



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EFEECTO DE CITOCININAS SOBRE LA DINAMICA DE NUTRIMENTOS DEL MEDIO LIQUIDO Y PESO FRESCO EN CÉLULAS DE *Strombocactus disciformis* (De Candolle, Britton y Rose). CRECIDAS *in vitro* EN MEDIO LÍQUIDO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL

TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GREGORIO REYES LÓPEZ



Los Reyes Iztacala, Mayo del 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE	Página
RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
1.0 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Descripción de la especie.....	4
1.2 Estrategias del cultivo in Vitro.....	5
1.3 Papel funcional de los nutrimentos.....	6
1.3.1. Macronutrientes.....	6
1.3.2. Asimilación del nitrógeno.....	8
1.3.2. Micronutrientes.....	11
1.4. Reguladores de crecimiento.	13
1.4.1. Citocininas.....	14
1.5. Establecimiento del problema.....	16
2.0 OBJETIVOS.....	18
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.0 RESULTADOS.....	21
5.0 DISCUSIÓN.....	30
6.0 CONCLUSIONES.....	33
7.0 BIBLIOGRAFIA.....	34
8.0 APENDICES.....	38

DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanos en especial a mi hermana Cecilia por todo el apoyo brindado a lo largo de todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que han contribuido para la realización de este trabajo, con sus sugerencias y conocimientos:

Especialmente a mi director de tesis. Gerardo Ortiz Montiel, por haberme aceptado como tesista y además de compartir sus conocimientos en la guía del trabajo a lo largo de todo este tiempo no solo como profesor, también como amigo.

A Socorro S. C., por sus sugerencias y comentarios en este trabajo, así como su amistad en todo este tiempo.

A Ernesto Aguirre, por las sugerencias a este trabajo y por compartir algunas cuestiones en relación a las orquídeas.

A Manuel Mandujano y Alberto Arriaga, por sus comentarios y sugerencias para llevar a buen termino este trabajo.

A Marcial García, responsable del Jardín Botánico de Iztacala, por haber donado la planta para la realización de este trabajo, así como por haber permitido la realización de mi servicio social en el JABIZ.

En general un agradecimiento a todos los profesores que han compartido sus conocimientos a lo largo de la carrera, de los cuales no menciono nombres para no omitir a ninguno.

A todos mis amigos que han compartido momentos gratos y no tan gratos, a todos mis amigos del 99, que compartieron una causa, a los amigos y compañeros de laboratorio, Lulu, Ricardo, Oscar, así como un agradecimiento especial a Yolanda, por su amistad y compañerismo en todo este tiempo, también a los amigos que estuvieron en el laboratorio y con los que compartí conocimientos y alegrías; en especial a Lupita y Edith.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de Kin, BAP y 2ip (1, 2.5 y 5 mg/l respectivamente) en el peso fresco de células de *Strombocactus disciformis* y la dinámica de nutrimentos (sacarosa, nitratos, fosfatos y potasio), durante su crecimiento en medio líquido, observándose con respecto al control, que las citocininas influyeron en el aumento de peso fresco, sin que se encontraran diferencias significativas entre las citocininas y sus concentraciones al día 30; así mismo, pudo verse que el incremento de peso estuvo relacionado con la presencia de 2ip y de Kin, ya que BAP al día 16 y 23 no presentó diferencias con respecto al control. Se apreció que las citocininas influyeron en la disminución de los nutrimentos del medio esto con respecto al testigo en donde se observó incremento en la concentración de nutrimentos, también se determinó un efecto diferencial en la concentración de los nutrimentos, pero en general hubo una disminución simultánea de los nutrimentos del medio, principalmente de sacarosa, fosfatos y potasio, esto al día 16, manteniéndose sin cambios significativos en la evaluación al día 30. En relación con los nitratos se determinó que es el elemento que disminuyó casi totalmente del medio esto aún cuando las células de *S. disciformis* no se encontraron en proceso de diferenciación, además de que estaría relacionado con el establecimiento del cultivo o al aumento de peso, esto dependiendo de la citocinina y día en que disminuyó del medio. Por lo que el comportamiento que presentan los nutrimentos en el cultivo de células de *S. disciformis* nos indicaría que el establecimiento del cultivo es la fase que está requiriendo de más energía, además de que las citocininas estimulan la asimilación de minerales por las células de *Strombocactus disciformis*

ABREVIATURAS

Kin.....Kinetina o Cinetina (6-furfurylaminopurina)

BAP.....Bencil amino purina (6-bencilaminopurina ó N⁶-benzyladenina)

Zip.....2-isopentil adenine ó (N⁶(dimetilalilamino)-purina), N⁶(Δ^6 -isopentenil)-adenina

2,4-D.....ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

NOM.....Norma Oficial Mexicana

NH₄.....Amonio

NO₃⁻.....Nitrato

Pi.....Fósforo inorgánico

PPi (P₂O₇⁴⁻).....Pirofosfato

Phti.....Familia de proteínas transportadoras de fósforo

KOH.....Hidróxido de potasio

NaOH.....Hidróxido de sodio

MS.....Medio Murashige y Skoog

1.0 INTRODUCCION

México cuenta con una gran diversidad biológica, alberga entre el 10 y 15% de las especies terrestres, por lo cual no hay otro país de tamaño similar (1.3% del total global de tierra), que tenga tanta diversidad en sus ecosistemas (SEMARNAP, 1997).

Entre las plantas más representativas de la flora actual, en México sobresale la familia de las cactáceas, la que junto con otras 5 familias suman aproximadamente el 40% del total de géneros y especies (Rzedowski, 1991). Las cactáceas constituyen un grupo natural originario del continente americano, con aproximadamente 2000 especies, esta familia se ha diversificado en diferentes climas y tipos de vegetación como las regiones tropicales, subtropicales, templadas y frías, la mayor diversidad esta distribuida en las zonas áridas y semiáridas (Arias, 1997; Rzedowski, 1978; 1991).

La flora Mexicana no solo se distingue por su diversidad sino también por su alto índice de endemismos, es decir especies restringidas a ciertas áreas o límites del territorio nacional (Rzedowski, 1991), las cactáceas presentan a nivel de género un endemismo del 73% y a nivel de especie un 78%, estas están concentradas en las zonas con mayor aridez del país. Particularmente en la porción sureste del desierto Chihuahuense, incluyendo la zona árida Queretana - Hidalguense (Hernández y Godines, 1994).

En México se han utilizado las cactáceas desde la época prehispánica, en la actualidad el fruto y tallo de muchas de estas especies complementan la subsistencia y el ingreso monetario de muchas localidades (Bravo *et al.*, 1991). Entre los usos que se da a las cactáceas está el medicinal, alimenticio (consumo de las flores, frutos, tallos etc.) y el más difundido ha sido de ornato ya que por sus formas, estructura, colores o flores vistosas, son muy apreciadas y las poblaciones se han visto amenazadas por una colecta excesiva. Lo anterior, junto con destrucción de su hábitat por la ganadería, zonas agrícolas o casas habitación, perjudica a esta familia, ya que por sus características biológicas y ecológicas, sus tasas de crecimiento muy bajas y ciclos de vida frecuentemente largos, afectan la existencia de la mayoría de estas plantas (Hernández y Godinez, 1994; Bravo *et al.*, 1991; Casas *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 1994; Álvarez y Montaña, 1997; Malda *et al.*, 1999).

Por estas razones la familia de cactáceas está entre las mas vulnerables y actualmente tiene aproximadamente 50 especies en peligro de extinción, contempladas en el apéndice número uno de la CITES (Convención Internacional Sobre la Comercialización de Especies de Flora y Fauna)(2005), y toda la familia en el apéndice dos (especies protegidas). Algunas especies están listadas en la NOM. 059 (2002), las cuales pueden tener la categoría de endémicas, en riesgo o protegidas.

Entre las plantas en riesgo o en peligro de extinción en su lugar de origen está *Strombocactus disciformis*, especie endémica de la zona árida Queretana, con una área de distribución limitada, la cual está contemplada en la categoría de amenazada, en el apéndice número uno de la CITES (2005), y aparece en la categoría de especie amenazada y endémica en la NOM 059 (2002) al respecto Godínez (2002) en un informe a la CONABIO, después de hacer la evaluación de 2 especies de cactáceas: *Strombocactus disciformis* y *Turbincarpus pseudomacrochele*, recomienda que estas especies permanezcan en el apéndice 1 de la CITES, en especial *S. disciformis* por presentar una alta especificidad de hábitat, así como un tamaño muy pequeño de plántulas, lo cual incrementa su vulnerabilidad.

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Strombocactus disciformis (DC.) Britton y Rose, (1922), de acuerdo a Bravo *et al.*, (1991), pertenece a la Clase: Angiospermae; Orden: Caryophyllales y Familia: Cactaceae. Son plantas simples o cespitosas; tallos globosos aplanados, discoide, a veces cortamente columnar, de 1 a 15 cm de altura y de 1.5 a 12 cm de diámetro, color verde glauco muy claro a verde grisáceo; ápice redondeado aplanado o algo hundido con lana blanca y cubierto por las espinas. Tubérculos dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, romboidales o piramidales de 10 a 18 mm de longitud, duros; aréolas pequeñas desde circulares a elípticas de casi 2 mm de largo, las jóvenes con lana blanca, después desnudas. Espinas de un solo tipo, 4 o 5, setosas, de hasta 15 mm de largo, rectas o encorvadas, la mayoría en los tubérculos jóvenes del ápice, pronto caducas de color blanco grisáceas. Flores brotando de las areolas cercanas al ápice, infundibuliformes, de 2 a 3.5 cm de largo, blanquecinas a rojo purpúreas; pericarpelo con sólo algunas pequeñas escamitas circulares; fruto ovoide, de 6-12 mm de largo, una o dos veces más largo que ancho, semiseco, casi desnudo, con pocas escamas, de color castaño, dehiscente por una ranura longitudinal, con pequeñas brácteas; semillas globosas, de 0.3 a 0.5 mm de diámetro, con arilo grande, testa tuberculada de color castaño rojizo.

Por la importancia que tiene esta especie y en general la familia de las cactáceas, se hace necesaria la generación de diversos sistemas de propagación y conservación de germoplasma, ya sea con métodos tradicionales o por medio del implemento de técnicas rápidas y eficaces en propagación, algunas de las cuales han estado siendo aplicadas desde mediados del siglo XX (George y Sherrington, 1993; Nuri y Read, 2004), adquiriendo una gran importancia como alternativas potenciales para conservación y reproducción para un gran número de especies. Una de estas técnicas es la

micropropagación o cultivo *in vitro*. Este método de propagación está siendo utilizado como una alternativa potencial para la propagación de cactáceas y crasuláceas (Hubstenberger, 1992; Malda *et al.*, 1999), donde a partir del cultivo de algunas partes o fracciones de las plantas, llamados también explantes (órgano, tejido, unas cuantas células, ó protoplastos en medios nutritivos), estos cultivos pueden desarrollar brotes y raíces adventicias o axilares, así como la formación de embriones, ya que se basan en el principio de totipotencialidad, es decir que una sola célula puede desarrollar una planta completa. Este tipo de cultivo es a microescala, donde se mantienen en condiciones óptimas, controlando la luz, humedad, nutrición, temperatura, etc., lo anterior permite tener plantas libres de agentes patógenos, como son hongos, bacterias o virus (George y Sherrington., 1993; Hubstenberger et al., 1992; Flores y Ortiz, 2000).

1.2. ESTRATEGIAS DEL CULTIVO *in vitro*

Existen varios métodos de cultivo que en su conjunto forman las técnicas de la micropropagación algunas de estas son:

-El cultivo de órganos: Este se hace a través de células meristemáticas de los ápices de la planta o raíz, el cultivo depende del tipo de estructura que se está utilizando, así como la predeterminación genética de las células, por lo general se utiliza para la formación directa de plantas (George y Sherrington, 1993; Evans *et al.*, 2003).

-Cultivo de Embriones: En este se utilizan embriones de semillas como explante, geminados *in vitro* para obtener una planta por explante, este tipo de cultivo se utiliza por lo general en semillas que presentan un periodo de dormancia prolongado (George y Sherrington, 1993; Evans *et al.*, 2003).

