Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Multi-Targeted Profiling of the Major Phytohormones. Journal of Chromatography A. Pp 89-102.

**Blilou I, J , M Wildwater, V Willemsen, I Paponov, J Friml, R Heidstra, M Aida, K Palme y B Scheres. 2005.** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. Nature 433: 39-44.

**Bravo, H y H. Sánchez- Mejorada, 1991.** Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 2° ed. Vol 3. Pp. 404.

**Bric JM, Bostock RM, Silverstonet SE. 1991.**Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrana. Appl Environ Microbiol; 57(2): pp.535-538.



**Buxbaum, F. 1952.** The phylogenetic división of the subfamily Cereoideae, Cactácea Madroño. 14:177–216. Control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: Pp. 847-859.

**Cote, D. 1981.** *Turbinicarpus*: growing tiny plants for a large reward. *Cact. Succ. J. (USA)* 53: 244-245.

**Curt Backeberg. 1958.** *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 4 (1): 7-7.

**Dharmasiri N, S Dharmasiri, D Weijers, E Lechner, M Yamada, L Hobbie, JS Ehrismann, G Jurgens y M Estelle. 2005.** Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell* 9:109-19.

**Dobrev PI, Havlicek L, V Agner M, Malbeck J, Kaminek M. 2005.** Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J Chromatography A* .2005; 2: pp.1-8.

**Elizondo, E. J. L; J. Valdez y A. Rodríguez. 1990.** Cactáceas vulnerables y en Peligro de extinción para Coahuila. México. *Biotam* 2(2): Pp .17- 22.

**Esmon Ca, V ullas, V Pedmale y E Liscum. 2005.** Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 665-674.

**Flores J, Arredondo A, Jurado E 2005.** Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: an endangered cacti genus. *Nat. Areas J.*25: Pp. 183-187.

**Flores J, Jurado E, Jiménez-Bremont JF 2008.** Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Sp. Biol.* 23: Pp. 43-46.

**Franhenberger Jr Wt y Arshad M. 1995.** Phytohormones in soils. Microbial production and function.

**Friml, J. 2003.** Auxin transport-shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biol.* 6: 7-12.

**Fuentevilla, C. 2004.** Propagación *in vitro* de algunas especies de *Leucocoryne*. Taller de licenciatura. Facultad de Agronomía, Área de Hortalizas y Flores. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso de Chile. Quillota, Chile. 71.

**García, M. Hernández, R. Bustios, S. Esteves, M. Echevarría, Y. Cruz, R. León, L. y Del Busto, A. 2007.** Algunas experiencias en la utilización del *Aloe vera* L. en la preparación de medios de cultivo. Departamento de Biología y Departamento Agropecuario de la Universidad de Pinar del Río, Cuba.

**George E. F. 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 The Technology. 2<sup>nd</sup> Edition. British Library Edigton. England. Pp. 352.

**Glass Moller y R.A. 1997.** Foster Cactaceae, *Turbincarpus valdezianus*. Nuevos taxa de cactáceas en Nuevo León, México. 37: pp.11-21.

**Glickmann. E. y Dessauxy. 1995.** A Critical Examination of the Specificity of the Salkousky Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic bacteria. Applied and environmental Microbiology, vol 61 N°2, Pp.793-796.

**Gray W.M. 2004.** Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. PLoS Biol., 2 (9): e311.

**Guerrero, J. R.; García, P.; Sánchez-Bravo, J.; Acosta; M.; Arnao, M. 2001.** Quantitation of Indole-3-acetic acid by LC with electrochemical detection in etiolated hypocotyls of *Lupinus Albus*. J. Liq. Chrom. And Rel. Technol. 24 (20) p 3095-3104.

**Guzmán U, Arias S, Dávila P 2003.** Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM/CONABIO, México. pp. 315.

**Hager A. 2003.** Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. Journal of Plant Research 116: 483–505.

**Harberd, N.P. 2003.** Auxin promotes arabidopsis root growth by modulating.

**Hernández, M. Oria JG, Chávez-Martínez RJ, Sánchez-Martínez E 2007.** Revista Desde el Surco, Manual de fertilización orgánica y Química, págs. 85 – 88.

**Hu, C. y Wang. P.J.1983.** Meristem, shoot tip and bud cultures. En: Handbook of plant cell culture. Mc Millam Publisynng p: 177-277.

