

**CONTROL DE HIPERHIDRICIDAD EN BROTES DE CULTIVO *in vitro* POR PROMOTORES DE ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO
EN *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) G & F**

HERMILA TRINIDAD GARCIA OSUNA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERIA DE SISTEMAS DE
PRODUCCIÓN**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

CONTROL DE HIPERHIDRICIDAD EN BROTES DE CULTIVO *in vitro* POR
PROMOTORES DE ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO EN *Turbinicarpus*
valdezianus (Moller) GL & F

TESIS POR

HERMILA TRINIDAD GARCIA OSUNA

Elaborada bajo supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito
parcial, para optar el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor

Dr. José Angel Villarreal Quintanilla

Asesor

Dr. Eladio H. Cornejo Oviedo

Asesor

M.C. Leticia Escobedo Bocardo

Dr. Jerónimo Landeros Flores

Director de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Diciembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

A la M.C. Leticia Escobedo Bocardo, por su amistad, por proporcionarme lo necesario para la realización de este trabajo.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza por la oportunidad de realizar este trabajo bajo su supervisión.

Al Dr. Ricardo Requejo López por su amistad, confianza y guía en la realización de este trabajo.

A la M.C. Francisca Ramírez Godina por su confianza, amistad y por brindarme su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Biol. Ana María Ochoa por su amistad, disponibilidad y generosa ayuda.

A T.A. Leticia Portos por sus orientaciones y por brindarme la oportunidad de aprender de su experiencia.

Al Dr. Homero Ramírez Rodríguez por su apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

Al Dr. Eladio H. Cornejo Oviedo por su paciencia y comprensión.

Al Dr. José Angel Villarreal Quintanilla por sus aportaciones en la revisión del trabajo.

Al Museo del Desierto por el apoyo brindado en todo momento.

DEDICATORIA

A MIS PAPÁS

Beatriz Osuna Durán
Cristóbal García Sandoval

A MI FAMILIA

Ricardo Cristóbal García Osuna
Mónica Carbonell Casadesús
Roser García Carbonell
Ricard García Carbonell

A MIS “BENDICIONES”

Ana Guadalupe Bertaud de León
Irene Avila Ortiz
Norma Angélica Hernández Guevara
Eleazar Moreno Mata
Luis Fernando Barbosa Abundis

A MI GRAN AMIGO

Rubén Rojas Meléndez

**CONTROL DE HIDRACIDAD EN PLANTAS DE CULTIVO IN VITRO POR
PROMOTORES DE ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO EN *Turbnicarpus
valdezianus*(Moller) GL & F**

POR

HERMILA TRINIDAD GARCIA OSUNA

MESTRIA EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenvista, Saltillo, Coahuila. Junio de 2008

Dr. Adalberto Benavides Mendoza. –Asesor-

Palabras clave: *Turbnicarpus valdezianus*, hiperhidricidad, ácido salicílico, ácido benzoico, paclobutrazol, prohexadiona de calcio.

Se determinó el efecto de inhibidores de las giberelinas como paclobutrazol (PBZ) y prohexadiona de calcio (PCa), así como el ácido salicílico (AS) y el ácido benzoico (AB) en la propagación de *Turbnicarpus valdezianus* especie en protección especial conforme a la norma vigente NOM-059-ECOL-2001. El objetivo fue disminuir la respuesta hiperhídrica de los brotes, inducir la organogénesis y obtener brotes mejor aclimatados. El tratamiento con PBZ ($3.4 \cdot 10^{-4}M$) disminuyó la hiperhidricidad en un 100% de los brotes e incremento significativamente la organogénesis (18

brotos/explante). Los tratamientos con PCa (10^{-4} M), AS (10^{-4} M) y AB (10^{-4} M) generaron una mayor respuesta hiperhídrica pero dieron lugar a modificaciones morfológicas en los brotes que favorecieron la sobrevivencia de la plántula a las condiciones *ex vitro*. Dentro de las modificaciones anatómicas se encontraron diferencias significativas en el desarrollo del sistema vascular. Al evaluar el crecimiento y por ciento de supervivencia de las vitroplantas en etapa de aclimatización con tres sustratos y cuatro soluciones nutritivas, los resultados fueron significativos para solución y sustrato. El mejor sustrato fue la mezcla de 19.92% tezontle, 28.97% perlita y 51.11% aserrín de coco; la mejor solución fue la concentración al 66% de Bayfol®.

ABSTRACT

**CONTROL OF HIPERHYDRICITY IN TISSUE CULTURE PLANTS WHIT
CHEMICAL PROMOTERS OF PHYSIOLOGICAL HARDINESS IN
Turbinicarpus valdezianus (Moller) GL & F**

BY

HERMILA TRINIDAD GARCÍA OSUNA

MESTRIA EN SISTEMAS DE PRODUCCION

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio de 2008

Dr. Adalberto Benavides Mendoza.-Adviser-

Key words: *Turbinicarpus valdezianus*, hiperhidricity, paclobutrazol, prohexadione-Ca, salicylic acid, benzoic acid.

The effects of Gibberellin inhibitors, including paclobutrazol (PBZ) prohexadione of calcio(Ca) and salicylic acid(AS) and benzoico acid(AB) were studied in *Turbinicarpus valdezianus* specie which is considered special protection within NOM-059-ECOL-2001. The objective was to reduced shoot hyperhydric increased organogenesis and producing shoots better acclimatized. The PBZ-treatment ($3.4 \cdot 10^{-4}M$)

lower the hyperhydricity in a 100%, and increased organogenesis (18shoot/expant). The treatments with PCa (10^{-4} M), SA (10^{-4} M) and BA (10^{-4} M) induce hyperhydricity reflecting an oxidative stress. Within of the modifications anatomical of stem of treated significant differences in vascular system development were found. To evaluate the growth and the surviving percentage in vitroplant acclimatization whit three substrates and four nutrient solutions the results were significant for substrates and solutions. The most mixes was of 19.92% tezontle, 28.97% perlite and 51.11% coconut sawdust; the most solution was the concentration a 66% of Bayfol®.

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
HIPOTÉISIS	6
REVISIÓN DE LITERATURA	7
Hiperhidricidad.....	7
Promotores del endurecimiento fisiológico.....	8
Paclobutrazol.....	8
Prohexadiona de calcio.....	10
Ácido salicílico.....	11
Ácido Benzoico.....	13
Aspectos histológicos en cactáceas.....	14
Aclimatización.....	15
Sustratos.....	16
Materiales usados en la elaboración de sustratos.....	17
Fibra de coco.....	17
Tezontle.....	18
Perlita.....	18

CONTROL DE HIPERHIDRICIDAD EN PLANTAS DE CULTIVO IN VITRO POR PROMOTORES DE ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO EN <i>Turbinicarpus valdezianus</i> (Möller) GL & F.....	20
CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE PLANTAS DE CULTIVO IN VITRO TRATADAS CON PROMOTORES DEL ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO EN <i>Turbinicarpus valdezianus</i> (Moller) GL & F.....	33
MANEJO DE SOLUCIÓN NUTRITIVA Y SUSTRATOS EN LA ACLIMATIZACIÓN DE <i>Turbinicarpus valdezianus</i> (MOLLER) GL & F PROPAGADA <i>in vitro</i>.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	58

INDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Valores medios y área promedio (μm^2) de vasos de xilema del tallo de plantas de crecimiento normal y de desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Turbinicarpus valdezianus</i>	14
2	Valores medios de características asociadas con las forma de vida de la familia Cactaceae.....	15

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Estructura molecular de Paclobutrazol.....	9
2	Estructura molecular de Prohexadiona de Calcio.....	11
3	Estructura molecular del Ácido Salicílico.....	12
4	Estructura molecular del Ácido Benzoico.....	13

**CONTROL DE HIDRACIDAD EN PLANTAS DE CULTIVO IN VITRO POR
PROMOTORES DE ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO EN *Turbnicarpus
valdezianus*(Moller) GL & F**

POR

HERMILA TRINIDAD GARCIA OSUNA

MESTRIA EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio de 2008

Dr. Adalberto Benavides Mendoza. –Asesor-

Palabras clave: *Turbnicarpus valdezianus*, hiperhidricidad, ácido salicílico, ácido benzoico, paclobutrazol, prohexadiona de calcio.

Se determinó el efecto de inhibidores de las giberelinas como paclobutrazol (PBZ) y prohexadiona de calcio (PCa), así como el ácido salicílico (AS) y el ácido benzoico (AB) en la propagación de *Turbnicarpus valdezianus* especie en protección especial conforme a la norma vigente NOM-059-ECOL-2001. El objetivo fue disminuir la respuesta hiperhídrica de los brotes, inducir la organogénesis y obtener brotes mejor aclimatados. El tratamiento con PBZ ($3.4 \cdot 10^{-4}M$) disminuyó la hiperhidricidad en un 100% de los brotes e incremento significativamente la organogénesis (18 brotes/explante). Los tratamientos con PCa ($10^{-4}M$), AS ($10^{-4}M$) y AB ($10^{-4}M$) generaron una mayor respuesta hiperhídrica pero dieron lugar a

modificaciones morfológicas en los brotes que favorecieron la sobrevivencia de la plántula a las condiciones *ex vitro*. Dentro de las modificaciones anatómicas se encontraron diferencias significativas en el desarrollo del sistema vascular. Al evaluar el crecimiento y por ciento de supervivencia de las vitroplantas en etapa de aclimatización con tres sustratos y cuatro soluciones nutritivas, los resultados fueron significativos para solución y sustrato. El mejor sustrato fue la mezcla de 19.92% tezontle, 28.97% perlita y 51.11% aserrín de coco; la mejor solución fue la concentración al 66% de Bayfol®.

ABSTRACT

CONTROL OF HIPERHYDRICITY IN TISSUE CULTURE PLANTS WHIT CHEMICAL PROMOTERS OF PHYSIOLOGICAL HARDINESS IN *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) GL & F

BY

HERMILA TRINIDAD GARCÍA OSUNA

MESTRIA EN SISTEMAS DE PRODUCCION

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenvista, Saltillo, Coahuila. Junio de 2008

Dr. Adalberto Benavides Mendoza.-Adviser-

Key words: *Turbinicarpus valdezianus*, hiperhidricity, paclobutrazol, prohexadione-Ca, salicylic acid, benzoic acid.

The effects of Gibberellin inhibitors, including paclobutrazol (PBZ) prohexadione of calcio(Ca) and salicylic acid(AS) and benzoico acid(AB) were studied in *Turbinicarpus valdezianus* specie which is considered special protection within NOM-059-ECOL-2001. The objective was to reduced shoot hyperhydric increased organogenesis and producing shoots better acclimatized. The PBZ-treatment ($3.4 \cdot 10^{-4}M$) lower the hyperhydricity in a 100%, and

increased organogenesis (18shoot/expant). The treatments with PCa (10^{-4} M), SA (10^{-4} M) and BA (10^{-4} M) induce hyperhydricity reflecting an oxidative stress. Within of the modifications anatomical of stem of treated significant differences in vascular system development were found. To evaluate the growth and the surviving percentage in vitroplant acclimatization whit three substrates and four nutrient solutions the results were significant for substrates and solutions. The most mixes was of 19.92% tezontle, 28.97% perlite and 51.11% coconut sawdust; the most solution was the concentration a 66% of Bayfol®.

INTRODUCCION

La tecnología utilizada en la propagación de plantas de valor comercial incluye la micropropagación por cultivo de tejidos.

Como resultado de las condiciones ambientales *in vitro*, las plantas desarrollan una anatomía y fisiología diferente a las plantas cultivadas en condiciones de campo o invernaderos (Pospíšilová, *et al.*, 1999). Estos cambios afectan todos los órganos de la planta, aunque no todos tienen el mismo peso sobre el comportamiento *ex vitro*.

La hiperhidricidad es uno de los principales factores limitantes en la propagación de plantas por cultivo de tejidos (Deberg *et al.*, 1992) varía su intensidad con la especie, la variedad y las condiciones de cultivo (Fal *et al.*, 1999, Thomas *et al.*, 2000).

Este fenómeno comprende cambios a nivel bioquímico, además de factores físicos que actúan sinérgicamente afectando hasta el 60% de la producción. El tejido se observa grueso, translúcido de un color verde pálido, y puede llegar a estar hasta dos veces más grande de lo normal (Pâques, 1991).

Estos aspectos disminuyen los porcentajes de sobrevivencia en la etapa de aclimatización.

Se ha demostrado que la hiperhidricidad es un fenómeno reversible, modificando las condiciones físicas y químicas en las etapas de multiplicación y enraizamiento *in vitro* (Pâques, *et al.*, 1987).

El empleo de osmoreguladores, reguladores del crecimiento e inductores químicos se han utilizado para mejorar las condiciones ecofisiológicas *in vitro* y su incidencia en el desarrollo de las plántulas (Romano *et al.*, 1995; Santos-Díaz, *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2005)

Con base en lo anterior el presente trabajo tuvo el objetivo de disminuir la hiperhidricidad a partir de las modificaciones ambientales *in vitro*, por medio de la aplicación de promotores del endurecimiento fisiológico.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de diferentes promotores de endurecimiento fisiológico sobre el crecimiento y la incidencia de hiperhidricidad en los explantes de *Turbnicarpus valdezianus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Documentar los cambios en las características anatómicas y funcionales de las vitroplantas tratadas con promotores del endurecimiento fisiológico.