-Cultivo de callos: Formado por células indiferenciadas y amorfas, producidos por una gran proliferación celular inducida, los callos son obtenidos de pequeños explantes en medio de cultivo con reguladores de crecimiento. El proceso de formación de órganos, ocurre con la rediferenciación, con lo que las células responden a nuevos estímulos, dando origen a meristemas o células parenquimatosas, estructuras características de órganos o tejidos.

-Cultivo de células en suspensión: Este cultivo por lo general presenta un crecimiento celular más rápido que en agar y es mejor para la manipulación experimental, pues son particularmente susceptibles a los reguladores de crecimiento así

como a los nutrimentos ya que las células están dispersas libremente en el medio, el cultivo es originado principalmente por el cambio de callos a medio líquido en agitación. Esta técnica, también se aprovecha, para la producción de metabolitos secundarios, que pueden ser utilizados en la industria farmacéutica o alimentaria, por ejemplo producción de pigmentos vegetales (George y Sherrington, 1993; Evans *et al.*, 2003).

-Cultivo de Tejidos en Biorreactores: Este tipo de cultivo permite por un lado monitorear y controlar los parámetros del cultivo como son; Temperatura, luz, concentración del oxígeno disuelto, pH, agitación, etc., y por otro lado estudiar el comportamiento celular, crecimiento, producción de metabolitos etc. (Gorret *et al.*, 2004).

El desarrollo de las plantas, en medios de cultivo esta fuertemente influenciado por las características de su composición, de forma tal que para su crecimiento, las plantas necesitan de algunos elementos minerales esenciales que no pueden ser reemplazados (George y Sherrington, 1993; Kothari *et al.*, 2004; Ramage y Williams, 2002a; 2003; Pérez y Martínez, 1994; Hammond *et al.*, 2004), los cuales se dividen en:

a). **Macronutrimentos:** (Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Azufre y Magnesio), elementos importantes para que la planta complete su ciclo de vida y reproducción, forman parte importante de macromoléculas estructurales o reguladoras, como las proteínas o ácidos nucleicos, pueden actuar de cofactores en enzimas o en la regulación de potenciales osmóticos, (George y Sherrington, 1993; Kothari *et al.*, 2004; Ramage y Williams, 2002a; 2003; Pérez y Martínez, 1994; Hammond *et al.*, 2004).

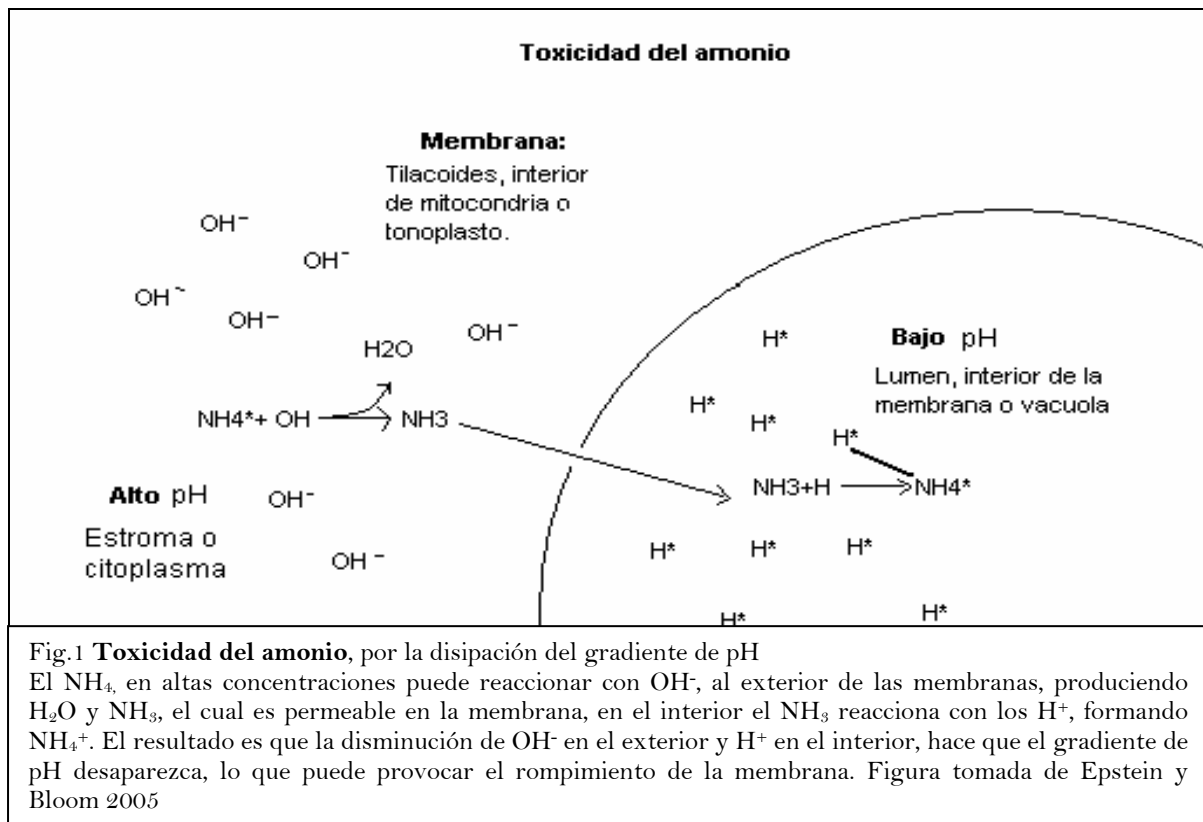
b). **Micronutrimentos:** (Zinc, Hierro, Molibdeno, Boro, Cobre, Manganeso, Cloro), estos minerales se requieren en pocas cantidades, pero juegan un papel importante como cofactores de enzimas o componentes de proteínas transportadoras de electrones. (George y Sherrington, 1993; Kothari *et al.*, 2004; Ramage y Williams, 2002a; 2003; Hammond *et al.*, 2004).

1.3. PAPEL FUNCIONAL DE LOS NUTRIMENTOS.

1.3. MACRONUTRIMENTOS.

NITROGENO: El crecimiento y morfogénesis de los tejidos está fuertemente influenciado por la disponibilidad de nitrógeno y la forma en que éste se encuentre presente; la forma que varios autores han considerado más importante en el medio de cultivo es como nitrato, pero coinciden que se requiere otro suplemento de nitrógeno, en forma de amonio (NH_4) (Walch-Liu *et al.*, 2000; Shatyanarayama y Blake, 1994 citado en Ramage y Williams, 2002a). También consideran que los nitratos, tienen un mayor efecto en la morfogénesis y por otro lado el amonio en el medio, tiene un efecto

frecuentemente negativo, este problema, se atribuye a varios factores, pero el principal es un efecto tóxico del amonio libre, que genera cambios de pH (fig.1) (Ramage y Williams, 2002b; Epstein y Bloom, 2005; Walch-Liu *et al.*, 2000; Kaul y Hoffman, 1993).



También varios autores proponen que la forma en que el N se asimila esta inducida por el pH del medio, ya que para la entrada de nitrato se requiere de un pH ácido, el que al tomarse del medio, favorece gradualmente un cambio a pH alcalino; al cambiar, se favorece la entrada de amonio cuando este disminuye exteriormente las células comienzan a excretar H^+ al medio, haciéndolo más ácido; la liberación de H^+ se da por una rápida asimilación, donde el NH_4^+ pasa a NH_2^- dejando libres 2H^+ por cada molécula; cuando el pH del medio baja la entrada de amonio se inhibe. Para mantener una entrada eficiente de nitrógeno la célula genera un sistema regulador, que puede modificarse por la presencia de ambos iones, por lo que se recomienda utilizar en el medio de cultivo una concentración adecuada de nitratos y amonio (George y Sherrington, 1993; Ramage y Williams, 2002; 2003; Scheible *et al.*, 1997; Raab y Terry, 1994; Larcher, 1977; Salisbury y Ross, 1992).

1.3.2. La asimilación del nitrógeno

El nitrato se incorpora a las células en forma de grupos aminos, dando lugar a formación de aminoácidos; el primer paso de este proceso es la reducción de los nitratos

a nitritos, la reacción es por la nitratorreductasa, generando nitritos, estos son reducidos por la nitritorreductasa (fig 2), dando como resultado amonio que por su carácter tóxico permanece libre un corto tiempo y se metaboliza. La energía y el poder reductor para el proceso, provienen de la respiración (NADH_2) y fotosíntesis (NADPH_2).

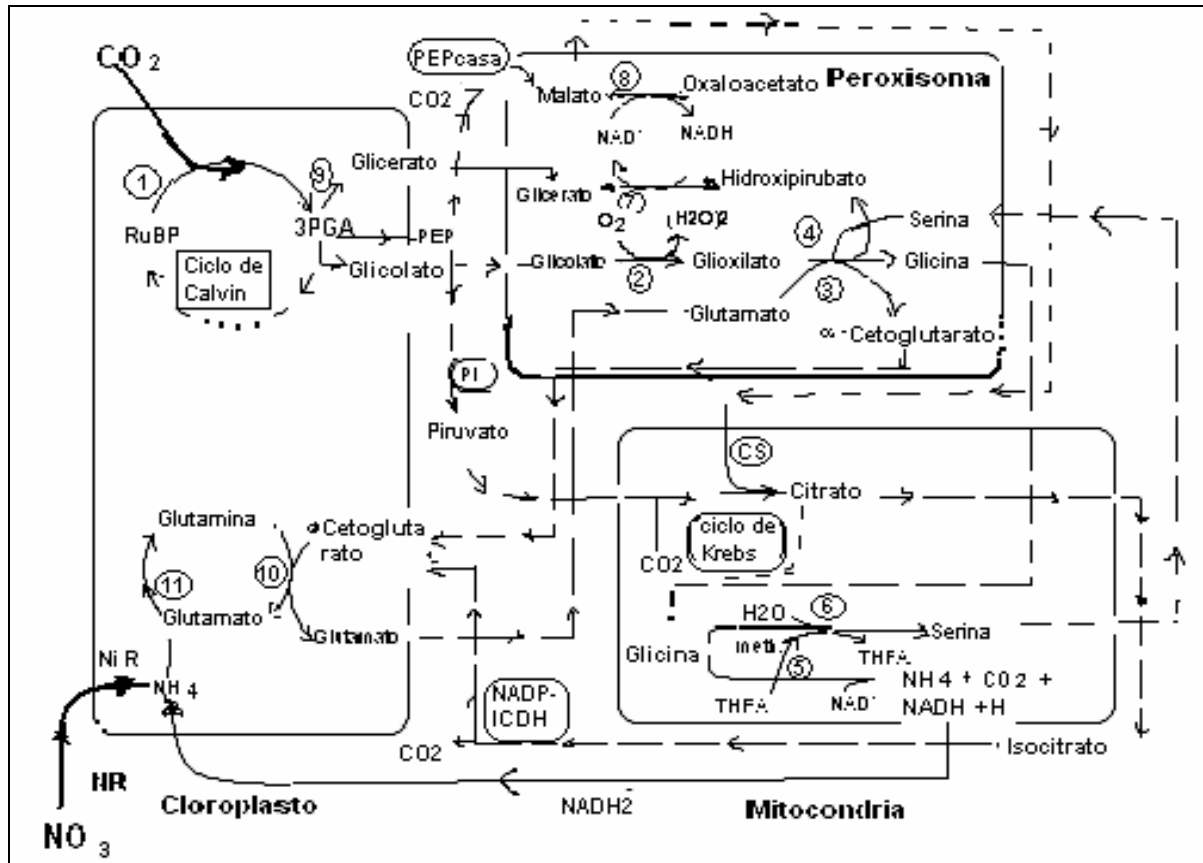


Fig 2 Metabolismo del nitrógeno. Nitratorreductasa (NR), Nitritorreductasa (NiR), 3-Fosfato, glicerato (3PGA), Fosfo kinasa (PK), Citrato sintetasa (CS), Malato deshidrogenasa (NAD^*), NADP-Isocitrato deshidrogenasa dependiente, algunas de las enzimas son: 2-fosfoglicolato fosfatasa (1), glicolato oxidasa (2), glutamato(alanina)-glioxilato aminotransferasa (3), serina (asparagina)-glioxilato aminotransferasa (4), complejo glicina descarboxilasa (5), serina hidroximetiltransferasa (6), hidroxipiruvato reductasa (7), NAD malato deshidrogenasa (8), glicerato cinasa (9), glutamato sintetasa (10), glutamina sintetasa conocida como glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT)(11), (fig. Modificada de: Salisbury, 1992 y Scheible et al., 1997).