**Hou G, VL Kramer, YS Wang, R Chen, G Perbal, S Gilroy y EB Blancaflor. 2004.** The promotion of gravitropism in *Arabidopsis* roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. Plant Journal 39: 113–125.

**Hudson T. T H. 1992.** Propagación de plantas, principios y prácticas. 3<sup>a</sup> Edición Editorial CECSA. México D.F. Pp 596-601.

**Huitrón, M<sup>a</sup>. V. 2005.** Cuaje de sandía mediante el empleo de fitorreguladores. Influencia de cultivares y porta injertos sobre parámetros productivos y de calidad. Tesis doctoral. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería

**Hurtado y Merino M. M. E. 2000.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México D.F. Pp 49-57,67-80.

**Hurtado, D; Merino, M. 1994.** Cultivo de tejidos vegetales. Trillas S.A. de C.V. México. Pp. 233

**Jenik P y M Barton. 2005.** Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132: 3577-3585

**Johnson, J.L. y E.R. Emino. 1979.** Tissue culture in the Cactaceae. *Cact. Succ. J. (U. S.)* 51:275-277.

**Jork Hellmut. 1991.** Thin layer Chromatography: reagents and detection methods. Weinheim 3 v.

**Krikorian A. D. 1991.** Medios de cultivo: generalidades y preparación Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, WM y Mroginski LA (eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali pp 41-59.

**Laskowski, L. E., C. Monerri., A. García y J. L. Guardiola.2008.** Vascularización del pedicelo y crecimiento del fruto de *Citrus sinensis* var. Salustiana y su relación con el contenido de ácido indolacético. *Bioagro.* 20(1): 11-

**Liscum E. y Reed JW. 2002.** Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* 49: 387–400.

**Mantell, S. H. Mague, S. Q. Chandler F. L. 1993.** Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT, pp. 481- 494.

**Mantilla. M. 2007.** Evaluación de un Bioinoculante sobre el cultivo de un Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Yoko) en periodo de enraizamiento.

**Mata-Rosas M, Monroy de la Rosa Ma, Moebius-Goldammer K, Chavez-Avila VM 2001** Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 37: pp. 400-404.

**Mauseth, J. D. 2000.** Cactus. Tissue culture: A potential method of propagation. *Cact. y Succ. J. (U.S.)* 59: pp. 80-81.

**Merino. 1987.** Los costos del cultivo y el mantenimiento de las hojas de plantas mediterráneas . En: TenhunenJD , CatarinoFM , LangeOL , OechelWC,eds. *respuesta de las plantas al estrés* . Berlín, Alemania: Springer-Verlag, 553 - 564 .

**Moebuis-Goldammer KG, Mata-Rosas M, Chavez-Avila VM 2003.** Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus Kotschoubeyanus* (Lem.)K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. In Vitro Cell Development Biology Plant 39: Pp. 388-393.

**Mroginski, A. 2008.** Establecimiento de cultivos vegetales in vitro. Unidad de investigación de Biotecnología. Cali, Colombia. 1-22.

**Murashige, T. y Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with Numan, A.; Danielson N. D. On-line photo-derivatization with flow injection and liquid chromatography-atmospheric pressure electrospray mass spectrometry for the identification of indoles". *Analitica Chimica Acta* 460: Pp 49-60.

**Neutelings, T. M. W. 1982.** *Turbincarpus valdezianus* (Möller) Gl. & F. *Succulenta* (Amsterdam) 61:188-190.

**Numan, A. Danielson N. D. 2002.** On-line photo-derivatization with flow injection and liquid chromatography-atmospheric pressure electrospray mass spectrometry for the identification of indoles". *Analitica Chimica Acta* 460: p 49-60.

**Olivella C. M. Vendrell and R. Savé. 2001.** Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus y su variación con la edad. *Invest. Agr: Prod. Prot. Veg.* 16(3): 333-342.

**Orozco Sifuentes M. M.** micropropagación, valoración hormonal y código de barras de la vida en *epithelantha micromeris* y *obregonia dengrii* para su conservación. Tesis. Maestría. UAAAN, Saltillo, México. Pp 82-84.

**Pérez Molphe Balch, E. M. Ramírez M.R. Núñez Palenius H. G. Ochoa A. N. 1999.** Organogénesis. En introducción al cultivo de tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México pp. 71-75, 125-12.