Determinar el efecto diferencial de los tipos y concentraciones de promotores del endurecimiento fisiológico sobre el éxito de establecimiento de la aclimatización en las vitroplantas.

HIPÓTESIS

Los promotores del endurecimiento fisiológico influyen en la disminución de la hiperhidricidad en vitroplantas de *Turbnicarpus valdezianus*

REVISION DE LITERATURA

Hiperhidricidad

El fenómeno de hiperhidricidad depende de numerosos factores físicos y químicos que actúan sinérgicamente (Pâques, 1991).

La hiperhidricidad afecta la anatomía, morfología y fisiología de las plantas en crecimiento. Estas variaciones se van incrementando progresivamente a medida que los cultivos son mantenidos(Debergh *et al.*, 1992). Las plantas presentan una apariencia brillante translúcida y su morfología indica un exceso de agua.

Esta manifestación morfológica se atribuye a una defectuosa lignificación, síntesis reducida de celulosa, cambios en la flexibilidad de la pared celular y alteraciones en las relaciones hídricas de la célula (Ziv,1990).

Los tallos desarrollados *in vitro* tienen bajos contenidos de lignina, las paredes celulares son finas y tienen grandes espacios intercelulares y limitado desarrollo de los tejidos vasculares (Taji, *et al.*, 1996)

Las raíces inducidas bajo condiciones *in vitro*, son por lo general adventicias y con conexiones vasculares pobremente desarrolladas. Las raíces *in vitro* contienen numerosos granos de almidón, abundantes espacios intercelulares y son generalmente hipertróficas con una longitud muy grande y tejido vascular primario (Sutter, 1985).

La hiperhidricidad puede ser inducida cuando existe un estrés inicial por ejemplo: exceso de citocininas o iones de amonio, el cual modifica los niveles de fenoles en los tejidos y eleva la actividad de las enzimas peroxidasas solubles en la membrana. Esto ocasiona un exceso en la biosíntesis de etileno.

La hipótesis sugiere que un exceso de etileno en el cultivo puede inhibir la actividad del PAL y peroxidasas ácidas decreciendo significativamente la lignificación.

La máxima proliferación esta asociada con bajas concentraciones de compuestos fenólicos.

Chakrabarty *et al.*,(2006) demostró un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peróxidasa y glutatión reductasa en hojas hiperhidratadas de manzana, indicando que la hiperhidricidad esta asociada con el estrés oxidativo.

Promotores del endurecimiento fisiológico

Hasta hace pocos años se han desarrollado nuevas estrategias para el control de importantes enfermedades en el cultivo de plantas. Estas técnicas están basadas en la inducción transitoria o permanente de la modificación de vías metabólicas celulares por medio de estructuras moleculares llamadas elicitores. Estas moléculas complejas pueden ser de origen biótico o abiótico. En plantas actúan sobre la producción de metabolitos secundarios, como por ejemplo en la modificación de la vía metabólica de los fenilpropanoides, así establecen una mayor resistencia a los patógenos. Elicitores no bióticos en la defensa de las plantas son: ácido salicílico, acybenzolar-S-metil (Bion ®), fosetil-Al, trinexapac-etil (TrixE) y prohexadiona de calcio (Regalis®)(Bazzi *et al.*, 2003a).

Los retardantes del crecimiento se aplican en la producción agronómica y hortícola para reducir el crecimiento longitudinal sin menoscabo en la productividad. La mayoría de los retardantes de crecimiento son inhibidores de la biosíntesis de giberelinas entre algunos se encuentran el acymidol, paclobutrazol, flurprimidol, prohexadiona de calcio (Rademacher, 2000).

Los salicilatos forman un grupo de compuestos fenólicos que se caracterizan por ser compuestos aromáticos. Proceden de la ruta biosintética de los fenil-propanoides que a su vez proceden de la ruta del ácido shikímico (Reigosa *et al.*, 2003).

PACLOBUTRAZOL

Descripción y fórmula:

P.M.:283.80

Formula: C₁₅H₂₀ClN₃O

Actividad: Regulador del crecimiento (retardante)

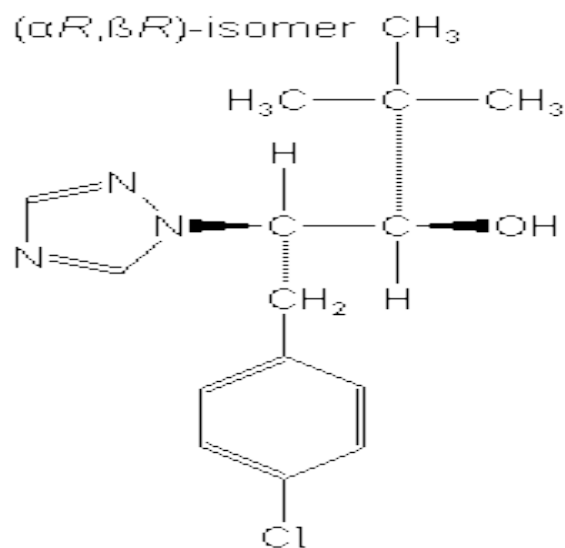


Fig. 1. Estructura molecular de Paclobutrazol

Propiedades biológicas: El paclobutrazol (PBZ) es un potente inhibidor de la síntesis de giberelinas perteneciente al grupo de triazoles bloquea las monoxigenasas dependientes del citocromo P450 inhibiendo la oxidación de *ent*-kaureno dentro del ciclo del ácido *ent*-kaurenoico; interviene también en la producción de esteroles y ácido abscísico (Rademacher, 2000). Los triazoles protegen a la planta de algunos estreses (sequía, temperaturas extremas, contaminación gaseosa (Gaspar *et al.*, 1996).

El PBZ induce cambios en el perfil de enzimas antioxidantes y aumenta su actividad especialmente la superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa en hojas, y glutatión reductasa en la raíz del maíz, acompañado con un incremento en la tolerancia al frío (Pinhero, *et al.*,

1997). Incrementa el uso eficiente de agua, vía una elevación de fotosíntesis neta sin cambios en la apertura estomática o transpiración. Esta respuesta puede ser explicada por una alta conductancia del mesófilo para el CO₂. (Catsky and Ticha 1982).

Aplicado externamente en cultivares de rosas, causa un incremento del 10% de las ceras epicuticulares y la proporción entre éstas (Jenks *et al.*, 2001).

La aplicación foliar en la etapa temprana de inicio del estolón de papa, el PBZ aumentó la formación de minitubérculos, sin embargo cuando se combina con kinetina la eficacia del PBZ disminuyó en un 13-20%. (Bandara *et al.*, 1995)

El problema de hiperhidracidad puede ser prevenido o reducido junto con el empleo de retardantes del crecimiento (Ziv 1991).

El PBZ aumentó los brotes en banano en medio (sólido y líquido estacionario) MS suplementado con 4 mg/l de BAP (Daquinta *et al.*, 2001). Promueve la formación de racimos compactos de tallos con un desarrollo deficiente en hojas de bromeláceas (Daquinta *et al.*, 2001b) Posee un efecto sinérgico con citocininas en aráceas ornamentales (Werbrouck y Debergh, 1996).

El uso de bioreactores de inmersión temporal con medio MS suplementado con PBZ promueve la excreción de compuestos fenólicos y formación de brotes en caña de azúcar (Lorenzo *et al.*, 1998, Lorenzo, *et al.*, 2001). El paclobutrazol promueve la proliferación de conglomerados de brotes de piña en medio MS suplementado con 2.1 mg/l de BA + 0.3 mg/l ANA + 1 mg/l paclobutrazol (Escalona *et al.*, 1999).

En *Pinus taeda*, *Pinus elliottii*, *Pseudotsuga menziessii* y *Picea abies* el paclobutrazol incrementó la producción de embriones somáticos en concentraciones de 0.25 mg/l a 3.0 mg/l (Pullman *et al.*, 2005).

El cultivo *in vitro* de *Allium cepa* con retardantes de crecimiento (ancymidol, PBZ y flurprimidol) a una concentración de 10 µM indujo la formación de bulbos y aumento el porcentaje de bulbilos. Con PBZ se incrementó el peso fresco en un 63% y se aumento el desarrollo de la raíz (Le *et al.*, 2002)

En plántulas de *Lilium* creciendo en medio de cultivo líquido, el efecto de retardantes del crecimiento (PBZ y ancymidol) fue evaluado. Se encontró un aumento significativo en el contenido de clorofila, ceras epicuticulares, peso seco, contenido de almidón en raíz, sin

embargo el área total de hoja y peso fresco solo tuvo un ligero incremento. El tratamiento con 3.4 μM PBZ fue el mejor (Thakur *et al.*, 2006).

PROHEXADIONA DE CALCIO

Descripción y fórmula:

P.M.:250.2

Fórmula empírica: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Ca}$

Actividad: Regulador de crecimiento (retardante)

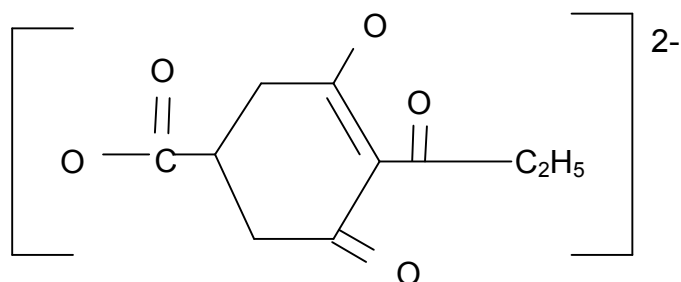


Fig. 2. Estructura molecular de Prohexadiona de Calcio

Propiedades biológicas: Protege contra infecciones bacteriales en plantas superiores (tomate, tabaco, rosas, manzana, pera, maíz) previene la reacción de hipersensibilidad (Bazzi, *et al.*, 2003b, Schlangen,*et al.*, 2003.). Prohexadiona de calcio induce luteoforol como principio activo con propiedades biocida no específicas. El luteoforol inicia el ataque al patógeno desde el compartimiento celular e inhibe el desarrollo de la enfermedad por destrucción de las células patógenas al igual que por inducción de una reacción de hipersensibilidad (Spinelli, *et al.*, 2005).

Reduce el crecimiento longitudinal del tallo por bloqueo de la dioxigenasa dependiente del ácido 2-oxoglutarico involucrada en la biosíntesis de las giberelinas.

Reduce el aborto de frutos jóvenes y la formación de yemas florales por inhibición de la enzima oxidasa-aminociclopropanocarboxilo que participa en la reacción catalizadora de producción de etileno. Modifica el espectro de los fenilpropanoides en las plantas tratadas. La prohexadiona de calcio bloquea las dioxigenasas dependientes de ácido 2-oxoglutarico en especial la flavonona 3-hidroxilasa, enzima clave en el metabolismo de los flavonoides en particular el luteoferol (Bazzi, *et al.*, 2003a). Los flavonoides presentan función de fitolalexinas (Rademacher y Kober, 2003).

La prohexadiona de calcio aumenta el total de carbohidratos no estructurales, la acumulación de nitrógeno y estimula la apertura estomática. Este último parámetro se asocia con una mayor asimilación de carbón (Guak *et al.*, 2001). También aumenta el nivel de ácido abscísico y citocininas (Grossman *et al.*, 1994)

Metabolismo de Prohexadiona:P-Ca en plantas superiores se degrada con un promedio de vida de pocas semanas. Después de la asimilación y el partimiento de su anillo ocurre naturalmente el ácido propanol, 2,3-tricarboxílico (ácido tricarbarílico) el cual es introducido al metabolismo de la planta. En los suelos el Prohexadiona de calcio se descompone en su mayor parte en dióxido de carbono, con una vida media menor a 7 días. En agua se degrada por fotólisis a dióxido de carbono y otros productos naturales. En la aplicación sobre follaje el transporte es acropétala a los puntos individuales de crecimiento. Los movimientos basipetálos son mínimos. (Evans y Regusci, 1997)

ACIDO SALICÍLICO

Descripción y fórmula:

P.M.:138.12

Fórmula:C₇H₆O₃

Actividad: Agente señalizador.

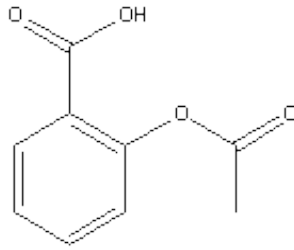


Fig. 3. Estructura molecular del Ácido Salicílico

Propiedades biológicas: El ácido salicílico (SA, *o*-hidroxibenzoico) y sus derivados (glicósidos de SA, ésteres de SA, glicósidos de ésteres de SA y otros derivados alcohol-salicílico) presentan respuestas que: a) inducen la floración en algunas plantas que requieren fotoperíodo largo; b) inducen la tuberización *in vitro*; c) inducen la regulación de termogénesis, d) son señalizadores sistémicos en la inducción de resistencia a enfermedades, e) inhiben la germinación y f) inhiben la biosíntesis de etileno. Como moléculas señal desencadenan el choque oxidativo que genera el H₂O₂ necesario para la actuación de las peroxidasas (POx) en la pared celular, que oxidan y polimerizan los compuestos fenólicos que dan lugar a los polímeros estructurales, ligninas y suberinas o bien los aminoácidos fenólicos de las glicoproteínas estructurales) provocando entrecruzamiento de las mismas con la red de polisacáridos de la pared (Ranskin, 1992, Rao *et al.*, 1997, Reigosa *et al.*, 2003).