El segundo paso del proceso asimilatorio es la aminación reductiva de los α -cetoácidos, primero el ácido α -cetoglutarico, producto intermedio del ciclo de Krebs, al aminarse mediante la enzima glutamato sintetasa forma ácido glutámico (glutamato) que es el primer aminoácido, posteriormente puede ceder el grupo amino (NH_2), en la glicólisis y en el ciclo del ácido cítrico (transaminación) (fig. 2), dando lugar a otros aminoácidos, cuando esto ocurre se incrementa la asimilación de carbón, incluyendo una reducción en la síntesis de almidón y ácidos orgánicos, para proveer los esqueletos de carbón para otros aminoácidos. Estos cambios implican que durante la asimilación del nitrógeno se generen señales que están regulando el metabolismo y crecimiento (George

y Sherrington, 1993; Ramage y Williams, 2002; 2003; Scheible *et al.*, 1997; Raab y Terry, 1994; Larcher, 1977; Salisbury y Ross, 1992; Miflin y Habash, 2002).

FOSFATOS: La limitación del crecimiento de muchos sistemas de producción así como plantas propagadas en cultivo de tejidos se presenta con frecuencia por una deficiencia de fosfato (Smith *et al.*, 2000; 2003; Franco-Zorrilla, 2004; Lumsden *et al.*, 1990, citado en Ramage y Williams 2002a). Una asimilación adecuada de fósforo es importante para la morfogénesis y el desarrollo, siendo rápidamente consumido en medios de cultivo líquido (Ramage y Williams, 2002a; 2003). Una limitación del fósforo puede disminuir la tasa de crecimiento en las plantas y asimilación de nitratos (Gonazdowska y Rychter, 2000; Kania *et al.*, 2003), ya que el fósforo juega un papel importante en la maquinaria del metabolismo energético, por sus requerimientos en producción de compuestos fosforilados durante la glicólisis y en la fase luminosa de la fotosíntesis. La mayoría del fósforo se incorpora, como fósforo inorgánico (Pi) a los componentes estructurales de la célula, como son: fosfolípidos presentes en membranas, ácidos nucleicos, así como ATP (Groot *et al.*; 2003; Ramage y Williams, 2002a; 2003). También forma parte de varios azúcares fosfatados involucrados en la fotosíntesis, respiración y otros procesos metabólicos como el transporte en floema. En el metabolismo energético puede estar presente en forma de ATP, ADP, AMP, y pirofosfato (PPi) (Salisbury *et al.*, 1992). El Pi que se requiere es transportado a través de membranas (transporte simplástico), cuyo sistema de membranas es requerido para la distribución y remoción del Pi del tejido de la planta, esta función es regulada por proteínas transportadoras de fosfatos (*Phti*); parte de este fósforo es transportado al citosol con lo que la concentración se mantiene constante (Salisbury *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2000). En condiciones de estrés ó déficit de fósforo, la reserva que se encuentra en la vacuola (que actúa como regulador de pH para mantener la concentración de Pi intracelular), puede ser liberada dándose un fuerte intercambio entre ésta y el citosol a través del tonoplasto, el cual incrementa su permeabilidad. El Pi es también esencial para el funcionamiento de las mitocondrias y el movimiento dentro de la mitocondria es facilitado por transportadores de fosfato mitocondrial. Las proteínas encargadas del transporte de Pi entre el citosol y los organelos son diferentes a las de la familia (*Phti*), que participan en la adquisición del Pi del medio externo. (Smith *et al.*, 2003; Flugge 1999; Takabatake *et al.*, 1999; Kammerer *et al.*, 1998; Kania *et al.*, 2003).

POTASIO: Es el elemento cationico mas abundante en plantas, juega un papel importante como regulador osmótico en las células y es sumamente móvil a través de ellas, ya sea por mecanismos de transporte selectivos de potasio ó por intercambio

cationico. Se puede encontrar en el citosol o en la vacuola en altas concentraciones como un ion libre y en condiciones de estrés la cantidad en el citosol esta regulada por las reservas de la vacuola. El K^+ tiene varias funciones; es necesario para la enzima DNA polimerasa, ya que junto a otros iones estabilizan la configuración de polimeros, e intervienen contrarrestando una aparición de polianiones en los ácidos nucleicos. Aunque el potasio no es un sustrato directo para el crecimiento, es decir no forma parte de elementos protoplásmicos, éste influye en varios procesos metabólicos como: el flujo de otros minerales a través de las membranas (nitrógeno, fósforo, y carbono), translocación de fotosintatos, la respiración, fotosíntesis, síntesis de clorofila etc. Estos procesos son realizados por al menos 40 enzimas diferentes; las cuales son activadas por el potasio (Ramage y Williams, 2002a; Schachtman, 2000; Sinha, 2004; Epstein y Bloom, 2005).

CALCIO: Este elemento actúa como mediador de varios procesos fisiológicos en las células, además tiene una gran interacción con las citocininas, interviene en la formación del huso acromático durante la mitosis, forma parte de las paredes celulares y lámina media generando pectatos insolubles, es cofactor de algunas enzimas hidrolíticas y permite la permeabilidad de membranas, juega un papel importante en el metabolismo de lípidos, protege al protoplasma de agentes tóxicos al formar oxalatos, es promotor de translocación de carbohidratos, aminoácidos y desarrollo de la raíz, también es un activador de diversas enzimas tales como fosfolipasas, arginina kinasa, ATPasa, amilasa, etc. (Ramaje y Williams, 2002a; Salisbury *et al.*, 1992; Hopkins 1999).

AZUFRE: Usualmente se adiciona al medio de cultivo como sulfato (SO_4), donde la primera vía metabólica para la asimilación del sulfato es una reacción con ATP en el que da como productos la pirofosfatasa y la adenosina-5'-fosfosulfato (APS) siendo este paso catalizado por la ATP sulfurilasa. El sulfato es rápidamente transformado a aminoácidos sulfurados especialmente a cistina, cisteina, y metionina. Otra forma donde está presente el azufre es como constituyente de varias coenzimas (Ramaje y Williams, 2002; Salisbury *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2000).

MAGNESIO: Este elemento tiene importantes funciones en la planta, forma parte importante en la molécula de la clorofila, también es requerido para estabilizar la estructura ribosomal en procesos de síntesis de proteínas y esta involucrado como activador de numerosas enzimas importantes, que involucran ATP ya que sirve de enlace entre éste y el sitio activo de la enzima donde actúa como activador para la ribulosa-bifosfato-carboxilasa y fosfoenol-piruvato-carboxilasa, dos enzimas esenciales en la asimilación fotosintética de carbón; también interviene en procesos de respiración, y

formación de DNA y RNA. (Ramage y Williams, 2002; Salisbury *et al.*, 1992; Sinha, 2004; Hopkins 1999).

1.3.2. MICRONUTRIMENTOS

ZINC: Las plantas asimilan el Zn^{++} en condiciones acidas, este mineral tiene un papel importante en la síntesis de proteínas, por lo que en su ausencia puede haber un incremento en los componentes nitrogenados, también sirve de activador en varias enzimas como la alcohol deshidrogenasa, pirimidina nucleótido deshidrogenasa, carboxipeptidasa, anhidrasa carbónica, fosforilasa, hexocinasa etc. Se ha visto que el Zn evita la clorosis por lo que se ha sugerido que interviene en la formación de la clorofila o bien evitando su destrucción.(Salisbury *et al.*, 1992; Sinha, 2004; Epstein y Bloom, 2005)

MOLIBDENO: Este elemento es requerido por las plantas en concentraciones muy bajas, pero su papel en el metabolismo es esencial, sobre todo en la fijación y utilización del nitrógeno, ya que forma parte en el complejo de la enzima nitrato reductasa (NR), donde el nitrato (NO_3^-) es transformado a nitrito (NO_2^-) (ver figura 2); otros complejos de molibdeno forman parte de varias enzimas importantes como son: sulfato oxidasa peroxisomal, (interviene cuando hay una elevada concentración de fosfato), la aldehído oxidasa (biosíntesis del ácido absicico), xantina deshidrogenasa (actúa en condiciones de estrés, además de ser esencial para la degradación de la purina como es la adenina y guanina). La falta de Mo, puede provocar una acumulación de nitratos en el citoplasma (Salisbury y Roos, 1992; Sinha, 2004; Epstein y Bloom, 2005; Schwarz y Mendel, 2006)

BORO: La principal función que tiene este elemento es en la formación de la pared celular, ya que es el centro de unión, de dos moléculas de polisacáridos en la pared celular llamado ramnogalacturonanos II (RGII), esto evidencia la interacción del boro y los polímeros de pectinas. El boro puede inducir cambios rápidos en los procesos de la membrana o afectar las vías metabólicas al inhibir las proteínas del sistema apoplastico, así como interferir con el manganeso para activar algunas reacciones enzimáticas (Epstein y Bloom, 2005; Blevins y Lukaszewski, 1998).

COBRE: Este elemento es constituyente de varias enzimas oxidativas como la ácido ascórbico oxidasa, citocromo oxidasa, plastocianina, polifenol oxidasa, también es cofactor de enzimas reductasas, las cuales pueden reducir el nitrito a hiponitrito (Epstein y Bloom, 2005).

MANGANESO: Este elemento juega un papel importante en la fotosíntesis, ya que forma parte junto con el cloro de un complejo que rompe la molécula de H₂O y suplementa los electrones al fotosistema II, el rompimiento del agua se da por una oxidación ($2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$). El manganeso actúa como activador de diversas enzimas como la málico deshidrogenasa, oxalo-succinico deshidrogenasa, también interviene en el metabolismo del nitrógeno al activar la nitrito reductasa, la hidroxilamina reductasa, y puede influir en la absorción de K⁺ y Ca⁺⁺ (Sinha, 2004; Epstein y Bloom, 2005).

CLORO: el cloro tiene una función no específica como regulador osmótico y funciones específicas como componente del fotosistema II, en la molécula que rompe la molécula de agua y genera O₂, activa el ingreso de protones de ATPasa al tonoplasto. Es uno de los solutos con mayor movilidad a través de la membrana de las células estomáticas, operando el sistema de cierre y apertura (Sinha, 2004; Epstein y Bloom, 2005).

Además de los Macro y Micronutrientes los cultivos *in vitro* necesitan de una fuente alterna de carbono, esta fuente generalmente es la sacarosa, la cual sufre en parte el carbono que fijan de la atmósfera por la fotosíntesis. También se le adicionan elementos orgánicos como: vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento. (George y Sherrington, 1993; Kothari *et al.*, 2004; Ramaje y Williams, 2002a; 2003; Pérez y Martínez, 1994).

1.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Son sustancias orgánicas sintetizadas por las plantas o de origen artificial, con elevada actividad fisiológica, para modificar el crecimiento y desarrollo de las plantas (fig. 3), generando señales que intervienen en la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. Los reguladores de crecimiento, por su estructura química y función, se dividen en varias clases: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, y ácido abscísico. Estos reguladores u hormonas son activas en muy bajas concentraciones. (George y Sherrington, 1993; Sinha, 2004; Salisbury y Roos, 1992; Fosket, 1994).