**Pfluger J y P zambryski. 2004.** The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development* 131: 4697–4707.

**Pierik R. N. M. 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editorial Mundi - Prensa. Madrid, España. Pp. 326.

**Preece J. E. y Sutter E. G. 1991.** "Acclimatization of micropropagated to the greenhouse and field". In Debergh P.C., Zimmerman, R.H. *Micropropagation technology and application.* Editorial Dordrech Kluwer Academic Press. Pp. 71-93.

**Purves W. Sadova D., Orians G., Heller C. 2002.** *Vida La Ciencia De La Vida.* Sexta Edición. Editorial Médica Panamericana. New York. Pp 1133.

**Ríos, D., F. Avilés, M. Sánchez-Olate R. Escobar y G. Pereira. 2005.** Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño *Castanea sativa* Mill. *Agricultura Técnica* 65(3): Pp 258-264.

**Rodríguez Julian, 2005.** Agrobiotecnología Cultivo de Tejidos Vegetales Sistema de Micropropagación vegetal Cultivo de Meristemo, Ecuador, Conferencia.

**Rojas, G Y H. Ramírez 1987.** Control hormonal del desarrollo de las plantas. Segunda Edición. Limusa. Grupo Noriega Editores México D.F. Pp. 263.

**Rojas, M. Ramírez, H. 2000.** Control hormonal del desarrollo de plantas. México. Limusa Noriega.

**Salisbury F y C Ross. 1994.** Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana. México.

**Salisbury y Roos C. 2000.** Fisiología de las plantas. Paraninfo S. A. Thomson Editores. Madrid, ES. c. 17. p. 581 – 585; c. 18. p. 610 – 616; c. 22. p. 758 - 760.

**Salkowsky E. 1889.** Ueber die Bildung von flüchtigen Fettsäuren beider ammoniakalischen Harnsäure. *Zeit für Physiologische Chemie* 13: 264-274.

**Sandberg G. Crozier A. Erstern A. 1987.** Indole-3-acetic acid and related compounds. En: *The principles and practices of plant hormone analysis* (Rivier L., Crozier A, Eds.) Academic Press, London; (4). p. 160-299.

**Sánchez Cuevas, María Claudia y Salaverría José Luis 2004.** *Revista Científica UDO Agrícola* Vol 4, Núm. 1, pp 21-26.

**Scott, T.** Auxins roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 115 - 118. 1972.

**Štarha R, Chybidziurová A, Lacný Z. 1999.** Alkaloids of the genus *Turbinicarpus* (Cactaceae). *Biochem. Systemat. Ecol.* 27: 839-841. Tabaco tissue cultures. *Physoil Plant* 15 pp. 473- 497.

**Skoog F y Co Miller. 1965.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: *Molecular and Cellular Aspects of Development*. E. Bell ed., Harper and Row, New York, pp. 481-494.

**Taiz, L., Zeiger, E. 2006.** *Plant Physiology*. Cuarta Edición. Editorial Sinauer, New York. Pp 690.

**Tanimoto Eiichi. 2005.** Regulation of Root Growth by Plant Hormones-Roles for Auxin and Gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences* pp 249-265.

**Teale WD, Paponov IA y Palme K 2006.** Auxin in action: signalling, transport and the Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr Sci.* 2004; 86(7): Pp. 978-985.

**Thakuria D, Talukdan NC, Goswamil C, Aazarika S, Boro RC, Khan MR. 2004.** Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr Sci*; 86(7):978-985.

**Thimann KV. 1977.** Hormone action in the whole life of plants. Amherst: University of Massachusetts Press.

**Torres B. C. 1996.** El proceso de adaptación de plantas micropropagadas Condiciones de invernadero. Memoria. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo Coahuila, México; Pp. 17-20.

**Van Doorn WG y AD Stead. 1997.** Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental Botany* 48, 821–837.

**Villee, S. 1992.** Biología. Traducción de la primera edición. México. Macgraw-hill. pp. 768-776.

**Weaver J. R. 1996.** Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas. México, D.F. Pp. 17-22.

**Woodward Aw y B Bartel. 2005.** Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.

**Yuan, R., W. Kender y J. Burns. 2003.** Young fruit and auxin transport inhibitors affect the response of mature “Valencia” oranges to abscission materials via changing endogenous plant hormones. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128 (3): 302- 308.