La aplicación foliar de ácido salicílico a una concentración de 10µM en plantas de trigo promueve la tolerancia al frío por regulación de proteínas apoplásticas y aumento de la actividad de la catalasa apoplástica, peroxidasa y polifenol oxidasa (Tasqin *et al.*, 2006).

La aplicación de 200 µM de ácido salicílico en raíces de *Panax ginseng* cultivados en birreactores, aumento la acumulación de metabolitos ginsenósidos y la actividad de monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa, superóxido dismutasa, guaiacol peroxidasa, glutathion peroxidasa y glutathion reductasa (Ali *et al.*, 2006).

El ácido salicílico incrementó la producción de jaceosidina y siringina en cultivos celulares de *Saussurea medusa* y aumentó la actividad de las enzimas de la vía biosintética de los fenilpropanoides como la fenilalanina amonio liasa (Yu *et al.*, 2006).

ÁCIDO BENZOICO

Descripción y fórmula:

P.M.:122.12

Fórmula: C₇H₆O₂

Actividad. Agente señalizador.

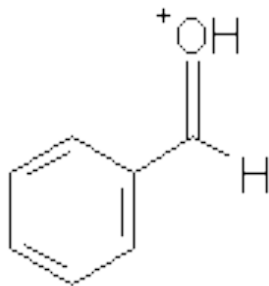


Fig. 4. estructura molecular del Ácido benzoico

Es derivado del ácido trans-cinámico que por una β -oxidación pasa a benzaldehído, que posteriormente se oxidara en ácido benzoico.

El ácido benzoico ha sido aplicado en tubérculo de papa con incremento en peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz. Al aplicarse foliarmente induce una mayor tuberización (Cabeza, 2001). En semilla de lechuga y betabel indujo mayor germinación y crecimiento (Santiago, 2002).

En la micropropagación de nogal se aplicó ácido benzoico junto con carbón activado en dosis de 10^{-4} se incrementó la cantidad de nudos (6), asimismo se logró una disminución por daño oxidativo (Rámirez, 2003).

Aspectos histológicos en cactáceas

En condiciones *in vitro* los vasos del xilema presentan una mayor variación en cuanto a área Fig 1. En un estudio comparativo entre plantas de crecimiento normal y plantas de crecimiento *in vitro* de *Turbincarpus valdezianus*, se encontró que existe una mayor variación del área en vitroplantas que en plantas normales. Otra característica importante en vitroplantas es que

presentan gran número de vasos, de mayor tamaño y con paredes delgadas Tabla 1. (Ramírez, *et al*, 2004).

El floema primario y secundario varía en cantidad entre las especies de cactáceas. Esta constituido por tubos cribados, células de compañía y parénquima axial y radial.

Tabla 1. Valores medios y área promedio (μm^2) de vasos de xilema del tallo de plantas de crecimiento normal y de desarrollo *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus*

Plantas de Crecimiento normal	Ancho de vasos Xilema (mm))	Largo de vasos Xilema (mm))	Área de vasos Xilema(mm^2)
1	32.067	31.893	803.239
2	29.467	29.293	677.939
3	28.860	27.473	622.728
4	30.420	29.033	693.661
5	31.980	31.633	794.537
6	30.073	29.553	698.038
Medias	30.478	29.813	715.024
Plantas de Crecimiento <i>in vitro</i>			
1	31.807	33.887	846.521
2	28.167	26.260	580.926
3	36.400	34.927	998.503
4	33.973	34.580	922.686
5	36.053	35.793	1013.534
6	29.987	34.840	820.535
Medias	32.731	33.381	863.784

El tejido parenquimatoso presenta una matriz no lignificada, con paredes celulares delgadas se encuentra en cactáceas globosas pequeñas, de tallos procumbentes o enterrados en la tierra como los géneros, *Pelechyphora*, *Turbinicarpus*, *Lophophora*. En el interior del parénquima se encuentran vasos de menor diámetro que los presentes en la madera fibrosa. Se presentan de disposición solitaria o en racimos de hasta 100 vasos (Tabla 2). Los vasos de la fibra parenquimatososa se encuentran en contacto con el agua almacenada y esta disposición ayuda a prevenir las embolias (Mauseth, 1993)

El tejido de traqueidas de bandas anchas está adaptado a ambientes xerófitos. Los vasos son semejantes a los presentes en el tejido parenquimatoso. Este tipo de tejido puede llegar a

formar anillos de crecimiento, y solo está presente en los géneros de *Ferocactus*, *Echinocactus*, *Gymnocalycium*, *Echinopsis* y otros.

Tabla 2.- Valores medios de características asociados con las formas de vida de Cactaceae

CACTOIDEAE	Diámetro vasos(μm)	Vasos/ mm²	Longitud del vaso (mm)	Longitud de la fibra(mm)
Plantas columnares	44	131	359	878
Plantas de altura media	33	296	291	683
Plantas Globosas	27	336	182	369

ACLIMATIZACION

Las características fisiológicas y anatómicas de las plantas obtenidas en recipientes con baja tasa de intercambio gaseoso hacen imprescindible realizar una aclimatación gradual al ambiente *ex vitro*, convirtiéndose esta parte del proceso, conjuntamente con el coste de producción, en el principal factor limitante de la micropropagación (Majada y Sánchez 2004)

La aclimatización es un proceso definido por el control de las condiciones ambientales *ex vitro* con el propósito de favorecer la supervivencia de los explantes. Durante la etapa de aclimatización se presenta una serie de ajustes a nivel genético, enzimático y morfológico cuyo propósito es proteger las actividades metabólicas citoplasmáticas esenciales para la supervivencia.

En la micropropagación convencional, frecuentemente el proceso de aclimatización consiste en:

- 1.- Colocar las plantas en condiciones de alta humedad relativa.
- 2.- Una gradual disminución de la humedad relativa y un incremento gradual de la intensidad de luz a través del tiempo (Preece y Sutter, 1991).

Otros factores de importancia son el tipo de sustrato y el control fitosanitario.

Sustratos

Un sustrato es un material sólido natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radical, desempeñando así una función de soporte para la planta, pudiendo intervenir o no en el proceso de nutrición mineral de la planta (Noguera y Abad, 1997).

Según Ruano (2003) las características idóneas de un sustrato comprenden 3 factores:

1. Factor Económico

- Costo
- Disponibilidad
- Continuidad
- Facilidad del mezclado
- Presentación

2.- Factores químicos

- Capacidad de intercambio catiónico
- Nivel de nutrientes
- pH
- Esterilidad
- Sales solubles

3.- Factores físicos

- Aireación
- Capacidad de almacenamiento de agua
- Tamaño de partículas
- Densidad
- Uniformidad

Las características necesarias de un buen sustrato serán aquellas que tengan la facultad de producir plantas sanas y de calidad, debe, en principio, presentar las cinco siguientes condiciones:

- pH ligeramente ácido
- Alta CIC
- Baja fertilidad intrínseca
- Alta capacidad de retención de agua

- Adecuado equilibrio de tamaño de poros.

En México, al igual que en muchos países, las mezclas de sustratos se obtienen tradicionalmente por el método de “ensayo y error”, es decir, se parte de una serie de materiales conocidos, se mezclan en distintas proporciones y se analizan los compuestos resultantes, seleccionando aquellos que tienen las características más adecuadas. El número de materiales es muy elevado, lo que resulta en numerosas muestras a analizar; si a esto añadimos optimizar el costo de los materiales, o maximizar la dosis de un determinado componente, resulta extremadamente complicado elaborar mezclas de sustratos(Requejo *et al.*,2007) La aplicación reciente de técnicas de programación lineal ha resultado efectiva para obtener las combinaciones teóricas cercanas al ideal con un bajo costo y que favorecen el aprovechamiento racional de subproductos agroindustriales con posibilidades de ser usados como sustratos agrícolas(Burés, 1997, Zamora, 2005).

Materiales usados para la elaboración de sustratos

Fibra de coco

La fibra de coco es un subproducto de la industria del coco que se encuentra disponible en grandes cantidades en los países productores de coco como México. La fibra de coco consiste en partículas de lignina y celulosa, con una relación C/N de 80. Aunque en general la fibra de coco puede utilizarse fresca, para algunos fibras de coco que presenta fototoxicidad en el material fresco es preferible el compostaje antes de su uso en mezcla para sustratos, debiéndose añadir nitrógeno en él. Este material inerte, de elevada capacidad de retención de agua, se ha utilizado tradicionalmente para mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos. La aplicación de fibra de coco mejora la retención de agua, aumenta la disponibilidad de nutrientes y aumenta la tasa de infiltración, la porosidad total y la conductividad hidráulica de los suelos. Tiene elevado contenido de potasio, por lo que puede ser utilizada como fuente de potasio en cultivo en campo. Tiene bajo contenido de nutrientes. Su pH varía entre 4.0 y 7.0, su conductividad puede variar entre 0.1 y 6.0 dS/m. procediendo la elevada salinidad del lavado o contacto con el agua de mar en las zonas de origen. Se han descrito problemas de exceso de cloro, sodio o potasio. El contenido de materia orgánica es del 85-95%. La capacidad de intercambio catiónico está entre los 20 y 30 meq/l. La porosidad total es superior

al 80% con aireación elevada. La densidad varía entre 50 y 100 kg de materia seca por M³ (Burés,1997)

La aplicación de polvo de coco como medio de cultivo en diferentes ensayos fue propuesta por Prasad (1997). Otra característica importante es que la fibra de coco no ocasiona problemas de anclaje en cultivos ornamentales anuales a pesar de tener baja densidad aparente. Si se mezcla con arena (1:1 v/v) este valor se incrementa, además de que se mejora la humectabilidad en más de 33% y se obtiene una porosidad de 23.7%. Cuando se emplean varios niveles de fibra es posible incrementar la porosidad de aire hasta 35% manteniendo en un nivel satisfactorio el agua fácilmente disponible. Esto significa que al haber un incremento brusco en la transpiración las plantas tendrán mayor agua disponible (Awang y Razi 1997)

Por su parte, Meerow (1994) realizó un ensayo en el cual evaluó el crecimiento de dos plantas ornamentales subtropicales comparando polvo de coco y turba, observando que el polvo de coco parece ser un sustituto aceptable para la turba de junco en sustratos para maceta y que es necesario ajustar los regímenes nutricionales de un cultivo a otro.

Tezontle

El tezontle es un mineral aluminosilicato de origen volcánico, es muy utilizado en México por su disponibilidad. Este material fue utilizado como testigo en un cultivo hidropónico en tres diferentes granulometrías (0.71-1; 1.01-2.00 y 2.01-3.36 mm). Las plantas cultivadas en granulometría fina y media tuvieron tamaños similares a la media cultivada en zeolitas, las plántulas establecidas en el tezontle de granulometría gruesa fueron de menor tamaño con respecto a dicha medida. (Urbina-Sánchez *et al.*, 2006).

El análisis microbiológico del tezontle mostró un contenido de 164.3×10^3 ufc (unidades formadoras de colonias) de bacterias, en hongos 13×10^1 ufc y 63×10^8 ufc de actinomicetos (Zamora, 2005).