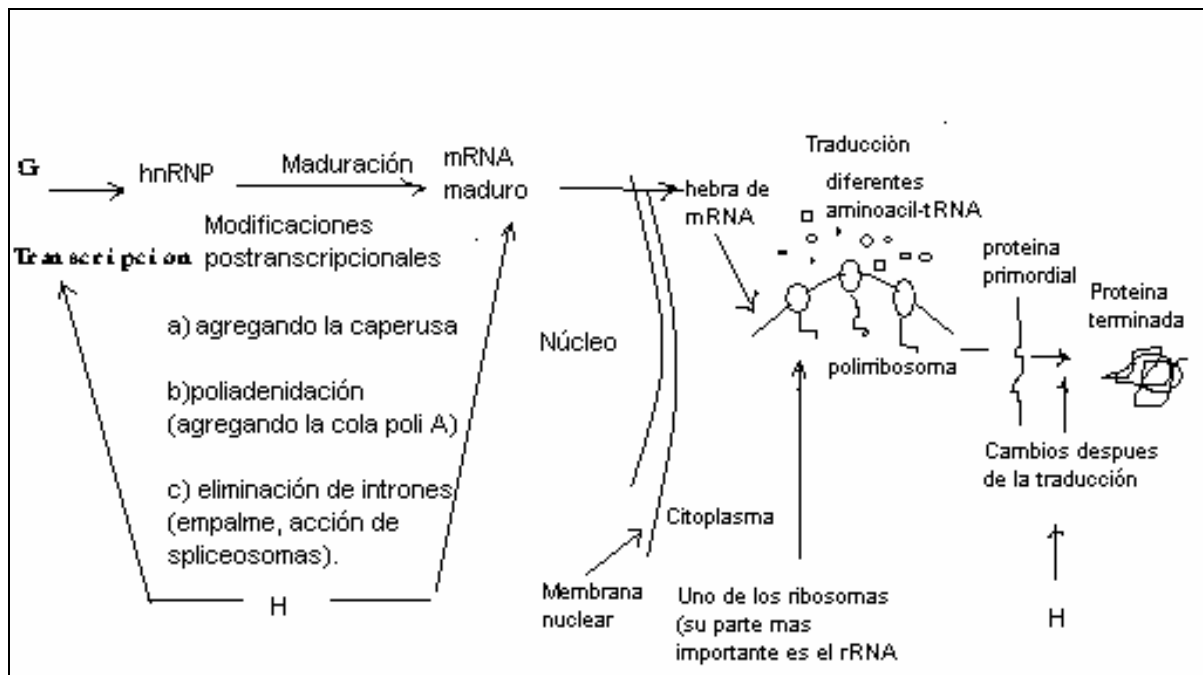


Fig. 3 Esquema de las posibilidades de acción de las hormonas (H), sobre la transcripción, traducción, modificaciones postranscripcionales y después de la traducción. (hnRNP) complejo heterogéneo de RNA con proteínas y RNA del núcleo. (Según A. Theologis, 1986, modificado por Jankiewicz 2003)

De entre los reguladores auxinas y citocininas son las sustancias más importantes en la regulación del crecimiento y morfogénesis en cultivo de tejidos, por su interacción con sustancias endógenas, que activan el desarrollo (George y Sherrington, 1993; Sinha, 2004; Salisbury y Roos, 1992; Fosket, 1994).

1.4.1. CITOCININAS

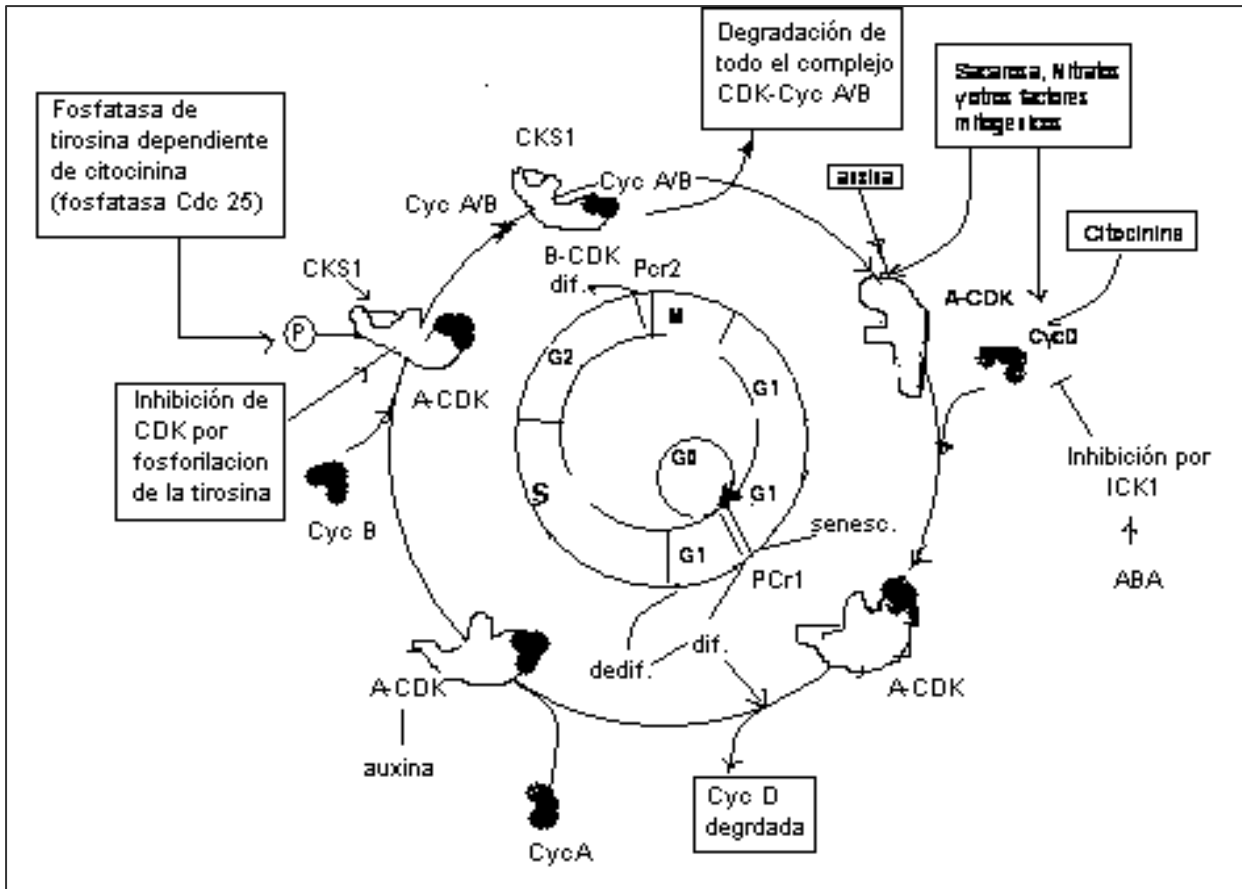


Fig. 4 Modelo del ciclo celular y su regulación con citocininas y auxinas. Al inicio G1, la sacarosa, nitratos u otros factores mitogénicos causan la producción de las proteínas CDK y ciclina D necesarias para el avance del ciclo, la ciclina también es estimulada por las citocininas y la producción de A-CDK por auxina, en el punto crítico (PCr1) la célula sigue varias vías ya sea continuar con el ciclo, la diferenciación, la senescencia o detener temporalmente su desarrollo (G₀), las células diferenciadas pueden sufrir dediferenciación y regresar a la continuación del ciclo. Figura tomada de: Jankiewicz, 2003

Las citocininas tienen un papel importante en varias fases del crecimiento y desarrollo de las plantas (Sakakibara, 2006). Se ha mencionado que pueden retardar la senescencia previniendo la oxidación de ácidos grasos insaturados en membranas y rápido bloqueo de radicales libres, como el superóxido y el radical hidróxido (Salisbury y Roos, 1992; Sakakibara, 2006); también influyen en diversos procesos bioquímicos como: estimulación en la biosíntesis de ácidos nucleicos y diferentes proteínas, entre otras, enzimas como proteasas y Ribonucleasas (George y Sherrington, 1993; Caba *et al.*, 2000). Las citocininas pueden ser endógenas o sintéticas, entre las endógenas se encuentran la Zeatina y la Zip, ó (N⁶(dimetilalilamino)-purina), ó N⁶(Δ⁶-isopentenil)-adenina, la cual se puede presentar de forma libre o unida a RNAt (George y Sherrington, 1993; Jankiewicz, 2003). Se han llegado a sintetizar más de 70 citocininas la mayoría de

estas tiene muy poca actividad biológica o son inocuas por lo que no se les menciona. (George y Sherrington, 1993; Jankiewicz, 2003).

Entre las citocininas sintéticas, que presentan una mayor actividad biológica se encuentran: cinetina (Kin o 6-fulfuril amino purina) y Bencilaminopurina (BAP), que son usadas con más frecuencia, debido a su costo y al fuerte efecto que tienen en un gran número de plantas. (George y Sherrington, 1993; Sinha, 2004; Salisbury y Roos, 1992; Jankiewicz, 2003). Aunque la producción de citocininas en las plantas se da de manera natural, muchos órganos y tejidos en cultivo *in vitro*, no pueden hacer una síntesis suficiente para mantener el crecimiento, por lo que se requiere agregarlas al medio, ya que promueven la iniciación, directa o indirecta de órganos. (George y Sherrington, 1993; Evenor *et al.*, 2006). El efecto en el cultivo puede ser muy variado de acuerdo a la citocinina usada, tipo de medio o el cultivo (Ilíina, 2006; George y Sherrington, 1993),

A pesar de su importancia en el cultivo no se tienen claros los mecanismos de acción ni de síntesis, algunos de estos puntos se han aclarado con los trabajos de Zachau *et al.*, (1966) citado en Jankiewicz, (2003), primeros en encontrar en la cercanía del anticodón del RNA-t una base identificada como 2ip, posteriormente se ha mostrado que en este lugar ocurre el ribósido de 2ip así como el de otras citocininas, en los que la secuencia de tres bases del anticodón RNA-t empiezan con uracilo; también se ha observado que, están presentes en la síntesis de RNA o estimulando la actividad enzimática (fig.3), actualmente, con las herramientas de la biología molecular se han estado encontrando los componentes estructurales para la biosíntesis y la transducción de señales (Jankiewicz, 2003; Sakakibara, 2006), para la determinación del mecanismo real mediante el cual trabajan estas hormonas.

La presencia de citocininas, es necesaria para inducir la división celular, en su ausencia, la división es prolongada, por lo que se ha sugerido que intervienen en la síntesis de proteínas involucradas en la formación y función del aparato mitótico (ver fig.3 y 4). En cultivos donde las citocininas son limitadas, la división del núcleo se detiene en un estado del ciclo celular y se activa en un medio con presencia de citocininas (George y Sherrington, 1993; Jankiewicz, 2003).

Las citocininas están fuertemente relacionadas con la incorporación de nitrógeno y fósforo en las plantas (factores mitogénicos ver fig.4), ya que cuando alguno de estos nutrimentos disminuye, la cantidad de citocininas decrece, esto podría deberse a la poca actividad de la nitrato-reductasa, la síntesis de proteínas, otras fitohormonas o las

reservas de estos minerales (Groot *et al.*, 2003; Sakakibara, 2006). Adicionalmente se ha visto que la incorporación de citocininas exógenas, puede suprimir la actividad de genes involucrados cuando hay limitación de fosfatos y nitratos (Groot *et al.*, 2003).

ESTABLECIMIENTO DEL PROBLEMA.

Desde el inicio de las técnicas del cultivo *in vitro* hasta la actualidad, se ha trabajado sobre los efectos de la cantidad adecuada de sales minerales o de un mineral en particular, así como los reguladores de crecimiento, asociados a la morfogénesis o al crecimiento del cultivo.

Muchos otros estudios han llegado a establecer que una formulación adecuada de sales minerales y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo tiene gran importancia para la regeneración del explante (Murashige y Skoog, 1962; Ramage y Williams, 2002a); otros ejemplos de este tipo de estudios son : la regeneración de plantas a partir de células en suspensión de madera rosa de la india (*Dalbergia latifolia* Roxb.), donde se comparó el efecto de 3 medios de cultivo y varias fitohormonas (Pradhan *et al.*, 1998); Kotari *et al.* (2004), quienes regeneraron plantas de *Eleusine coraca* (L.) Gaertn, en cultivo *in vitro* a través de la manipulación de nutrientes inorgánicos; Nuri y Read (2004), usaron un nuevo medio de cultivo, para la propagación de avellanas y otras plantas.

La gran mayoría de estos estudios no establecen el efecto directo en la producción de biomasa comparado con el consumo o disminución de los minerales en el medio, pocos estudios hay en la actualidad que mencionan esta relación. Padgett *et al.*, (1996), investigaron los niveles de aminoácidos libres y la regulación de la entrada de nitrato en células de maíz cultivadas en medio MS líquido. Kaul y Hoffman (1993), estudiaron la inhibición del amonio y efectos en el crecimiento de callos de *Pinus strobus* L. en medio MS suplementado con BA y ANA, donde encontraron, que el medio suplementado con NH_4NO_3 , es el tratamiento que responde mejor induciendo un aumento de peso.

Hahn *et al.*, (1997), trabajaron cultivos en medio líquido y en un biorreactor con células de maíz transgénicas y normales, donde, se evaluó el crecimiento, asimilación de nutrimentos (nitrógeno, sacarosa, glucosa y fructosa) y la síntesis de metabolitos secundarios. Gorret *et al.*, (2004), en un estudio con la palma de aceite (*Elaeis guineensis*), evaluaron el efecto del nitrógeno, tamaño del inoculo y el medio modificado en la producción de biomasa, encontrando que esta tiene un incremento considerable, la cantidad de sacarosa en el medio se terminó rápidamente determinándose que existe una fuerte relación del crecimiento con los azúcares y nitrógeno. Ramage y Williams (2002a; 2003), estudiaron la asimilación de nutrientes, en diferentes estados de la organogénesis en plantas de tabaco. En particular, la dinámica del nitrógeno, fósforo y calcio, en este estudio utilizaron, BAP como regulador del crecimiento.

Aunque alrededor de las cactáceas hay un gran interés comercial, no existen reportes donde se estudie la asimilación de nutrientes en cultivo *in vitro* en comparación a otras familias de plantas, donde la inducción de plántulas por organogénesis es la mas frecuente (Moebius-Goldammer *et al*, 2003; Hubstenberger *et al*, 1992).

No se tiene registrado, ningún trabajo sobre los efectos de citocininas en la asimilación de nutrimentos como N, P, K y sacarosa, en cactáceas creciendo en medio líquido; de hecho, para *Strombocactus disciformis*, solo se tiene conocimiento de dos publicaciones, uno de Godínez (2002), que realizó un trabajo ecológico *in situ* sobre la especie y otra, de Pérez (2002), quien trabajó con crioconservación de callos.

Con base en lo anterior, por las características que tiene esta planta (endémica y en peligro de extinción) y para tener una aproximación acerca de su metabolismo en cultivo *in vitro*, se decidió llevar a cabo el cultivo de células de *Strombocactus disciformis* y determinar el efecto de tres citocininas sobre el peso fresco y nutrimentos (sacarosa, nitratos, fosfatos y potasio), durante su desarrollo en medio MS líquido, por lo que se plantearon los siguientes objetivos.

2.0. OBJETIVOS

2.0.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de BAP, Kin y 2ip con tres concentraciones diferentes (1, 2.5, 5 mg/l), en el peso fresco en células de *Strombocactus disciformis* y la concentración de: sacarosa, nitrógeno, fósforo y potasio, en medio MS líquido, durante 30 días de desarrollo *in vitro*.

2.0.2. Objetivos particulares.

- a) Establecer un cultivo en medio líquido de células de *Strombocactus disciformis* a partir de callos.
- b) Evaluar el efecto de BAP (1, 2.5, 5 mg/l), Kin (1, 2.5, 5 mg/l), y 2ip (1, 2.5, 5 mg/l), en el peso fresco de células de *S. disciformis*, creciendo en medio líquido.
- c) Evaluar el efecto de las citocininas BAP (1, 2.5, 5 mg/l), Kin (1, 2.5, 5 mg/l), y 2ip (1, 2.5, 5 mg/l), sobre la dinámica de nutrientes en el medio (sacarosa, nitrógeno, fósforo. potasio).

3.0. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material y desinfestación para el cultivo.

Se obtuvo una planta adulta de *Strombocactus disciformis*, donada por el Biol. Marcial García Pineda del Jardín Botánico Iztacala de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. La planta se desinfestó sumergiéndola en una solución jabonosa y se enjuagó con agua corriente, posteriormente se sumergió en alcohol etílico al 96% por 5 minutos, el alcohol se desechó y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 4 % y 0.1 ml/l de tritón X100, durante 15 minutos, trasladando la planta a la cámara de flujo laminar para retirar el cloro y sumergirla en una solución estéril de Benomil (Benlate[®], Quimex, Méx.), a una concentración de 500 mg/l durante un minuto; posteriormente se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

Inducción de callos.

Del material desinfestado se cortaron las areolas, las cuales fueron sembradas en frascos de vidrio de 250 ml, que contenían 20 ml de medio Murashige Skoog (1962) sólido, adicionado con 0.5 mg/l de tiamina, 0.5 mg/l de BAP y 2mg/l de 2,4-D, a un pH de 5.8 (+/- 0.1). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 21+/-1 °C y una intensidad luminosa de 80 a 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; los explantes con formación de callos se subcultivarán a medio nuevo a los 90 días.

Establecimiento del cultivo en medio líquido y experimento factorial

Los callos de *S. disciformis*, se transfirieron a matraces con 50ml de medio MS líquido, adicionado con 1mg/l de tiamina, 5mg/l de BAP y 2mg/l de 2,4-D, y manteniéndose en agitación a 100 rpm, por 60 días. El material establecido, se utilizó en un diseño factorial para evaluar el efecto de citocininas en el aumento de peso fresco y dinámica de nutrimentos en el medio, el cual, estuvo constituido por un control sin citocininas y tratamientos con tres diferentes citocininas (BAP 1.0, 2.5 y 5.0 mg/l, KIN 1.0, 2.5 y 5.0 mg/l y 2ip, 1.0, 2.5 y 5.0 mg/l), con nueve repeticiones c/u, en matraces de 50 ml con 15 ml de medio. Las muestras se pesaron antes de transferirlas y posteriormente a los 16, 23 y 30 días, tomando tres muestras por tratamiento, las que se filtraron y pesaron en una balanza analítica; el sobrenadante obtenido se uso para evaluar el contenido de sacarosa, nitrógeno, fósforo y potasio en el medio, utilizando las siguientes técnicas.

Cuantificación de sacarosa (Micro determinación de Van Mandel, 1969).

Para la cuantificación se utilizó un estándar de sacarosa (1mg/ml) en concentraciones de 0,20,40,60,80,100 μ l. Se tomó un mililitro de medio de cultivo líquido y se diluyó con 9 ml de agua destilada, de esta dilución, se tomaron 50 μ l y se diluyeron 1:1 con agua destilada, se agregaron 100 μ l de KOH al 30% dejando reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, se le adicionaron 3 ml de solución de Antrona (ver apéndice 1). La mezcla se incubó a 40°C durante 20 minutos y se obtuvo la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer.

Cuantificación de Fosfatos. Se determinó la concentración de fosfatos en el medio de cultivo por la técnica de colorimetría descrita por: Whorton y Mc Carty, (1972)

Se utilizó un estándar de KH_2PO_4 10 μ M y se midió la absorbancia a 660 nm. Para la cuantificación de las muestras se tomaron 200 μ l de medio de cultivo líquido, a los que se les agregaron 300 μ l de agua destilada y 0.5 ml de reactivo de color (ver apéndice 1), incubándose a temperatura ambiente durante 20 minutos para su evaluación.

Cuantificación de Nitratos. Se determinó la concentración de nitratos en el medio por la técnica de colorimetría descrita por (Cataldo *et al.*, (1975) citado por Hecht y Hans, 1990). Para la cuantificación se elaboró una curva patrón con KNO_3 (50mg/l), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer, para las muestras se tomaron 100 μ l de medio de cultivo y se les agregó 0.4 ml de ácido salicílico y se incubaron durante 20 minutos, al término de los cuales se agregaron 9.5 ml de NaOH 2M y se midió la absorbancia

Cuantificación de potasio (Flamómetro)

Para la cuantificación del Potasio se realizó un estándar de KCL a 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, posteriormente se procedió a la cuantificación de las muestras con un Flamómetro Jonway modelo PFP7, USA, las cuales tenían 1 ml de medio por 19 ml de H_2O .

Los datos fueron procesados el programa STATISTICA versión 6.0, Edición 98, StatSoft. Inc, USA.

4.0. RESULTADOS

En la determinación realizada inicialmente en un medio sin células, se pudo observar que la esterilización no afectó la concentración de los nutrimentos: sacarosa (fig. 6), fosfatos (fig. 7) y potasio (fig.9), sin embargo si se presentó una ligera disminución en la concentración de nitratos con respecto a la original, la cual fue aproximadamente de un 10% (fig. 8).

Se observó con respecto al control, que BAP no presentó diferencias significativas a los días 16 y 23 (fig.5, apéndice 4), al día 30 con BAP tubo un incremento en el peso y el control disminuyó (fig. 5, tabla 1), también se apreció que las citocininas cinetina y 2ip influyeron incrementando el peso fresco de los cultivos, en todos los casos (fig. 5). Se observaron algunas diferencias significativas (ver apéndice 3, 4 y tabla 1), entre reguladores de crecimiento antes de los 30 días (sobre todo con respecto a BAP) (apéndice 4), pero, estas diferencias no se encontraron al día 30 salvo con el grupo testigo, aún cuando se observó que en los tratamientos con 2ip (1) y cinetina (3) se presentó un aumento de peso de casi tres gramos (fig. 5 y tabla 1). Se puede observar en la figura 5, que el comportamiento de mayor incremento de peso se asoció de forma constante a la presencia de cinetina y de 2ip, por lo que estas hormonas parecen influir fuertemente durante los primeros días de cultivo en células de *S. disciformis*. Este comportamiento probablemente no debe ser el mismo que en otros tipos de cultivo, con material en plena diferenciación como la generación de brotes o raíz, de acuerdo a que el cultivo de células se desarrolla en un medio liquido a diferencia de los otros en medios semisólidos, lo que produciría una superficie de contacto diferente y muy probablemente una diferente absorción de nutrimentos.

Tabla1. Efectos de los reguladores de crecimiento en el peso fresco, promedio en base a tres repeticiones +/- desviación estándar.

Peso (gramos)	Reguladores de crecimiento								
	BAP			Kin			2ip		
Días/conc.	1	2.5	5mg/l	1	2.5	5mg/l	1	2.5	5mg/l
Día 16	0,8 +/- 0,36 B*	0,77 +/- 0,22 B*	0,22 +/- 0,09	0,4 +/- 0,223	1,7 +/- 1,37	0,58 +/- 0,6 B*	0,93 +/- 0,557 B*	0,883 +/- 0,72 B*	0,4267 +/- 0,59 B*
Día 23	0.48+/- 0,11 B*	1,47 +/- 1,55 B*	0,265 +/- 0,256	1,23 +/- 0,6	0,64 +/- 0,2	0,597 +/- 0,4 B*	0,95 +/- 1,54 B*	1,66 +/- 1,16 B*	1,63 +/- 1,75 B*
Día 30	0.77+/- 0,426	2,086 +/- 1,142	1,376 +/- 1,94	3,684 +/- 0,763	1,68 +/- 1,1	2,313 +/- 1,36	2,71 +/- 1,9	2,546 +/- 1,7	2,5 +/- 3,6

Tabla 2. Efectos de los reguladores de crecimiento en la dinámica de nutrimentos.