Perlita

La perlita natural es una roca volcánica vítrea formada por enfriamiento rápido, constituido por material amorfo que contiene entre un 2 a un 5% de agua atrapada y que contiene una densidad aparente de unos 1500kg de materia seca por m³. Este mineral en su manipulación industrial se granula y se precalienta a 300-400°C y se vierte en hornos a 1000°C,

expandiéndose en el proceso para formar una espuma de densidad aproximada 120kg de materia seca por m³. La perlita expandida es un material casi inerte, que no se descompone biológica o químicamente, si bien se cita que a pH inferiores a 5 puede aparecer fototoxicidad por solubilización del aluminio. Su pH es neutro (6.5-7.2) aunque también puede alcanzar valore muy básicos, y la conductividad eléctrica es muy baja (0.01-0.12 dS/m). No tiene casi capacidad de intercambio catiónico. Las características de retención de agua y aireación dependen de la garnulometría, tomando su capacidad de aireación valores entre 0 y 70% y el contenido de agua fácilmente disponible hasta el 45% según la fracción granulométrica analizada. No contiene microorganismos, siendo completamente estéril por su proceso de obtención (Burnés, 1997)

**CONTROL DE HIPERHIDRICIDAD EN PLANTAS DE CULTIVO IN VITRO POR
PROMOTORES DE ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO EN *Turbinicarpus*
valdezianus (Möller) GL & F**

**CONTROL OF HIPERHYDRICITY IN TISSUE CULTURED PLANTLETS WITH
CHEMICAL PROMOTERS OF PHYSIOLOGICAL HARDINESS IN *Turbinicarpus*
valdezianus (Möller)GL & F**

**Hermila Trinidad García Osuna 1, Adalberto Benavides Mendoza*, Leticia Escobedo
Bocado, José Ángel Villarreal Quintanilla, Eladio Cornejo Oviedo**

1 Universidad Autónoma Agrario Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista,
Saltillo, Coahuila. CP. 23315. Tel.: 01 (844) 4 11 02 87. Correo electrónico
hgosuna@hotmail.com

* *Autor responsable*

RESUMEN

El Efecto de inhibidores de las giberelinas: paclobutrazol (PBZ) y prohexadiona de calcio (PCa), así como el ácido salicílico(AS) fue evaluado en la propagación de *Turbinicarpus valdezianus* Esta especie está en protección especial conforme a la norma vigente NOM-059-ECOL-2001.El objetivo fue disminuir la respuesta hiperhídrica de los brotes, la cual fue evaluada a las doce semanas. El tratamiento con PBZ ($3.4 \cdot 10^{-4}M$) disminuyó la hiperhidricidad en un 100% de los brotes e incrementó significativamente la organogénesis (18 brotes/explante). Los cambios morfológicos observados fueron: una disminución en la altura y engrosamiento del tallo y raíces. Los tratamientos con PCa($10^{-4}M$), AS($10^{-4}M$) generaron una mayor respuesta hiperhídrica relacionada con el estrés oxidativo, pero dieron lugar a modificaciones en el número y longitud de raíces en los brotes que favorecieron la sobrevivencia de la plántula a las condiciones *ex vitro*. El tratamiento con AB ($10^{-4}M$) presentó la mayor respuesta hiperhídrica con fenotipo característico. El análisis histológico de las plantas hiperhídricas mostró un incremento en el número de vasos del xilema, con mayor diámetro y área. El grosor de los vasos no fue significativo.

Palabras clave: *Turbinicarpus valdezianus*, hiperhidricidad, paclobutrazol, prohexadiona de calcio, ácido salicílico, ácido benzoico

SUMMARY

The effect of gibberellin inhibitors: paclobutrazol (PBZ), calcium prohexadione(PCa), salicylic acid(SA), and benzoic acid(BA) was evaluated in *Turbinicarpus valdezianus* propagation. This species is under special protection according to the current regulation NOM-059-ECOL-2001. The objective was to reduce shoot hyperhydric response, which was evaluated after 12 weeks. The treatment with PBZ (1 mgL^{-1}) reduced hyperhydricity in a 100% of all shoots and significantly increased organogenesis (18 shoots/explant). The observed morphological changes were height reduction and stem and root thickening. The treatments with Pca (10^{-4}M) and AS (10^{-4}M) generated a higher hyperhydric response related to oxidative stress, but caused modifications in root number and length that aided plantlet survival under *ex vitro* conditions. The treatment with AB (10^{-4}M) gave the strongest hyperhydric response with a characteristic phenotype. The histological analysis of the hyperhydric plants showed an increased number of xylem vessels with higher diameter and area. The vessel thickness did not increase significantly.

Key words: *Turbinicarpus valdezianus*, hiperhidricity, paclobutrazol, calcium prohexadione salicylic acid, benzoic acid.

INTRODUCCIÓN

La hiperhidricidad es un estado disfuncional presente en algunas plantas cultivadas *in vitro*. Entre otros factores se asocia con el estrés oxidativo (Chakrabarty *et al.*, 2006) y se caracteriza por presentar anomalías morfológicas, fisiológicas y anatómicas, esta condición se incrementa progresivamente a medida que los cultivos son mantenidos (Debergh *et al.*, 1992). Es un problema que llega a presentarse en plantas de cultivo *in vitro* que limitan su propagación y su posterior aclimatización *ex vitro* con una consecuente pérdida de un 60 hasta un 80% de la producción (Pâques, 1991).

Las cactáceas presentan tejidos que favorecen esta condición. La parte interna de la corteza presenta células de paredes delgadas y sin lignina, más delgadas que las paredes de empalizada, permitiendo rápidos cambios de volumen en la célula (Mauseth *et al.*, 1998). Bajo condiciones *in vitro*, la humedad relativa se mantiene al 100% y los explantes están en contacto directo con la toma de agua, las plantas que observan esta condición tienen una apariencia brillante, translúcida, con tallos frágiles y su morfología indica un exceso de contenido de agua. Una gran variedad de condiciones de cultivo en cactáceas se han evaluado para minimizar esta condición: modificaciones en el medio, MS a ½ de concentración, tipo de medio (B8), el uso de químicos polietilenglicol (Santos-Díaz *et al.*, 2003) sin embargo, aún no se han encontrado la solución adecuada, porque los requerimientos siempre van a ser especie dependiente.

La micropropagación del género *Turbinicarpus* se ha definido de ampliamente (Rosas *et al.*, 2001; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005)

La aplicación exógena de productos químicos como paclobutrazol en papa (Tsegaw *et al.*, 2005), favorece el crecimiento, al aumentar el grosor de las ceras epicuticulares, favorece la elongación y engrosamiento de epidermis, el aumento de las células de empalizada y mesófilo esponjoso, el incremento en el diámetro del tallo. En *Chrysanthemum* facilita la aclimatización de plantas obtenidas en recipientes no ventilados al mejorar el funcionamiento estomático (aperturas mínimas y máximas) e incrementar la cantidad de cera y clorofila por unidad de superficie foliar (Smith *et al.*, 1990a, b).

El Paclobutrazol (PBZ) es un inhibidor de la síntesis de ácido giberélico, cuya presencia reduce los niveles de giberelina endógena, lo cual se debe a que interactúa con las enzimas de tipo monooxigenasas del citocromo P450 ya que bloquea las oxidaciones de *ent*-kaureno a *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal y ácido *ent*-kaurénico dentro del ciclo del mevalonato lo cual resulta en una reducción de la síntesis de giberelinas y la elongación celular. El PBZ reduce la altura y aumenta el grosor del tallo y raíz de papa (Tsegaw *et al.*, 2005), incrementa el número de raíces en *Chrysanthemum* (Burrows *et al.*, 1992; Berova y Zlatev, 2000) y aumenta la proliferación de brotes en microplantas de aráceas (Werbrouck *et al.*, 1996).

La Prohexadiona de calcio (PCa) es un inhibidor de la síntesis de giberelina (Rademacher, 2000). La estructura de PCa es similar al ácido 2-oxoglutarico que es un co-substrato de las dioxigenasas que catalizan las etapas finales de formación de giberelinas por bloqueo de la 3- β hidroxilación, su aplicación exógena inhibe la formación de giberelinas altamente activas a partir de sus precursores inactivos. Incrementa asimismo los carbohidratos no estructurales, la acumulación de nitrógeno y estimula la apertura estomática aplicados *ex vitro* en árbol de manzana a una dosis de 250 ppm (Sabatini *et al.*, 2003).

Los salicilatos afectan el proceso fotosintético, la conductividad estomática y la transpiración (Khan *et al.*, 2003); dichos compuestos se sabe son señalizadores del estrés. Acido salicílico se aplica exógenamente se encuentra el incremento en la altura de la planta, estimulación de iniciación de raíces adventicias y retardante de la transpiración (Pancheva *et al.*, 1996).

El ácido benzoico (AB), es un regulador de la interacción de las plantas con su medio. Su vía biosintética no esta bien dilucidada pero se supone es precursor del AS. Se sintetiza a partir de fenilalanina por la combinación de varias vías metabólicas (Wildermuth, 2006).

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo disminuir la hiperhidricidad en *T. valdezianus* a partir de modificaciones ambientales *in vitro* por medio de la aplicación de promotores del endurecimiento fisiológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el año 2006. Se utilizaron plántulas de *Turbinicarpus valdezianus* germinadas *in vitro* en medio Murashige y Skoog (1962). Las plántulas obtenidas fueron subcultivadas en medio Murashige y Skoog (1962) cada cuatro semanas por cuatro ocasiones consecutivas. Las plántulas obtenidos en la etapa de establecimiento fueron seleccionadas conforme a tamaño (0.5 cm de diámetro y 0.8 cm de altura) sin brotes, ni síntomas de hiperhidricidad y se dividieron transversalmente para generar fragmentos cilíndricos a los cuales se les disectó el meristemo apical para favorecer la brotación. Los explantes se colocaron en frascos de vidrio de 60 ml de capacidad y se le agregó 20 ml de medio Murashige y Skoog (MS) suplementados con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol(SIGMA®, I-3011) , 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCL(SIGMA®,T-3906) , 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCL (SIGMA®,P-8666), 1 mg L⁻¹ Kinetina, 30 g L⁻¹(SIGMA®,K-0753) de sacarosa, 8 g L⁻¹de agar(SIGMA®,A-1296) ajustando a un pH de 5.7 y se esterilizó a 120° C

durante 15 minutos y se transfirieron al cuarto de incubación a una temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, con 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2500 lux. El medio se renovó cada cuatro semanas. Se estableció cada tratamiento con cinco repeticiones, cada repetición constó de un frasco de vidrio con cuatro explantes, conformando un total de 5 tratamientos: (T1) Testigo, (T2) PBZ, (T3) PCa, (T4) AS y (T5) AB. La concentración de PBZ fue de $3.4 \cdot 10^{-4}\text{M}$, y la de PCa(BASF®), AS(SIGMA®) y BA(SIGMA®) de 10^{-4}M . El experimento se repitió 3 veces. Las variables: número de brotes, peso fresco (g), peso seco(g), número de raíces y la longitud de raíces (cm). A las doce semanas de cultivo se determinó. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza bajo un diseño experimental completamente al azar y una comparación de medias de Tukey ($P\leq 0.05$) con el paquete SAS (SAS, 1989).

La caracterización histológica se realizó en el laboratorio de Citogenética. Se tomaron muestras de 3 plantas de cada tratamiento, se fijaron con F.A.A. y se deshidrataron con alcohol al 50, 60, 70 85 y 98% por dos horas se continuó con alcohol butílico terciario, alcohol butílico terciario más xilol en proporciones 3:1, alcohol butílico terciario más xilol en proporción 1:1, alcohol butílico terciario más xilol en proporción 1:3 y por último xilol puro por espacio de 2 horas en cada solución, la inclusión fue en parafina en la estufa de 30°C hasta 55°C . Posteriormente se realizaron los cortes en un microtomo de mano a 18 micras de espesor, pegados con adhesivo y calor, la coloración fue de safranina-verde rápido. Se montó con bálsamo de Canadá.

La evaluación histológica se basó en las observaciones de secciones transversales de las 6 mejores preparaciones con 12 cortes transversales de la parte media de la planta, se realizaron 15 mediciones de cada uno de los elementos anatómicos. Para la valoración se obtuvieron los valores promedio de los elementos de los vasos: área, grosor de la pared del vaso, a 40X de objetivo, mediante el software de Axion Vision. Sobre los datos obtenidos se realizó un

análisis de varianza bajo un diseño experimental completamente al azar y una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), con el paquete SAS (SAS, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos para las variables número de brotes y peso fresco; para la variable peso seco no mostró diferencia significativa (Cuadro 1). Se observó que el tratamiento con PBZ logró la disminución del número de brotes hiperhídricos hasta en un 100%, el número de raíces disminuyó, pero su longitud se incrementó. La respuesta del PBZ en la organogénesis se interpretó como un efecto sinérgico con la citocinina presente en el medio. El número de brotes fue mayor al observado en *T. valdezianus* por Dávila-Figueroa *et al.*, (2005). El tallo acortó su longitud y aumentó su grosor (Figura 1). El efecto de estimulación en la organogénesis de este retardante sobre *Ananas comosus* ya fue mencionada por Escalona *et al.*, (1999). Contrario a lo que se esperaba, los tratamientos de PCa, AS y AB incrementaron la respuesta hiperhídrica en los tratamientos de PCa, AS y AB podría estar relacionada con el estrés oxidativo por concentraciones supraóptimas, tal como se ha observado en otras especies *Panax ginseng* y *Zea mays* (Janda *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2006). Gribble (1999) afirma que la imposibilidad de transpirar es el factor más importante para provocar una respuesta hiperhídrica en los cultivos.

El tratamiento con PCa mostró una diferencia significativa con respecto a la variable peso fresco, disminuyendo el número de raíces y su longitud con respecto al testigo. El tallo fue de mayor longitud.

Los brotes cultivados en presencia de AS mostraron tallos con menor crecimiento longitudinal pero mayor grosor, una disminución de la organogénesis y un aumento significativo en la longitud de raíces. En especies como *Solanum tuberosum* (Mora-Herrera y López-Delgado, 2006) y *Sechium edule* (Alvarenga-Venutolo *et al.*, 2007) se observó una

inhibición del crecimiento de tallos y raíces en presencia de AS, sin embargo en el presente estudio se observó un incremento en el grosor y la longitud de las raíces lo que pudiera interpretarse como que la concentración de AS actuó como cofactor en el efecto de las auxinas endógenos (Bojarczuk y Jankiewicz, 1975).