Sacarosa	Reguladores de crecimiento								
Gramos.	BAP			Kin			2ip		
Días/conc	1	2.5	5mg/l	1	2.5	5mg/l	1	2.5	5mg/l
Día 16	16,1 +/- 0,12	14 +/- 3,77	16,8 +/- 3,37	22,3 +/- 2,06	19,9 +/- 4,68	20,23 +/- 7,89	17,5 +/- 6,35	17,85 +/- 1,73	16,86 +/- 1,19
Día 23	17,8 +/- 1,4	14,4 +/- 1,38	19,35 +/- 0,876	18,4 +/- 7,74	19,9 +/- 2,8	18,76 +/- 6,78	16,3 +/- 3,45	12,97 +/- 6,85	14,99 +/- 5,2
Día 30	16,91 +/- 1,54	13,61 +/- 3,77	15,3 +/- 3,17 A*	25,77 +/- 3,97	19,9 +/- 4,5	22,4 +/- 2,82 A*	16 +/- 1,4	14,9 +/- 1,33 A*	16,127 +/- 6,88
Fosfatos	mg								
Día 16	1167,7 +/- 118	1140,6 +/- 216,5	1420,2 +/- 147,7	798,7 +/- 176,9	717,3 +/- 175,2	744 +/- 97,3	1105,4 +/- 378,9	1466,3 +/- 170,3	1469,9 +/- 216,8
Día 23	1402,8 +/- 289,6	1212,4 +/- 225,7	1472,7 +/- 207,7	1015,6 +/- 207,5	1126,5 +/- 435	1180,3 +/- 312,56	1224,9 +/- 692,1	898,7 +/- 631,1	1488,7 +/- 157,7
Día 30	1569,4 +/- 102,2 A*	1317,6 +/- 333,8 A*	1197,9 +/- 438,5 A*	1098,4 +/- 250,7 A*	728,6 +/- 167,3	921,58 +/- 363,2	1010,8 +/- 448,7 A*	1463,6 +/- 191	1409,5 +/- 157,7 A*
Nitratos	mg								
Día 16	5382,6 +/- 1359,4 C*	5610,7 +/- 2584,9 C*	2193,2 +/- 1531,7 C*	19844,7 +/- 1295,5 C*	21737,4 +/- 1260 C*	20906,4 +/- 1657,3 C*	16467,8 +/- 3699,1 C*	18676,8 +/- 887,2 C*	18757,4 +/- 333,1 C*
Día 23	3187,7 +/- 82526,7	5173,2 +/- 2092,1	3993,7 +/- 2091,9	9728 +/- 6630,8 C*	3723 +/- 2624,7 C*	8263,2 +/- 2675,7	17865,3 +/- 2074 C*	20293,4 +/- 2845 C*	13131,2 +/- 9449 C*
Día 30	4624,2 +/- 2210	4791,6 +/- 3419,8	6173,8 +/- 8623,2	6325,8 +/- 5001	9381,1 +/- 3267	8757,7 +/- 4753,3	15054,2 +/- 3048,3	11713,9 +/- 2132,4	8491,3 +/- 3673,3
Potasio	mg								
Día 16	4723 +/- 487	2905,9 +/- 811	5070,1 +/- 471	2703,3 +/- 589,7	6102,7 +/- 1981,7	3947,2 +/- 374	6123,2 +/- 3511,4	4595,5 +/- 1703,4	7975,6 +/- 3625,4
Día 23	4649,7 +/- 224,4	4099,2 +/- 594,4	4083,9 +/- 237	3583 +/- 1940,3	3615,5 +/- 392	3797,7 +/- 480,1	5421,4 +/- 4620,7	5416,4 +/- 5341	8651,6 +/- 3734,2
Día 30	4168,1 +/- 93	4778,7 +/- 1004,9	3791,5 +/- 1396,3	4626 +/- 2688	5630,1 +/- 2838,6	4609,4 +/- 3086,6	5187 +/- 087,5	5303,7 +/- 4309,8	11630,9 +/- 371,9 A B*

A*= Tratamientos con presencia de reguladores que presentaron diferencias significativas, B*= presentaron diferencias en los días de cultivo, C*= presentan diferencias entre reguladores y el día de cultivo (ver apéndice 3, 4 análisis de varianza y pruebas de tukey), promedio de tres repeticiones +/- desviación estándar.

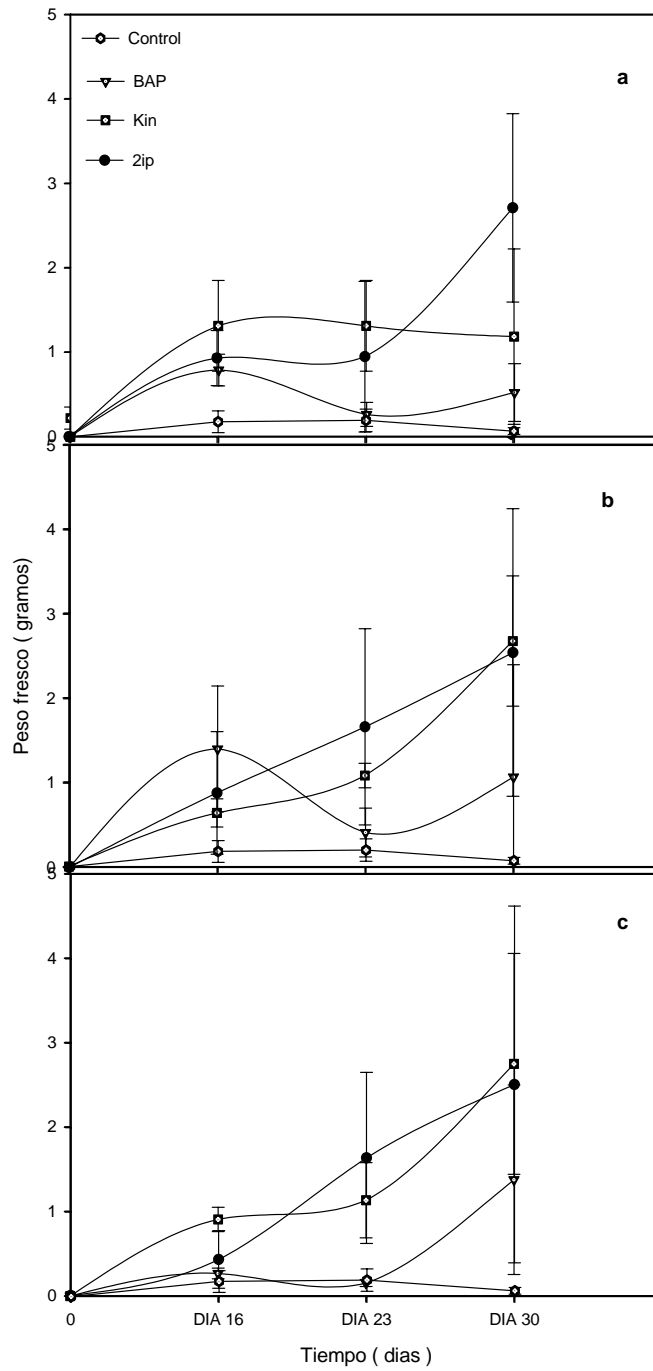


Fig-5. Peso fresco de células de *Strombocactus disciformis*, datos expresados en gramos (a, b y c, en el marco superior derecho de cada grafica corresponden a 1, 2.5 y 5 mg/l respectivamente)

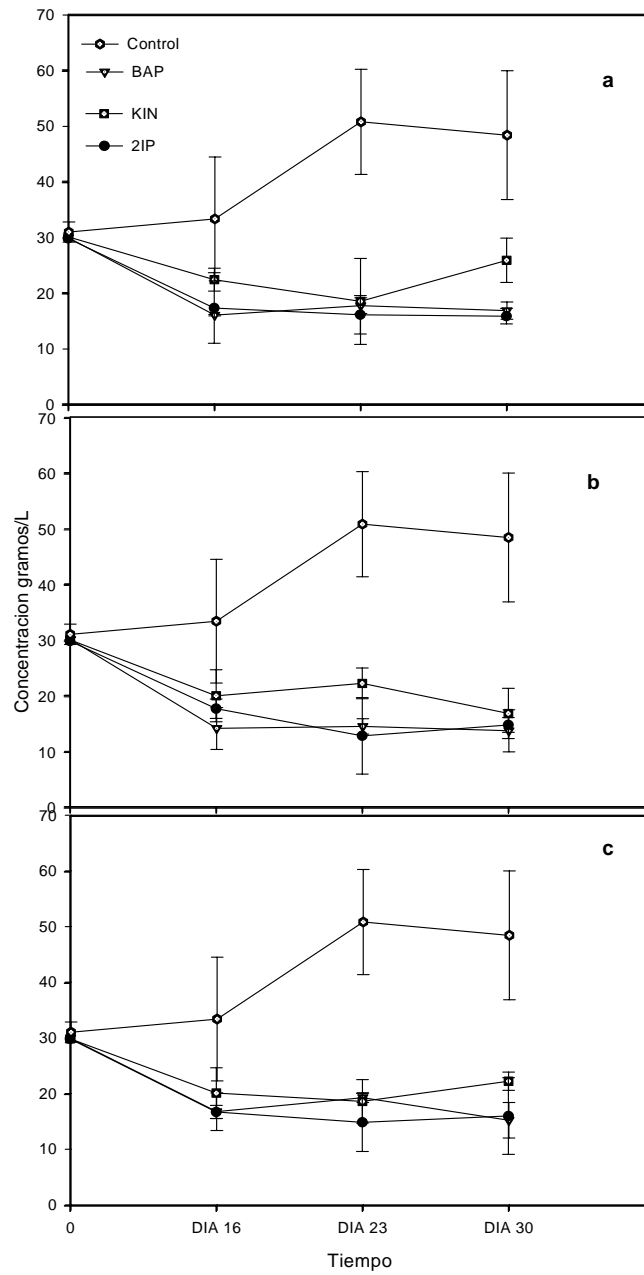


Fig.-6. Concentración de sacarosa en el medio de cultivo líquido (MS) en base al promedio de tres repeticiones +/- su desviación estándar, datos en gramos/litro (concentraciones a: 1, b: 2.5 , c: 5mg/l).

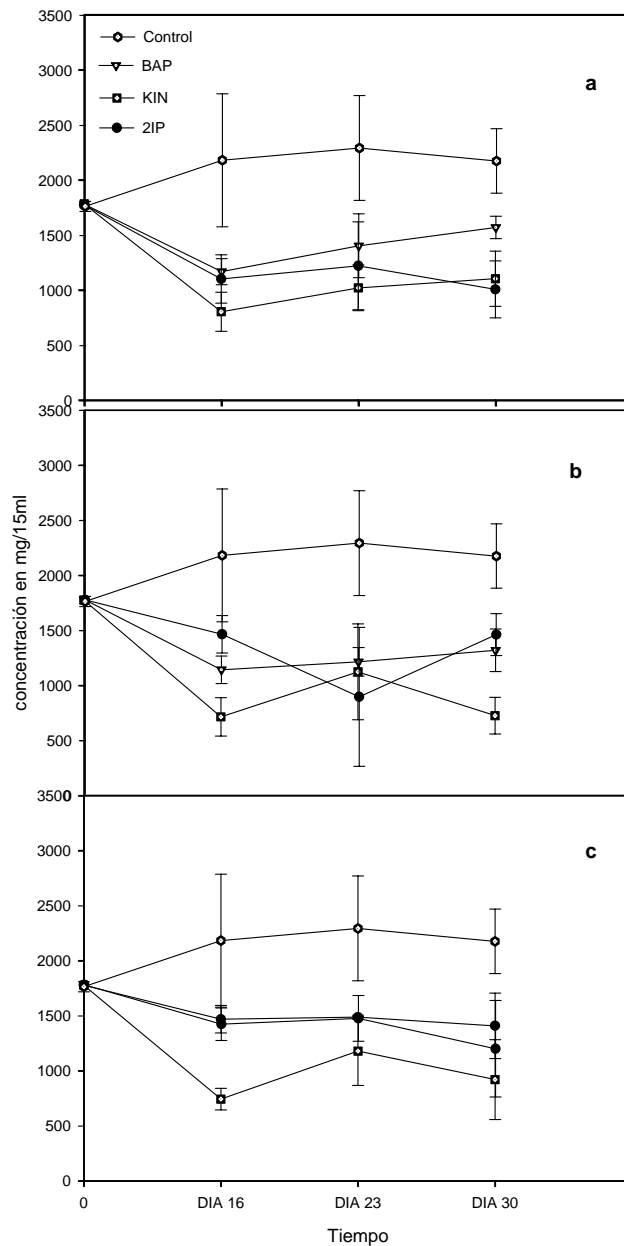


Fig.-7. Fosfatos presentes en el medio de cultivo (MS), con células de *Strombocactus disciformis*, en base a tres repeticiones +/- su desviación estándar, datos expresados en μg /para un volumen de 15 ml. (concentraciones a: 1, b: 2.5, c: 5mg/l)

En lo referente a la dinámica de los nutrientes contenidos en el del medio, se pudo observar con respecto al testigo que las citocininas tuvieron un efecto importante, al observarse una disminución importante de los nutrientes del medio en los tratamientos con presencia de

reguladores (figuras. 5, 6, 7, 8 y 9, tabla 2); también se presentaron diferencias significativas entre las citocininas con respecto a la dinámica de los nutrimentos y los diferentes días de cultivo (tabla 2). Particularizando, de los nutrimentos, la sacarosa disminuyó de manera importante a partir del día 16 (50% aproximadamente, en todos los casos), determinándose diferencias significativas (prueba de Tukey con un α de 0.05), en Kin 1 con respecto a BAP 2, 2IP 2 y 2IP3; por otro lado, también se registraron diferencias entre Kin 3 con BAP 2 (ver tabla 2 y fig. 6), estas diferencias se determinaron por ligeros incrementos en la sacarosa presente en el medio al día 30, sacarosa producida seguramente por las células, en los tratamientos con Cinetina (fig.6).

Con respecto a la dinámica de los fosfatos se observaron diferencias significativas entre las tres citocininas (tabla 2), sin embargo, no se presentaron diferencias en la concentración o el día. Las diferencias en la dinámica del fosfato se observaron en los medios con Kin 2 en relación a BAP 1, BAP 2 y 2ip 3 y por otro lado en Kin 3 con 2ip 3, estas diferencias (ver apéndice 3 y 4 de análisis de anava y pruebas de Tukey) permiten mencionar que la cinetina influyó en la disminución de fosfatos a partir del medio desde los primeros días de cultivo, presentando pequeñas diferencias respecto a los otros reguladores de crecimiento (fig. 7).

En este estudio con células en cultivo de *S. disciformis*, observamos que la disminución de fosfatos a partir del medio se presentó en general hasta en un 50%, a partir de los 16 días, manteniéndose así hasta el día 30.

Con relación a los nitratos, estos disminuyeron de manera importante en el medio, de forma que se observaron diferencias inicialmente entre las citocininas y también en la dinámica de nitratos durante los días de incubación de las células (tabla 2, fig. 8), donde se aprecia que BAP en sus tres concentraciones, es la citocinina que más influyó en la disminución de nitratos en el medio al día 16 presentando diferencias significativas con respecto a los otras dos reguladores de crecimiento (apéndice 4 y tabla 2); esto permitió encontrar diferencias entre esta hormona BAP en relación principalmente con 2ip y el testigo (apéndice 4, tabla 2). En general, hubo una fuerte disminución de nitratos en el medio, el cual, ocurrió en diferente día dependiendo de la citocinina; con BAP la disminución ocurre, durante los primeros 16 días; con Kin, esta disminución se inició a los 23 días y con 2ip se observó acentuada en el día 30 (fig. 8).

También se puede observar una alternancia de los nutrimentos principalmente los nitratos y fosfatos, con las citocininas. Con Kin disminuyen los fosfatos desde los primeros días y con BAP los nitratos (fig. 7 y 8).

Para el caso del potasio en el medio, se registró una disminución importante con diferencias significativas en la dinámica de este elemento en todos los tratamientos con citocininas con

respecto al control y la única diferencia significativa presentada entre las citocininas y sus concentraciones, fue con 2ip 3 (ver tabla 5), que registró un incremento del mismo en el medio al día 30 (fig.9c), al igual que ocurrió para el tratamiento testigo. No se puede descartar la posibilidad de que el potasio se liberó durante la incubación a partir de las células en cultivo.

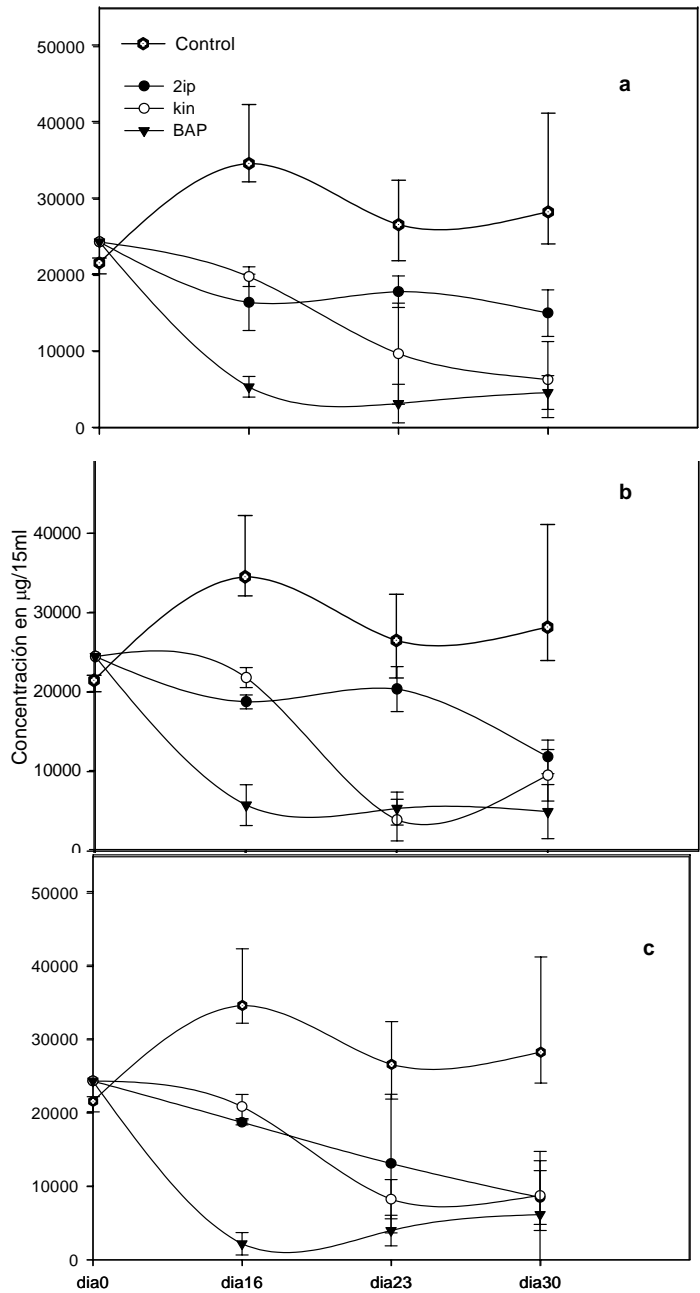


Fig.-8. Promedio de tres repeticiones de Nitrate presente en el medio de cultivo liquido (MS) +/- su desviación estándar, datos en µg/para un volumen de 15 ml (concentraciones a:

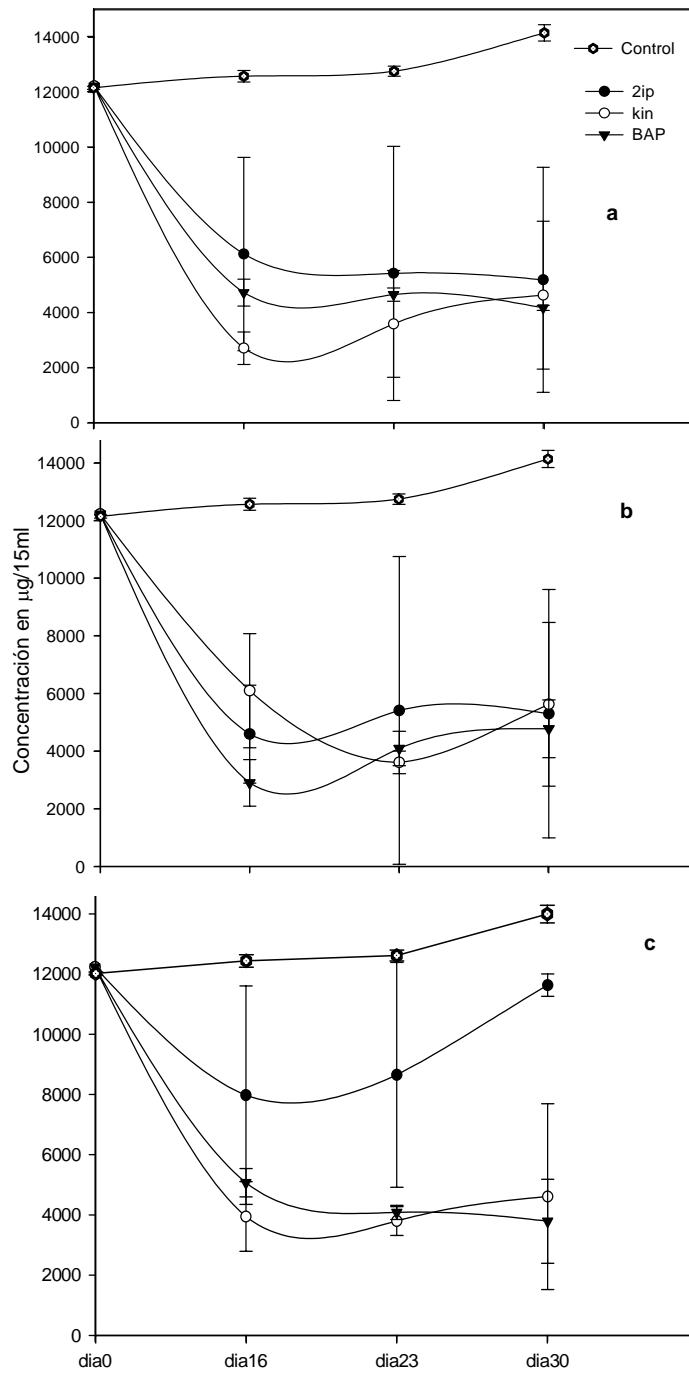


Fig. 9- Potasio presente en el medio de cultivo líquido (MS) en base a tres repeticiones +/- su desviación estándar, datos expresados en µg/15ml (concentraciones a: 1, b: 2.5, c: 5 mg/l)

5.0. DISCUSION

El crecimiento y la morfogénesis de los cultivos de tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro* están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo, en el que las citocininas tienen efecto en el crecimiento y división celular, así como en la asimilación de elementos minerales esenciales en el metabolismo y desarrollo de las plantas (Kothari *et al* 2004, Ramage y Williams 2002a; 2003; Nuri y Read, 2004), lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los que se aprecia que los tratamientos con citocininas tuvieron un efecto diferencial en la disminución de nutrientes esenciales en el medio de cultivo, al promover el aumento de peso fresco (no observándose diferencias entre los tratamientos) y amortiguar o disminuir la presencia de compuestos oxidados y necrosis. Lo contrario se observó en el control, donde hubo un mínimo aumento de peso a los 23 días, decayendo a los 30 días, lo que se vio reflejado en los nutrimentos presentes en el medio que se incrementan ligeramente, probablemente por la salida de estos a partir de tejidos funcionalmente dañados; tal situación fue similar a lo reportado por Ramage y Williams (2003), para un cultivo de tabaco sin citocininas. En el caso del tratamiento control en células de *S. disciformis*, el incremento en los nutrimentos presentes en el medio, pudo deberse también a tejidos dañados por efecto de las condiciones de cultivo (con gran cantidad de material oxidado), observación acorde con lo reportado por Nuri y Read (2004), quienes mencionan que un medio que no sea óptimo para el cultivo puede causar desordenes fisiológicos o la muerte del tejido.

También se observó que las citocininas tuvieron efectos diferentes sobre los nutrimentos de acuerdo a los días de incubación, permitiendo mencionar que se presenta una actividad diferencial entre ellas sobre los tejidos esto concuerda con Il'ina (2006), que menciona que el efecto de las citocininas es variado de acuerdo a la citocinina usada, tipo de medio o la especie en cultivo.

Respecto a los nutrimentos presentes en el medio, se aprecia que la esterilización no afectó la concentración de los nutrimentos ya que solo ocurrió una disminución en la concentración de nitratos; con relación a esto, Ramage y Williams (2003), mencionan que se puede presentar una precipitación de minerales por la interacción de Fe-EDTA y KH_2PO_4 , que estarían reaccionando con el calcio y los micronutrientes, pero no estarían influyendo de manera importante en la disminución de estos en el medio.

Por otra parte, se pudo observar que, en general la disminución de los nutrimentos se desarrolló en los primeros 16 días, durante los que la concentración de sacarosa disminuyó un 50%.

Así, aunque se pudo determinar que ocurrió un decremento importante de la concentración de sacarosa del medio, este no llegó a disminuir totalmente como se reporta para otros cultivos creciendo en medio líquido en los que la sacarosa disminuye totalmente hacia el día 10, observando un incremento de la glucosa y la fructosa, probablemente, mediado por una alta actividad invertasa (Gorret *et al.* 2004; Hahn *et al.*, 1997).