El AB presentó una disminución en la organogénesis y una rizogénesis inhibida (Fig 1). El bajo porcentaje de enraizamiento está relacionado con el estado hiperhídrico de los explantes cultivados (Santos-Díaz *et al.*, 2003). La caracterización morfológica de *Turbinicarpus valdezianus* de hábito de crecimiento *in vitro* sin promotores del endurecimiento fisiológico presenta vasos agrupados con un diámetro promedio de 7.08 μm (4-11.43 μm), el área promedio de vaso fue de 44.48 μm^2 , la frecuencia de vasos por mm^2 (Cuadro 2) Las plántulas con hiperhidricidad presentaron vasos del xilema más grandes, con más variación de tamaños entre plantas, en todas direcciones y gran número de vasos, el grosor de sus paredes no presentan diferencias significativas (Fig.2).

El PBZ disminuyó totalmente la formación de brotes hiperhídricos en *T. valdezianus*. Los resultados obtenidos mejoran las características morfológicas de los explantes. Por su parte la PCa, AS y AB incrementaron la hiperhidricidad. Sin embargo, el tratamiento con PCa y AS dió lugar a la rizogénesis en los brotes que favorecieron la sobrevivencia de la planta a las condiciones *ex vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarenga-Venutolo S, A Abdetnour-Esquivel, V Villalobos-Aránbula (2007) Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). Agronomía Mesoamericana 18(1): 65-73.

Ali M B, Y K W Yu, E J Hahn, K Y Peak (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosids accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. Plant Cell Report 25(6): 613-620

- Berova M, Z Zlatev (2000) Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill) Plant Growth Regulation 31. 370- 375.
- Bojarczuk K, LS Jankiewicz (1975) Rooting of *Syringa vulgaris* L softwood cuttings using auxina, vitamins, phenolic substances, indole, SADH and abscisic acid. Acta Agrobot. 28: 229-239.
- Burrows G E, T S Boag, W P Stewart (1992) Change in leaf, stem and root anatomy of chrysanthemum cv. Lillian Hoek following paclobutrazol application. Journal Plant Growth Regulator 11: 189-194.
- Chakrabarty D, S Y Park, M B Ali, K S Shin, K Y Pack (2006) Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. Tree Physiology 26(3): 377-388.
- Escalona M, J C Lorenzo , B González, M Daquinta, J L González, Y Desjardins (1999) Pineapple (*Ananas cosmosus* L Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports 18: 743-748.
- Davila- Figueroa CA, MDL De la Rosa-Carrillo, E Pérez-Molphe-Balch (2005) *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbnicarpus* (Cactaceae) In vitro Cellular and Development Biology-Plant 41(4):540-545.
- Debergh, P, JAitken-Chistie, D Cohen, B Grout, S von Arnold, TW Zimmermann, M Ziv.(1992) Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture.30:135-140.
- Gribble K (1999) The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. Plant Growth Regulation 27:179-188.
- Janda T, G Salía, Z Antunovics, E Horváth, E Páldi (2000) Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. Maydica 45:29-33.

Khan W, B Prithiviraj, D L Smith (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology* 160(5):485-492.

Mauseth JD, BJ Plemons-Ropdríguez (1998) Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: A study of nine evolutionary lines in Cactaceae. *American Journal of Botany* 85: 209-218.

Mora-Herrera ME, H López-Delgado(2006) Tolerancia a bajas temperaturas inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(2):81-85.

Pancheva T V, L P Popova, A N Uzunova (1996) Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal Plant Physiology* 149: 57–63.

Pâques M (1991) Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Horticulturae* 283-290.

Rademacher W (2000) Growth retardants: effects on gibberellins biosynthesis an other metabolic pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*.51:501-531.

Rosas MM, MAM De la Rosa, KM Goldammer, VM Chávez-Avila (2001) Micropropagation of *Turbiniacarpus laui* glas et foster an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Develoment Biology-Plant* 37(3):400-404.

Santos-Díaz M S, R Méndez-Ontiveros, A Arredondo-Gómez, M L Santos-Díaz (2003) *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae) *In vitro Celular and Developmental Biology* 39(5): 480-484.

Sabatini, E. M Noferini, G Fiori, L Corelli Grapadelli, G. Costa (2003). Prohexadione-Ca positively affects gas exchanges and chlorophyll content of apple and pear trees. *Europ.J.HortScie.*, 68(3) 123-128.

Smith E F, A V Roberts J Mottley S Denness (1991a) The preparation of *in vitro* *Chrysanthemum* for transplantation to soil. 3 Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. Plant Cell Tissue and Organ Culture 21:141-145.

Sabatini, E. M Noferini, G Fiori, L Corelli Grapadelli, G. Costa (2003). Prohexadione-Ca positively affects gas exchanges and chlorophyll content of apple and pear trees. Europ.J.HortScie., 68(3) 123-128.

Smith E F, A V Roberts, J Mottley (1991b) The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil.4.The effects of eleven growth retardants on wilting. Plant Cell Tissue and Organ Culture 21: 309-313.

Tsegaw T, S Hammes, J Robbertse (2005) Paclobutrazol-induce leaf, stem and root anatomical modifications in potato. HortScience 40(5):1343-1346.

Werbrouck O, P Debergh (1996) Imizadole funguicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induce adventitious shoot proliferation in araceas. Plant Growth Regulation 15:81-85.

Wildermuth M C (2006) Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. Current Opinion in Plant Biology 9(3): 288-296.

Cuadro 1. Efecto de los niveles de promotores del endurecimiento fisiológico sobre los explantes de *Turbinicarpus valdezianus* registrados a las doce semanas de siembra.

Tratamiento	No. de			No. de raíces	Longitud de raíz(cm)
	brotos	P.fresco(mg)	P.seco(mg)		
Testigo	3.55b*	0.19ab	0.01a	4.6a	0.30c
Paclobutrazol(1 mgL ⁻¹)	18.00a	0.21ab	0.07a	1.4b	0.67b
Prohexadiona de calcio(10 ⁻⁴ M)	3.25b	0.26a	0.07a	1.6b	0.34c
Ácido salicílico (10 ⁻⁴ M)	1.15b	0.15b	0.01a	2.2b	0.81a
Ácido benzoico(10 ⁻⁴ M)	1.20b	0.17ab	0.01a	0.4b	0.02d

*Valores con la misma letra dentro del factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a

un P≤0.05 de significancia.

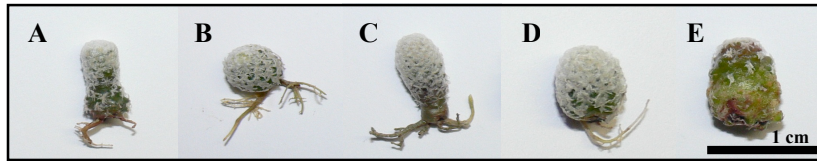


Figura 1. Morfología de las plantas de *Turbinicarpus valdezianus* en los diferentes tratamientos: (A) testigo, (B) paclobutrazol ($3.4 \cdot 10^{-4}M$), (C) prohexadiona de calcio ($10^{-4}M$), (D) ácido salicílico ($10^{-4}M$) y (E) ácido benzoico ($10^{-4}M$) a las doce semanas

Cuadro 2. Observaciones histológicas del xilema en plantas de *T. valdezianus* propagadas *in vitro* tratadas con promotores del endurecimiento fisiológico.

Tratamiento	Diámetro	Área promedio	Grosor	No.
	vasos	vasos xilema	vasos de	promedio
	xilema(μm)	(μm^2)	xilema(μm)	vasos
Testigo	7.088b	44.48b	2.00a	97.2b
P.hiperhidratadas	17.86a	234.82a	2.14a	212.1a

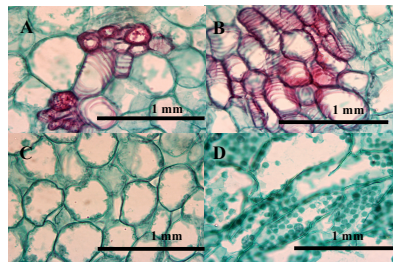


Fig 2. Corte histológico de plantas de *Turbinicarpus valdezianu* scon el objetivo de 40 X de cultivo *in vitro* observadas en plantas control (A y C) y plantas con hiperhidricidad (B y D) donde se observa la diferencia del tamaño de los haces y células del mesófilo.

**CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE PLANTAS DE CULTIVO IN VITRO
TRATADAS CON PROMOTORES DEL ENDURECIMIENTO FISIOLÓGICO EN
Turbinicarpus valdezianus (Moller) GL & F**

**ANATOMICAL CHARACTERISTICS OF IN VITRO PLANTS WITH PROMOTERS
TO PHYSIOLOGIC HARDENESS IN *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) GL & F**

**Hermila Trinidad García Osuna 1, Adalberto Benavides Mendoza*, Francisca Ramírez
Godina, José Ángel Villarreal Quintanilla, Eladio Cornejo Oviedo**

1 Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista,
Saltillo, Coahuila. CP. 23315. Tel.: 01 (844) 4 11 02 87. Correo electrónico
hgosuna@hotmail.com

* *Autor responsable*

RESUMEN

El protocolo de micropropagación para *Turbinicarpus valdezianus* fue definida con reguladores de crecimiento, sin embargo en la etapa de aclimatización los promedios de supervivencia fueron bajos. Por lo tanto se establecieron nuevos tratamientos con promotores del endurecimiento fisiológico. En el presente trabajo se compara las modificaciones anatómicas del tallo bajo los tratamientos con paclobutrazol (PBZ $3.4 \cdot 10^{-4}M$), prohexadiona de calcio (PCa $10^{-4}M$), ácido salicílico (AS $10^{-4}M$) y ácido benzoico (AB $10^{-4}M$). Los caracteres diagnósticos para el tallo fueron; diámetro de vasos, área de vasos, grosor de la pared, frecuencia de vasos por mm^2 e índice de vulnerabilidad. Se encontraron diferencias significativas en el desarrollo del sistema vascular.

Palabras clave: características anatómicas, hiperhidricidad, *Turbinicarpus valdezianus*, xilema.

SUMMARY

The micropropagation protocols of *Turbinicarpus valdezianus* were whit plant growth regulators however the survival rates resulting low in the acclimatization stage between the treated. Then the effects with promoters to physiologic hardening were studied. This article compares stem anatomy of treated with paclobutrazol (PBZ $3.4 \cdot 10^{-4}M$), prohexadione-Ca(PCa $10^{-4}M$), salicylic acid (SA $10^{-4}M$) and benzoic acid(BA $10^{-4}M$). In stem the diagnostic character were measured found: the vessel diameter, area vessel thickness wall, vessels frequency for mm^2 , and vulnerability index. Significant differences in vascular system development were found.

Key words: anatomical characteristics, hyperhydricity, *Turbinicarpus valdezianus*, xylema.

INTRODUCCIÓN

Turbinicarpus valdeziannus es una cactácea incluida en el CITES y en la NOM-ECOL-059-2001 como una especie con protección especial.

Es una planta de hábitos xeromórficos, sus tejidos están especializados para almacenar agua en la época de lluvias, las fibras de sus paredes celulares son delgadas, lo cual le permite incrementar el volumen. El transporte de agua ocurre en vasos solitarios o agrupados de 2 a 10. Los vasos en la subfamilia Cactodeae en plantas de tallo corto y globoso son delgados normalmente con un lumen de 10 a 60 micras de diámetro (Nobel, 1999), con una media de 27 μm , el número de vasos por mm^2 es de 336 (Gibson, 1973).

A favor de su conservación se han utilizado para su propagación técnicas convencionales y de micropropagación.

Las características anatómicas de las plantas cultivadas *in vitro* difieren a las cultivadas en campo o invernadero.

La respuesta del explante cultivado *in vitro* está relacionado con el flujo de agua en los recipientes. Las variaciones en la concentración de vapor de agua, afectan directamente a la transpiración, la conductancia estomática, el potencial hídrico en el xilema del tallo y hojas y como consecuencia la absorción de agua y nutrientes. Esto genera el desarrollo de un fenotipo con reducción de las ceras epicuticulares, poco desarrollo de la cutícula, anomalía morfológica de los estomas, hay una reducción de las capas de células en empalizada, semejando a las del mesófilo esponjoso con numerosos espacios de aire, reducción de fibras del xilema y floema (Acram, 1996). Estas diferencias afectan los promedios de supervivencia en la etapa de aclimatización.

Una anomalía presente con relativa frecuencia de la estructura y función de las plantas micropropagadas es la hiperhidricidad. Los cultivos que manifiestan este proceso presentan una morfología que indica exceso de contenido en agua. En manzana, las hojas hiperhídricas

presentan un desarrollo discontinuo de la epidermis y cutícula, la lámina está engrosada, hay poca diferenciación entre el mesófilo en empalizada y el esponjoso (Chakrabarty *et al.*, 2006). Estas características hacen imprescindible una aclimatización gradual al ambiente *ex vitro*.

El empleo de osmoreguladores, reguladores del crecimiento e inductores químicos se han utilizado para mejorar las condiciones ecofisiológicas *in vitro* y su incidencia en el desarrollo de las plántulas bajo condiciones *ex vitro* (Smith *et al.*, 1990; Santos-Díaz *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2005).

Dependiendo de la especie de la planta y la concentración aplicada de promotores la respuesta morfológica varía.

El tratamiento con paclobutrazol disminuye la longitud del tallo e incrementa la floración en pera (Asin *et al.*, 2007). El incremento en el diámetro del tallo en papa se debe a el engrosamiento de la corteza, aumento del tamaño de los paquetes vasculares y un ensanchamiento del la médula por alargamiento de las células medulares. (Tsegaw *et al.*, 2005).

Prohexadiona de calcio es un retardante del crecimiento empleado para acortar el crecimiento vegetativo en cacahuate (Beam *et al.*, 2002), actúa como bactericida, fungicida e insecticida (Bassi *et al.*, 2003), sin embargo su aplicación en cultivos *in vitro* es poco conocida.

Mora-Herrera y López-Delgado (2004) mencionan que en microplantas de papa se observó una inhibición en el crecimiento de tallos y raíces a una concentración de 0.1 mM de ácido salicílico.

Kaur *et al.*, (2005) menciona que la aplicación de ácido benzoico al suelo suprime el crecimiento de la raíz de un 30.5-81.1% según la concentración aplicada.

La información acerca de las modificaciones anatómicas de los explantes con el uso de promotores del endurecimiento fisiológico es escasa.

El objetivo del presente trabajo es conocer las condicionantes para elevar el por ciento de supervivencia en la fase de aclimatización, al documentar las modificaciones anatómicas con el empleo de promotores del endurecimiento fisiológico en vitroplantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

El material vegetativo consistió en plántulas de *Turbinicarpus valdezianus* de cultivo *in vitro* de seis meses de edad y que fueron tratadas bajo diferentes promotores del endurecimiento fisiológico: T (0) testigo, T(1): paclobutrazo(PBZ 3.410^{-4} M), T(2):prohexadiona de calcio(PCa 10^{-4} M), T(3): ácido salicílico(AS 10^{-4} M), T(4): ácido benzoico(AB 10^{-4} M). Se tomaron muestras de 3 plantas de cada tratamiento, se fijaron con F.A.A. y se deshidrataron con alcohol al 50, 60, 70 85 y 98% por dos horas se continuó con alcohol butílico terciario, alcohol butílico terciario más xilol en proporciones 3:1, alcohol butílico terciario más xilol en proporción 1:1, alcohol butílico terciario más xilol en proporción 1:3 y por último xilol puro por espacio de 2 horas en cada solución, la inclusión fue en parafina en la estufa de 30° C hasta 55° C. Posteriormente se realizaron los cortes en un microtomo de mano a 18 micras de espesor, pegados con adhesivo y calor, la coloración fue de safranina-verde rápido. Se montó con bálsamo de Canadá.

La caracterización histológica se basó en las observaciones de secciones transversales de las 6 mejores preparaciones con 12 cortes transversales de la parte media de la planta, se

realizaron 15 mediciones de cada uno de los elementos anatómicos. Para la valoración se obtuvieron los valores promedio de los elementos de los vasos: diámetro, área, grosor de la pared del vaso, densidad (número de vasos·mm²) a 40X de objetivo, mediante el software de Axion Vision. Se determinó además el índice de vulnerabilidad.

El cálculo del índice de vulnerabilidad (IV) se determinó utilizando la siguiente fórmula de Carlquist (1977):

$$IV = \text{Diámetro de vasos} / \text{No de vasos por mm}^{-2}.$$

Sobre los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza bajo un diseño experimental completamente al azar y una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta fenotípica bajo condiciones *in vitro* las plantas presentan una mayor disponibilidad de agua

Turbinicarpus valdezianus de hábito de crecimiento *in vitro* sin promotores del endurecimiento fisiológico presenta vasos agrupados con un diámetro promedio de 7.08 μm (4-11.43 μm), el área promedio de vaso fue de 44.48 μm^2 (Cuadro 1), estos valores son menores a los rangos establecidos por Gibson (1977) para la subfamilia Cactoideae de tallos cortos y globosos de hábitat natural donde el diámetro promedio es de 27 μm y el número de vasos por mm² es de 196 para traqueidas de banda ancha.

Cuadro 1. Observaciones histológicas del xilema en vitroplantas de *T. valdezianus* tratadas con promotores del endurecimiento fisiológico.

Tratamiento	Diámetro de vasos de xilema(μm)	Área promedio de vasos de xilema (μm^2)	Grosor de vasos de xilema(μm)	Número promedio de vasos por mm^2	IV
Testigo	7.088b	44.48b	2.00bc	9.72bc	0.68
Paclobutrazol	6.37b	33.89b	2.90ab	19.86ba	0.38
Prohexadiona de calcio	8.54b	50.32b	3.62a	7.6c	1.18
Ácido salicílico	12.59ab	75.77b	1.54c	29.66a	0.43
Ácido benzoico	17.86a	234.82a	2.14bc	21.21a	0.88

Valores con la misma letra dentro del factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a un $P \leq 0.05$ de significancia

Las plantas tratadas con Paclobutrazol presentaron vasos conductores agrupados de tamaño uniforme y con valores promedio de diámetro de 6.37 μm (4.29-11 μm) y de área 33.89 μm^2 . El grosor de la pared del xilema es de 2.9 μm (Figura 1). Estos valores se encuentran estadísticamente iguales al control.

El tratamiento con PCa, presentó vasos aislados, en paquete y en todas direcciones. Presentó el valor más alto de índice de vulnerabilidad y de grosor de la pared del vaso. Según algunos autores el grosor de las paredes de vasos de xilema esta relacionado con la mayor seguridad en la conducción de agua, así el tejido de resistencia está dado por las traqueidas. Las traqueidas de banda ancha están presentes en casi todas las plántulas de los cactus. En el

estado adulto solo se observan en cactáceas de tallo corto y globoso. Esta parece ser una característica adaptativa para hábitats xéricos (Terrazas y Mauseth, 2002)

Con ácido salicílico las características anatómicas de *T. valdezianus* presenta vasos agrupados con un incremento en el diámetro promedio de los vasos $12.59 \mu\text{m}$ ($7.72\text{-}30.14 \mu\text{m}$) y área promedio $75.77 \mu\text{m}^2$, con respecto al testigo. En observación microscópica a 10X se encuentra un sistema vascular bien desarrollado en comparación con los anteriores tratamientos (Fig 2)

El tratamiento con ácido benzoico alteró la anatomía de los vasos del xilema. Aumentó el diámetro y el área de los vasos y se incremento el número de vasos por mm^2 con respecto al testigo.

Se observa una gradación en cuanto a los diámetros en los diferentes tratamientos. El manejo con retardantes del crecimiento (PBZ y PCa) permite se conserven las características anatómicas presentes en el control. No presentan modificaciones anatómicas relacionadas con hiperhidricidad. En el caso de los tratamientos con retardantes y ácido salicílico el sistema radicular se encontró bien desarrollado por lo que coincide con lo expresado por Apóstolo *et al.*, (2005) en un estudio anatómico comparativo de *Cynera scolymus* en las diferentes etapas del cultivo *in vitro* donde demuestra que la etapa de diferenciación de raíz es donde se desarrollan los haces vasculares y favorece la etapa de aclimatización al aumentar la supervivencia de plantas. En el caso de ácido benzoico el sistema radicular se esbozaba, sin embargo se observó un sistema vascular uniforme

En todos los tratamientos se observa un diámetro de vasos de xilema dentro de los parámetros definidos para plantas de ambientes xerófitos estos valores podrían estar condicionados por la etapa de desarrollo de la plántula. Holste *et al.*, (2006) mencionan que los diámetros tienden a ser reducidos en condiciones de baja humedad.

El índice de vulnerabilidad utilizado para vegetación natural no refleja en este estudio un parámetro que pronostique los promedios de supervivencia en condiciones *ex vitro*.

CONCLUSIONES

Los tratamientos con retardantes presentan características morfológicas que favorecen la supervivencia de las plántulas de *Turbinicarpus valezianus* en condiciones *ex vitro*. El tratamiento con salicilatos manifiestan un aumento en el tamaño de vasos de xilema y disminución en el grosor de sus paredes. En el caso de ácido salicílico se observa un sistema vascular bien desarrollado que favorece su aclimatización, mientras que en el caso de ácido benzoico el sistema vascular no alcanza ese desarrollo lo que condiciona sus promedios de supervivencia en la etapa de aclimatización.

BIBLIOGRAFIA

Asin L, S Alegre, M Ramon (2007) Effect of paclobutrazol, prohexadione-Ca, deficit irrigation, summer pruning and root pruning on shoot growth, yield and return bloom in a “Blanquilla” pear orchard. *Scientia Horticulturae* 113(2): 142-148.

Acram M T, R R Williams, W H Sheather (1996) Comparative anatomy of four rare Australian plants grown *in vitro*. *Botanic Gardens Micropropagation News* 2(2).

Apóstlo N M, C B Brutti, B E Llorente (2005) Leaf anatomy of *Cynera scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41(3):307-313.

Bazzi, C. Messina, L. Tortoreto, F, Stefani, E., Bini, F. Brunelli, A., Andreotti, C. Sabatini, E., Spinelli, F. Costa, G., Hauptmann, G., Doerr, S., Marr, J. y W. Rademancher (2003) Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *European Journal of Horticultural Science* 68(3) 108-114.

Chakrabarty D, S Y Park, M B Ali, K S Shin, K Y Pack (2006) Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology* 26(3): 377-388.

Carlquist S (1977) Ecological factors in wood evolution. A floristic approach. *American Journal of Botany* 64(7): 887-896.

Gibson A C (1973) Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). *Biotropica* 5: 29-65.

Holste E K, M J Jerke, S L Matzner (2006) Long-term acclimatization of hydraulic properties, xylem conduit size, wall strength and cavitation resistance in *Phaseolus vulgaris* in response to different environmental effects. *Plant Cell Environmental* 29(5): 836-843

Kaur H, Inderjit, S Kaushik (2005) Cellular evidence of allelopathic of benzoic acid to mustard (*Brassica juncea* L) seedling growth. *Plant Physiology Biochemistry* 43(1):77-81.

Luan, Le Q., Ha, V.T. Nagasawa, N., Kume, T. Yoshii, F. and T.M. Nakanishi. 2005. Biological effect of irradiated chitosan on plants in vitro. *Biotechnology Application Biochemistry* 41(1):49-57.

Mauseth J D, B J Plemons-Rodríguez (1998) Evolution of extreme xeromorphic characters in wood: a study of nine evolutionary lines in Cactaceae. *American Journal of Botany* 85: 209-218.

Mora-Herrera M E, H López-Delgado (2006) Tolerancia a bajas temperature inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(2): 81-85.

Nobel P S (1999) *Physicochemical and environmental plant physiology* 2nd ed Academic Press, San Diego, California.

Reyes-Santamaría I, T Terrazas A F Barrientos-Priego, C Trejo (2002) Xylem conductivity and vulnerability in cultivars and races of avocado *Scientia Horticultural* 92:97-105.

Ross-Kartens G S, G Ebert P Ludders (1998) Influence of in vitro growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4(1):21-27.

Santos-Díaz M S, R Méndez-Ontiveros, A Arredondo-Gómez, M L Santos-Díaz (2003) In vitro organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae) *In vitro Cellular and Developmental Biology* 39(5): 480-484.

Smith E F, A V Roberts, J Mottley (1990) The preparation in vitro of Chrysanthemum for transplantation to soil. 4 The effects of eleven growth retardants on wilting. *Plant Cell Organ Tissue Culture* 27:309-313.

Terrazas T y J D Mauseth (2002) Shoot anatomy and morphology: *In: Cacti Biology and uses*. P S Nobel (eds) University of California Press, London England. pp 23-40.

Yokota S, Md Z Karim, M A K Azad, Md M Rahman, J Eizawa, Y Saito, F Ishiguri, K Lizuka S Yahara N Yoshizawa (2007) Histological observation of change in leaf structure during successive micropropagation stages in *Aralia elata* and *Phellodendron amurense*. *Plant Biotechnology* 24:211-226.

Cuadro 1. Observaciones histológicas del xilema en vitroplantas de *T. valdezianus* tartadas con promotores del endurecimiento fisiológico.

Tratamiento	Diámetro de vasos de xilema(μm)	Área promedio de vasos de xilema (μm^2)	Grosor de vasos de xilema(μm)	Número promedio de vasos por mm^2	IV
Testigo	7.088b	44.48b	2.00bc	9.72bc	0.68
Paclobutrazol	6.37b	33.89b	2.90ab	19.86ba	0.38
Prohexadiona de calcio	8.54b	50.32b	3.62a	7.6c	1.18
Ácido salicílico	12.59ab	75.77b	1.54c	29.66a	0.43
Ácido benzoico	17.86a	234.82a	2.14bc	21.21a	0.88

Valores con la misma letra dentro del factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a un $P \leq 0.05$ de significancia

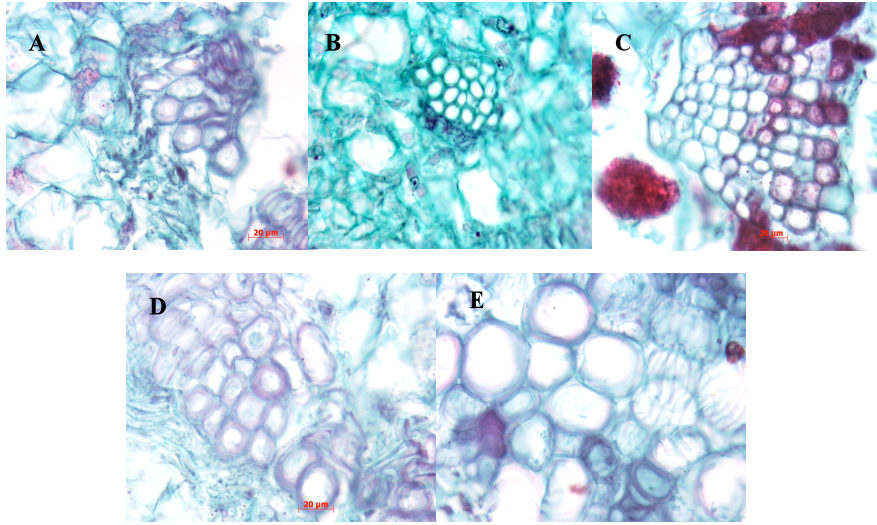


Fig 1 Sección transversal de tallo de *T. valdezianus* bajo diferentes tratamientos *in vitro* (A) Testigo; (B) PBZ(3.410⁻⁴M); (C) Pca(10⁻⁴M); (D) AS(10⁻⁴M) y (E) AB(10⁻⁴M) a 40X

**MANEJO DE SOLUCIÓN NUTRITIVA Y SUSTRATOS EN LA ACLIMATIZACIÓN
DE *Turbinicarpus valdezianus* (MOLLER)
GL & F PROPAGADA *IN VITRO*.**

**NUTRIENT SOLUTION AND SUBSTRATES MANAGEMENT IN THE
ACCLIMATIZATION OF *Turbinicarpus valdezianus* (MOLLER) GL & F IN
PROPAGATION *IN VITRO***

**Hermila Trinidad García Osuna, Adalberto Benavides Mendoza*, Ricardo Requejo
López, José Ángel Villarreal Quintanilla, Eladio Cornejo Oviedo**

1 Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista,
Saltillo, Coahuila. CP. 23315. Tel.: 01 (844) 4 11 02 87. Correo electrónico

hgosuna@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento y por ciento de supervivencia de *Turbinicarpus valdezianus* en etapa de aclimatización con tres sustratos y cuatro soluciones nutritivas, los sustratos: peat moss, perlita aserrín de coco y tezontle fueron caracterizados en sus propiedades físicas: espacio poroso total(EPT), retención de agua(RA), materia orgánica (MO), la función objetivo fue minimizar costo y las propiedades finales del la mezcla balance de volúmenes EPT, RA y MO fueron las restricciones del modelo lineal. Se obtuvieron tres mezclas. Se eligió un fertilizante comercial con tres concentraciones y MS a mitad de su concentración como control. Los resultados fueron significativos para solución y sustrato. El mejor sustrato fue la mezcla de 19.92% tezontle, 28.97% perlita y 51.11% aserrín de coco; la mejor solución fue la concentración al 66% de Bayfol®

Palabras clave: mezclas de sustratos, programación lineal, *Turbinicarpus valdezianus*

SUMMARY

The effect of four substrates and four nutrient solutions (NS) were evaluated in stage of acclimatization of *Turbinicarpus valdezianus* specie which is considered special protection within NOM-059-ECOL-2001. The substrates: peat moss, perlite, coconut sawdust and tezontle were characterization to the physic properties: total porous space (EPT), water retention (RA) and organic material (MO) of the sample, the balance of volumes between EPT RA and MO were defined as well as the restrictions of lineal model. Tree mixes formulations were obtained. and four nutrient solutions were selected. The results were significant for substrates and solutions The most mixes was of 19.92% tezontle, 28.97% perlite and 51.11% coconut sawdust; the most solution was the concentration a 66% of Bayfol®.

Key Works: *Mixes formulation, Turbinicarpus valdezianus,*

INTRODUCCIÓN

La aclimatización es un proceso controlado de los factores ambientales que favorece la supervivencia de las plantas cultivadas *in vitro* a condiciones donde se desarrollarán para su cultivo.

Las variables de flujo de materia y energía dentro de un sistema *in vitro* corresponden a las condiciones de heterotrofia, al flujo de fotones y radiación térmica bajos, potencial hídrico y tasa de difusión bajos lo que lleva a una tasa de transpiración baja, tasa fotosintética baja, elevada respiración en oscuridad, balance negativo de CO₂, tasa baja de absorción de agua bajo condiciones asépticas. Las condiciones *ex vitro* exigen un estado de autotrofia, un control de la transpiración con una eliminación gradual de humedad relativa, un aumento gradual de flujo de fotones y un control fitosanitario.

La aclimatización puede darse bajo dos condiciones: *in vitro* y *ex vitro*. Durante las condiciones *in vitro* el manejo de promotores del endurecimiento fisiológico favorecen modificaciones anatómicas que garantizan la supervivencia de las plántulas al ser transferidas a condiciones *ex vitro*. El empleo de los promotores aumentan el grosor de las células guarda y la cantidad de ceras epicuticulares, disminuyen el tamaño de la hoja, tallo, incrementan el desarrollo del sistema vascular y favorecen en crecimiento una vez que las condiciones de estrés han sido minimizadas AS, PC, PCa. Los cambios estructurales necesarios para una

apropiada aclimatización están en un buen desarrollo del sistema vascular (Apóstolo *et al.* 2005) lo que va a condicionar la calidad final de la planta al mejorar la toma de agua y nutrientes (Yokota *et al.*, 2007). El enraizamiento puede realizarse *in vitro* en dos fases por inducción –con el uso de auxinas- o expresión -sin reguladores- o una fase *in vitro* con estímulo con regulador y una expresión *ex vitro* (Majada y Sánchez-Tamés, 2004)

Dentro de un protocolo de aclimatización la selección del sustrato condiciona la calidad de la planta al ejercer influencia en la arquitectura del sistema radical y en las asociaciones biológicas de este con el suelo, afectando el estado nutricional y la traslocación de agua en el sistema suelo-planta atmósfera (Vilchez *et al.*2007).

Dentro de los factores condicionantes para seleccionar un sustrato está su disponibilidad, su costo, facilidad de manejo, ausencia de semillas de malas hierbas, insectos o patógenos, ausencia de fototoxicidad, capacidad de ser reciclados, optimización en el consumo de agua y prevención de lixiviación de nutrientes (Burés, 1999; De Rezende *et al.*2000). Cuando se opta por un medio con agregado se deben considerar

El tezontle es un mineral alumino-silicato de origen volcánico es muy utilizado por su disponibilidad. La perlita es otro mineral de origen volcánico, su peso específico es de 0.08 a 0.13 g cm⁻³; diámetro de 2-4 mm, la capacidad de retención de agua es de tres a cuatro veces su peso, no tiene capacidad para amortiguar el pH.

En la etapa de aclimatización el manejo de la técnica hidropónica es una opción adicional. La hidroponía es una técnica para desarrollar plantas en una solución nutritiva (SN) con o sin el uso de un medio de soporte artificial para proveer de soporte mecánico a la planta (Lara, 1999). Entre los factores a seleccionar se encuentran el tipo de hidroponía y la solución nutritiva.

El objetivo del presente trabajo es evaluar tres mezclas de cuatro sustratos en cultivo hidropónico y cuatro soluciones nutritivas en la etapa de aclimatización de vitroplantas.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo de aclimatización se realizó en el invernadero del Departamento de Fertilidad de Suelos y Sustratos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El material vegetativo fue vitroplantas de *Turbinicapus valdezainus* de 6 meses de edad, proveniente de la fase de preaclimatización con promotores del endurecimiento fisiológico y en etapa de crecimiento, cultivadas durante cuatro semanas en medio MS sin reguladores de crecimiento suplementado con 20g de sacarosa L⁻², 100 mg-litro⁻¹ de mio-inositol, 1 mg-litro⁻¹ de tiamina-HCL, 1 mg-litro⁻¹ de piridoxina_HCL, 1 mg-litro⁻¹.

Las plántulas fueron lavadas con agua corriente -para eliminar el agar adherido en las raíces- y sumergidas en tectol (1mg/l) por dos minutos, para después ser transplantas a macetas de 2” con las diferentes mezclas de sustratos seleccionados. Se cubrieron con bolsas de polietileno por dos semanas y durante la segunda semana fueron perforadas para gradar la humedad relativa, al término de estas semanas se eliminaron las bolsas.

En el laboratorio de Fertilidad de Suelos y Sustratos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro se obtuvieron los datos de la caracterización de los siguientes sustratos: peat moss, perlita, aserrín de coco y tezontle las variables evaluadas fueron: humedad inicial (HI) cenizas (CEN), materia orgánica (MO), potencial de hidrógeno(pH), conductividad eléctrica (CE), espacio poroso total(EPT)capacidad de aire (CA), retención de agua (RA) densidad aparente (DA) y densidad real (DR). Conforme al análisis de correlación y con base en los principios básicos de programación lineal se seleccionaron las variables finales de diseño EPT, RA, MO y balance de volúmenes y se establecieron los límites o nivel de restricción para cada una de las variables. La variable objetivo fue bajo costo, los niveles de restricción para cada

una de las variables se definieron para % EPT: 55-70 y 71-86; RA: 61-76%, % de MO: 46-96. La técnica de programación lineal generó mezclas factibles (teóricas) conforme a las necesidades del cultivo. Las mezclas fueron esterilizadas en autoclave a 120°C por espacio de 1 hr (*Requejo et al.*, 2007).

La solución nutritiva seleccionada fue BAYFOL® (20-30-10) a tres diferentes niveles de concentración. Como control se manejó la solución MS a mitad de su concentración normal se aplicó dos veces por semana durante tres meses. Se midió el diámetro de la planta al inicio y al final de este período.

Para evaluar los tratamientos se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3X4 (tres mezclas y 4 SN) se utilizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las características físico-químicas se muestran en el Cuadro 1 y la selección de mezcla de sustratos.

Con la técnica de programación lineal se seleccionaron tres mezclas con cuatro sustratos (Cuadro 2)

Las variables de crecimiento evaluadas presentaron significancia para diámetro de planta y número de raíces adventicias (Cuadro 3).

El sustrato 2 creó un ambiente favorable al crecimiento de algas, hongos y bacterias lo que ocasionó la muerte de las plántulas (Figura 1). Contrario a lo reportado por Barra y Mogollón (2007) donde afirman que el aserrín de coco es un buen sustrato bajo condiciones de nebulización para aclimatar *Etilingera hemisphaerica*. Pire y Pireira (2003) mencionan que el alto valor de RA presenta como contraparte los valores más bajos de porosidad de aireación (EPT), lo que sugiere la importancia de ser utilizado con un componente que aporte suficiente porosidad de aireación. Coincidiendo con Vilchez *et al.* (2007) el control sanitario es requisito

fundamental en el manejo del sustrato. Cuando no se elaboran adecuadamente favorecen la aparición de organismos saprófitos y fitopatógenos. En este caso, la elevada humedad necesaria para aclimatar las plantas en las primeras fases y las características propias de la mezcla favoreció la contaminación. Otro factor a considerar es un CE alto, la energía es canalizada para absorber agua y nutrientes en detrimento de energía metabólica reflejando una disminución en el desarrollo de la planta (Lara, 1999). Ambos fenómenos favorecieron los resultados.

CONCLUSIONES

La mezcla 1 favoreció la supervivencia de las plántulas pero no su desarrollo óptimo.

El sustrato 2 propició el establecimiento de saprófitos que afectaron la supervivencia de las vitroplantas.

La mezcla 3 promovió la supervivencia de las plántulas y el desarrollo del sistema radical óptimo junto con la solución 2. Los resultados obtenidos con la mezcla 3 se aproximaron mucho a lo deseados, tanto en las variables físicas como en las consideraciones agronómicas al promover el crecimiento de la vitroplanta. El manejo de programación lineal puede ser utilizado para la obtención de mezclas definitivas.

LITERATURA CITADA

Apóstlo N M, C B Brutti, B E Llorente (2005) Leaf anatomy of *Cynera scolymus* L. in successive micropropagation stages. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant 41(3):307-313.

Barra A G, N J Mogollón (2007) Aclimatización de vitroplantas de *Etilingera hemisphaerica* ‘Red Tulip’. Rev. Fav. Agron 24(1) 32-38.

Burés S. (1997) Sustratos. Ediciones Agrotécnicas. Madrid, España. pp 339.

De Rezendes

Lara H A (1999) Manejo de la solución nutritiva en la producción de tomate en hidroponía. Terra 17(3): 221-229.

Majada J P, R Sánchez Tamés (2004) Ecofisiología del cultivo in vitro: aclimatación de plantas. In: La Ecofisiología Vegetal. Reigosa JM, N Pedrol, A Sánchez. Thompson ed.

Pire R, A Pereira (2003) Propiedades físicas de componentes de sustratos de uso común en la horticultura del estado Lara, Venezuela. Propuesta Metodológica. Bioagro 15(1):55-63.

[Requejo et al., 2007](#)

Vilchez J, E Ramírez, M Villasmil, N Albany, S León de Sierralta M Molina (2007) Aclimatización de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm f): efectos de sustrato. Rev Fav Agron 24(1): 57-61.

Yokota S, Md Z Karim, M A K Azad, Md M Rahman, J Eizawa, Y Saito, F Ishiguri, K Lizuka S Yahara N Yoshizawa (2007) Histological observation of change in leaf structure during successive micropropagation stages in *Aralia elata* and *Phellodendron amurense*. Plant Biotechnology 24:211-226.

Cuadro 1. Caracterización físico-química de cuatro sustratos seleccionados

Sustratos	HI	CEN	MO	pH	CE	EPT	CA	RA	DA	DR
	%	%	%		dSm ⁻¹	%	%	%	gcc ⁻¹	gcc ⁻¹
Peat moss	49.2	10	90	5.59	1.4	72.6	8.38	64.2	0.07	0.28
						5		7		
Perlita	0.8	100	0	8.2	0.9	62.4	5.43	56.9	0.19	0.51
								7		
Aserrín de coco	60.9	10	90	7.1	4.2	81.8	4.48	77.3	0.09	0.49
						3		5		
Tezontle	0.53	100	0	7.9	1.6	50.7	7.81	42.8	1.17	2.36
								9		

HI=humedad inicial, CEN=cenizas, MO=materia orgánica, pH=potencial de hidrógeno, CE=conductividad eléctrica, EPT=espacio poroso total, CA=capacidad de aire, RA= retención de agua, DA=densidad aparente, DR=densidad real.

Cuadro 2. Mezclas de sustratos obtenidas mediante programación lineal y sus variables de restricción.

Mezcla	% v/v	EPT	RA	MO	\$/L
--------	-------	-----	----	----	------

1	48.89%M2	51.11%M3	73	70	30	0.0899
2	4%M4	96%M3	77	74	80	0.1104
3	19.92%M4	28.97M2	70	73	30	0.1188
	51.11%M3					

M1= peat- moss, M2= perlita, M3= aserrín de coco, M4= tezontle. Espacio poroso total (EPT), retención de agua (RA), Materia orgánica (MO), Costo (\$/L).

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza y prueba de f de La parte factorial de las variables en estudio.

FV	GL	Longitud de raíz	Diámetro de tallo	Número de raíces
Soluciones	3	0.04	0.86 **	7.08 **
Sustratos	1	0.03 **	0.11 **	3.11 **
Soluciones*Sustratos	3	0.1 **	0.04 **	2.37 **
Error	21	0.00	0.02	0.66
C.V.		14.20	58.49	46.65

*, **, Significativo y altamente significativo a los niveles de prueba de 0.05 y 0.01.

BIBLIOGRAFIA

- Ali, M.B. Yu K.w., Hahn, E.J. and K.Y. Paek. 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep.* 25(6):613-620
- Awang, Y. & I. M. Razi. 1997. The growth and flowering of some annual ornamentals on coconut dust. *Acta Horticulturae* 450: 31-37.
- Bandara P.M.S. and K.K. Tanino. Paclobutrazol enhances minituber production in Norland potatoes. *Journal of Plant Growth Reg* 14(3): 151-155.
- Bazzi, C. Messina, L. Tortoreto, L. Bini, F. Cecca, G. y E. Stefani. 2003a. Investigations on the possible use of abiotic and biotic elicitors in defence-related responses in plants. *Europ.J.HortScie.*, 68(3) 115-122.
- Bazzi, C. Messina, L. Tortoreto, F. Stefani, E., Bini, F. Brunelli, A., Andreotti, C. Sabatini, E., Spinelli, F. Costa, G., Hauptmann, G., Doerr, S., Marr, J. y W. Rademacher. 2003b. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *Europ.J.HortScie.*, 68(3) 108-114.
- Burés, S. 1997. Sustratos. Ediciones Agrotecnia S. L. Madrid, España. P. 339.
- Cabeza Banda, A. 2001. Evaluación de los ácidos Salicílico y Benzoico en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) Tesis Ingeniero Agrónomo en Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

- Catsky, J. and I. Ticha. 1982. Photosynthetic characteristic during ontogenesis of leaves. Intracellular conductance and its components. *Photosynthetica* 16: 253-284.
- Chakrabarty, D. park S.Y., Ali, M.B. Shin, K.S. Pack, K.Y. 2006. Hiperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiol* 26(3): 377-388.
- Dami, I. and H.G. Huges. 1997. Effect of PEG-induced water stress on *in vitro* hardening of “Valiant “ grape. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 47: 97-101.
- Debergh, P., Aitken-Chistie, J., Cohen, D., Grout, B., von Arnold, S., Zimmermann, T.W. and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cul.* 30:135-140.
- Escalona, M. Lorenzo, J.C., González, B. Daquinta, M., González J.L. Desjardins, Y., C.G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas cosmosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18: 743-748.
- Evans, J. R. Ishida, C. A. Regusci, C. L. and W. Rademacher. 1997. Mode of action metabolism and uptake of BAS-125W, prohexadione-calcium. *HortScience.* 324: 557-558.
- Fal, M.A., Majada J.P., González, B. and R. Sánchez-Tames. 1999. Differences between *Dianthus caryophyllus* L. Cultivars *in vitro* growth and morphogenesis related whit their ethylene production. *Plant Growth Rep.* 27:131-136.
- Gaspar, T. Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, M.D. and T.A. Thorpe. Plant hormones and plant growth regulators in plants tissue culture. *In Vitro Cel. Dev. Biol.* 32:272-289.
- Guak, S., Neilsen, D. and N.E. Looney. 2001. Growth, allocation of N and carbohydrates and stomatal conductance of greenhouse grown apple treated whit prohexadione-Ca and gibberellins. *J Hort Sci Biotech.* 76: 746-752.
- Grossman, K., Koenig, K.S. and J. Kwiatkowski. 1994. Phytohormonal changes in intact shoots of wheat and oilseed rape treated with the acylcyclohexanedione growth retardant prohexadione calcium. *Physiol. Plant.* 90:139–143.
- Jenks, M.A. Andersen, L. Teuskink, R.S., and M.H. Williams. 2001. Leaf cuticular waxes of potted rose cultivars affected by plant development, drought and paclobutrazol treatments. *Physiol. Plant.* 112(1):62-70.
- Le, Guen-Le., Saos, F., Hourmant, A., Esnault, F. and J.E. Chauvin. 2002. *In Vitro* bulb development in shallot (*Allium cepa* L. *Aggregatum* group): effects of anti-gibberellins, sucrosa and Light. *Ann. Bot. (Lond)* 89 (4): 419-425.

- Lorenzo, J.C., Blanco, M.A., Peláez, o., González, A., Cid, M., Iglesias, A., González, B., Escalona, M., Espinosa, P. and C. Borroto.2001. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell Tiss Org Cul.* 65: 1-8.
- Lorenzo, J.C., González, B., Escalona, M. Teisson, C., Espinosa, P. and C. G. Borroto.1998.Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org Cul* 54: 197-200.
- Luan, Le Q., Ha, V.T. Nagasawa, N., Kume,T. Yoshii,F. and T.M. Nakanishi. 2005. Biological effect of irradiated chitosan on plants in vitro. *Biotechnol. App. Biochem* 41(Pt1):49-57.
- Majada, J.P. y R. Sánchez-Tamés. 2004. Ecofisiología del Cultivo in vitro: Aclimatación de plantas. En Reigosa, M.J., Pedrol, N. y A. Sánchez. 2003.La Ecofisiología Vegetal. Ed. Thompson,. España. 1193p.
- Mauseth, J. D. 1993. Medullary bundles and the evolution of cacto. *Am J Bot.* 80: 928-932.
- Meerow, A.W. 1994. Growth of two subtropical ornamentals using coir (*Coconut mesocarp pith*) as a peat substitute. *HortScience* 29 (12): 1484-1486.
- Noguera, P. and Abad M. 1997. Physical and chemical properties of coir waste and their relation to plant growth. *Acta Horticulturae.* ISHS.
- Pâques, M. 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Horticulturae.* 289:283-290.
- Pospisilova, J.E., Ticha, I., Kadlecck, P., Haisel, D. and S. Plzaková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 42(4): 481-497.
- Prasad, M. 1997. Physical. chemical and biological properties of coir dust. *Acta Horticulturae* 450: 21-29.
- Preece, J. E. and E.G. Sutter. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P.C. and R.H. Zimmerman (eds) *Micropropagation.* Kluwer Academic Plublisher. Pp 71-93. Dordrecht-Boston-London.
- Pullman, G.S. Mein, J. Jhoson S. and Y. Zhang. 2005. Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cel. Report.* 23(9): 596-605.
- Rademacher, W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:501-531.
- Rademacher, W. and R. Kober. 2003. Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. *Europ.J.HortScie.*, 68(3) 101-107.

- Ramírez, Cortez J.A. 2003. Estudio de algunos factores que influyen en la micropropagación de nogal (*Carya Illinoensis* Koch). Tesis doctoral en Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Ramírez, G. F., Escobedo, B.L. Robledo, T. V. y N.L. Portos. 2004. Estudio Anatómico del Sistema vascular de plantas *in vitro* y plantas de desarrollo normal de *Turbinicarpus valdezianus*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. ISBN 968-844-030-2. 250
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, P.D., Murr, P.D. and C.B. Watkins. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production: oxidative stress, and H₂O₂ metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiol.* 115(1): 137-149.
- Raskin, I. 1992. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 99:799-803.
- Reigosa, J.M., Pedrol, N. y A.Sánchez. 2004 *La Ecofisiología Vegetal*. Ed. Thomson. Madrid España. 1193p
- Requejo, L.R., Olivares, S.E., Vázquez, A.E.R, Rodríguez, F.H., Munguía L.P.J. y S J. G. Garza. 2007. Formulación de mezclas con cuatro sustratos hidropónicos de uso común en la producción vegetal. No publicado.
- Romano, A., Noronha, C. and M.A. Martins-Louçã 1995. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 40(2):159-167.
- Ruano, M.R.J. 2003. *Viveros Forestales*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-Barcelona-México 281p.
- Santiago-Guillén, A.R. 2002. Efecto del Acido Salicílico y Acido Benzoico en la Germinación y Biomasa de Betabel y Lechuga en medio salino. Tesis Ingeniero Agrónomo en Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Santos-Díaz, S. R. Mendez-Ontiveros, A. Arredondo-Gomez y M.L., Santos-Díaz. 2005. *In vitro* organogenesis of *Pellecyphora aselliformis* Erhenbergh (cactaceae). *In Vitro Cell Devel Biol.* 39(5):480-484.
- Schlangen, K., Gosch, C., Roemmelt, S. Knott, J., Fischer, C., Treutter, D., Forkmann, G., Stich, K. y H. Halbwirth. 2003. Can Prohexadione-Ca induce antimicrobial flavonoids in rose?. *Europ. J. Hort. Sci.*, 68(3) 137-1143.
- Spinelli, F. Speakman J-B., Rademacher, W., Halbwirth, H. Stich, K. and G. Costa. 2005. Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* 112: 133-142.

- Sutter, E.G. 1985. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. *In Vitro Cell Devel Biol.* 27: 52-56.
- Taji, A.M., Williams, R.R. and W.H. Sheather. 1996. Comparative anatomy of four rare Australian plant growth *in vitro*. *Botanic Gardens Micropropagation News.* 2(2).
- Tasqin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B. and L.P. Popova. 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry* 67(7): 710-715.
- Thakur, R., Sood, A., Nagar, P.K. Pandey, S., Sobti, R.C. and P.S. Ahuja. 2006. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. *Plant Cell Rep* 25(5): 382-391.
- Thomas, P. Mythili, J.B. and K.S. 2000. Explant, medium and vessel aeration affect the incidence of hyperhydricity and recovery of normal plantlets in triploid watermelon. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75: 19-25.
- Urbina-Sánchez, E. Baca-Castillo, G.A. Núñez-Escobar, R., Colinas-León, M.T. Tijerina-Chávez, L. y J.L. Tirado-Torres. 2006. Cultivo hidropónico de plántulas de jitomate en zeolita cargada con K⁺, Ca²⁺ o Mg²⁺ y diferente granulometría. *Agrociencia* 40:419-429.
- Werbrouck, O. and P. Debergh. 1996. Imizadole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in araceae. *Plant Growth Regul.* 15:81-85.
- Yu, Z.Z. Fu C.X., Han, Y.S. Li, Y.X., and D.X. Zhao 2006. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Biotechnol Lett.* 28(13): 1027-1031.
- Zamora, M.B.P. 2005. Formulación de mezclas de sustratos mediante programación lineal. Tesis de doctorado. Edafología. Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Ziv, M., 1990. Transition of plants from *in vitro* cultures to establishment *ex vitro*. *Agricell Report* July 1990.
- Ziv, M. 1991. Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En PC Deberg, R.H. Zimmermann, eds. *Micropropagation: Technology and Application.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht, pp 45-69.