Parte de la disminución observada de la sacarosa en el medio, puede deberse a las interacciones entre el fósforo y el nitrógeno. Groot *et al* (2003), reportan una disminución de azúcares presentes en hojas de plantas, cuando ocurre una deficiencia de fósforo así como por la fijación de nitrógeno; al respecto, varios autores han mencionado que la disminución de sacarosa en el medio responde a la interacción que puede haber con el nitrógeno o un alto consumo de fósforo por parte del tejido, ya que se utiliza para proveer los esqueletos de carbono, en la síntesis de aminoácidos (Ramage y Williams, 2002; 2003; Scheible *et al.*, 1997; Raab y Terry, 1994). Por otro lado, la sacarosa también puede responder como aditivo o tener un efecto dominante entre los nutrimentos tomados del medio de cultivo inducido por la presencia de citocininas o auxinas (Evenor *et al.*, 2006), lo que se estaría apreciando en la fig.6, donde el control no presentó disminución de sacarosa.

A su vez, en el caso de los nitratos y fosfatos (fig. 7 y 8), se pudo observar que ocurrió una disminución alternada de estos minerales del medio de cultivo sobre todo, durante los primeros 23 días con las citocininas BAP y Kin, ya que con BAP disminuyen primero los nitratos y con Kin los fosfatos.

En el caso de los nitratos el comportamiento presentado fue semejante al reportado para algunos cultivos creciendo en medio líquido como: el cultivo de células de tabaco (Ramage y Williams, 2003), el cultivo de palma (Gorret *et al.*, 2004), maíz (Hahn *et al.* 1997), aunque Ramage y Williams (2003), reportan una disminución importante de nitrato en la fase meristemática en un cultivo de tabaco. Con respecto a esto, Hardy y Thorpe (1990) y Joy *et al.*, (1994 citado en Ramage y Williams, 2003), mencionan que la entrada y asimilación del nitrato, es importante para la iniciación de la fase meristemática y no tanto para la fase de crecimiento, sin embargo, en otro reporte, Ramage y Williams (2002b), indican que el metabolismo del nitrato fue alto en callos de tabaco en crecimiento. De acuerdo a lo observado, se puede decir que las citocininas influyen en la disminución de los nitratos del medio.

Con relación a los fosfatos (fig 7), se observó que estos no llegaron a consumirse totalmente del medio, al quedar disponible aproximadamente un 40% en todos los casos lo cual, está de acuerdo con reportes que mencionan una disminución

importante del fósforo en medios de cultivo líquido (Lumsden *et al.*, 1990 citado en Ramage y Williams 2002a),

El potasio en los primeros 16 días disminuyó en todos los tratamientos, seguramente actuando como regulador osmótico lo que está asociado con la entrada de varios nutrimentos en los cuales se encuentran los nitratos, relacionado a su vez con la disminución de sacarosa y fosfatos en el medio (Ramage y Williams, 2003; Schachtman, 2000).

La disminución observada de estos elementos en el medio tienen algunas similitudes con lo reportado por Ramage y Williams, (2003), en relación a los nutrimentos, ya que estos autores mencionan que los nitratos, fosfatos y potasio disminuyeron simultáneamente, en la fase de desarrollo meristemático y proceso de diferenciación. En el caso del cultivo de *S. disciformis*, también se apreció una correspondencia en la disminución simultánea de los nutrimentos hasta el día 16, sobre todo, de sacarosa, fosfatos y potasio, los nitratos presentaron variaciones por el tipo de citocinina, esto aun cuando no se encontraban en una fase meristemática.

6.0. CONCLUSIONES

-Con respecto al testigo, se pudo observar que BAP, Kin y 2ip influyeron en el aumento de peso fresco en células de *S. disciformis* cultivadas *in vitro* en medio líquido, lo cual se acentuó al día 30.

Las citocininas que se observaron fuertemente asociadas al comportamiento descrito fueron 2ip y Cinetina.

-Se observó una marcada influencia de BAP, Kin y 2ip en la dinámica de los nutrimentos ya que hubo una importante disminución de ellos con respecto al testigo.

-Se determinó que cada citocinina presentó un efecto diferente en la dinámica de nutrimentos del medio, en relación al día de incubación.

-También se observó con respecto al control una disminución simultánea de sacarosa, fosfatos y potasio en el medio líquido con presencia de citocininas al día 16, por lo que se determinó que hay una relación importante entre los nutrimentos del medio y la presencia de citocininas.

-De los nutrimentos del medio, el nitrato es el elemento que más variaciones presentó esto dependiendo de la citocinina usada o el día de incubación, ya que este elemento pudo estar influyendo en el establecimiento del cultivo o el aumento de peso fresco en células de *Strombocactus disciformis*.

-De acuerdo a lo anterior se vio que las células de *Strombocactus disciformis* requieren una gran cantidad de nutrimentos para el establecimiento del cultivo.

7.0. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez A. G., y Montaña C. 1997. Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del valle de Tehuacan: implicaciones para su conservación. *Acta Botánica Mexicana*. 40:43-56
- Arias M. S. 1997. Distribución de las cactáceas. *Suculentas Mexicanas /Cactáceas.*, CVS, CONABIO, SEMARNAP, UNAM. CVS publicaciones s.a. de c.v. 19-25.
- Blevins G. and Lukaszewski M. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 19: 481-500.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las cactáceas de México Vol.1*, Universidad Nacional Autónoma de México. México 743p.
- Bravo-Hollis H. y Sánchez-Mejorada H. 1991. *Las cactáceas de México vol II y III*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Caba M. J., Luz C. M., Fernández B., Gresshoff M. P., and Ligerio F. 2000. Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta*. 211: 98-104.
- Casas A., Valiente-Banuet A., Viveros L., Caballero J., Cortes L., Davila P., Lira R., and Rodríguez I. 2000. Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlan valley, Mexico. *Economic Botany*. 55(1) p. 129-166.
- CITES, 2005. Appendix I. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>.
- Epstein E. and Bloom J. 2005. *Mineral nutrition of plant: principles and perspectives 2^{ed}* edit. Sinauer Associates, 23 plumtree Road, Sunderland. USA. pp.170-234.
- Evans E. D., Coleman D., and Kearns. 2003. *Plant Cell Culture*. Edit. Bios Scientific Publishers, London and New York. 194pp.
- Evenor D., Cipovistky M., and Moshe R. 2006. On the genetic components of the responsiveness of *Kniphofia* to growth regulators and sugars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 85: 45-51.
- Flores-León R. and Ortiz-Montiel G. 2000. In vitro culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) (Pfeiffer) through areole activation of etiolated plants. *Haseltonia*, 7: 92-96.
- Flugge Ulf-Ingo. 1999. Phosphate translocators in plastids. *Annual Review Plant Physiology Plant Mol. Biol.* 50:27-47
- Fosket E. D. 1994. *Plant growth and development a molecular approach*. Academic Press. pag. 311-317
- Franco-Zorrilla J., González E., Bustos R., Linhares F., Leyva A., and Paz-Ares J. 2004. The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *Journal of Experimental Botany*. 55 (396):285-293.
- George F. E., and Sherrington D. P. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Tomo 1. British Library 386pp.

Godinez A. 2002. Informe final del proyecto V039. Evaluación de dos cactáceas mexicanas incluidas en el apéndice 1 de la CITES. 87 paginas, informe en www.conabio.gob.mx

-Goniaszowska A., and Rychter M. A. 2000. Nitrate uptake by bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots under phosphate deficiency. *Plant and Soil* 226: 79-85

-Groot C. C., Marcelis F.M. L., Boogaard V. R., and Kaiser M. W. 2003. Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth. *Plant and Soil*. 248:257-268.

-Gorret N., Samsul K. R., Sheldon F. O., Willis B. L., Philip A. L., ChoKyun R., and Sinskey J. A. 2004 Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *Journal of Biotechnology*. 108: 253-263.

-Hammond P. J., Broadley R. M., and Whithe J. P. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany*. 94: 323-332.

-Hahn J. J., Eschenlauer C. A., Narrol H. M., Somers A. D., and Srien Friedrich. 1997. Growth kinetics, nutrient uptake, and expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly (β -hydroxybutyrate) synthesis pathway in transgenic Maize cell suspension cultures. *Biotechnol. Prog.* 13: 347-354.

-Hecht U. and Hans M. 1990. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings. *Physiologia Plantarum*. 78: 379-387

-Hernández H. M. y Godinez A. H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.

-Hopkins G. W. 1999. Introduction to plant physiology^{2ed.} John Wiley & Sons. Inc. 60-71

-Hubstenberger J. F., Glayton P. W., and Phillips G. C. Micropropagation of cacti (Cactaceae), in Bajaj, Y. P. S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 20, High-tech and micropropagation IV. Berlin, Heidelberg Springer-Verlag.1992: 49-68.

-Il'ina L. E., Dodueva I. E., Ivanova N. M., and Lutova L. A. 2006. The effect of cytokinins on in vitro cultured inbred lines of *Raphanus sativus* var. *Radicula Pers.* With genetically determined tumorigenesis. *Russian Journal of Plant Physiology*. 53(4):514-522.

-Jankiewicz. 2003. Reguladores del crecimiento desarrollo y resistencia en plantas, Propiedades y acción. Vol.1. Universidad Autónoma Chapingo. Ediciones Mundi Prensa, México, pp 487

-Kammerer B., Fischer K., Hilpert B., Schubert S., Gutensohn M., Weber A., and Flugge Ulf-Ingo.1998. Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucosa 6-phosphate/phosphate antiporter. *The Plant Cell*. 10:105-117

Kania A., Langlade N., Martinoia E., and Nuemann G. 2003. Phosphorus deficiency-induced modifications in citrate catabolism and in cytosolic pH as related to citrate exudation in cluster roots of white lupin. *Plant and Soil*. 248: 117-127.

-Kaul K., and Hoffman S. A. 1993. Ammonium ion inhibition of *Pinus strobus* L. callus growth. *Plant Science*. 88:169-173.

-Kothari L. S., Agarwal K., and Kumar S. 2004 Inorganic nutrient manipulation for highly improved in vitro plant regeneration in finger millet- *Eleusine coracana*(L.) Gaertn. *In vitro Cell Dev. Biol.- Plant.* 40: 515-519.

-Larcher W. 1977. *Ecofisiología Vegetal*, Ediciones Omega Barcelona. 104-116

-Malda G., Suzan H., and Backhaus R. 1999. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crasulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae.* 81:71-87

-Mifflin J. B., and Habash Z. D. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany.* 53 (370):979-987.

-Moebius-Goldammer K., Mata-Rosas M., and Chavez-Avila V. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 39:388-393

-Norma Oficial Mexicana, 2002 Norma Oficial Mexicana, 2002. (Nom-059-ECOL-2001-2002). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación.* Segunda Sección (6 de Marzo del 2002) México, pp. 1-81.

-Nuri N. M., and Read P. E. 2004. An hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plant and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae.* 101:189-200

-Padgett E. P., and Leonard T. R. 1996. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *Journal of Experimental Botany.* 47(300):871-883.

-Perez Crisanto J. 2002. Criopreservación de *Strombocactus disciformis* (De Candolle) Britton y Rose, como alternativa de conservación de cactáceas amenazadas, Tesis-licenciatura FES. IZTACALA-UNAM.

Pradhan C., Pattnaik S., Dwari M., Patnait S. N., and Chand P. K. 1998. Efficient plant regeneration from cell suspension-derived callus of East Indian rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). *Plant Cell Reports.* 18:138-142

-Raab K. T., and Terry N. 1994. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology.* 10: 1159-1166

-Ramage M. C., and Williams R. R. 2002a. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology.* 38 (2):116-124

-Ramage M. C., and Williams R. R. 2002b Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. *Journal of Experimental Botany.* 53,373:1437-1443.

-Ramage M. C. and Williams R. R. 2003 Mineral uptake in tobacco leaf discs during different developmental stages of shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.* 21:1047-1053.

-Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México.* Ed. Limusa, 431p.

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

-Salisbury B., and Ross C. 1992. *Plant Physiology*. 4^{ta} ed. Wadsworth Publishing Company Belmont, California. 289-307.

-Sakakibara H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 57:431-449.

-SEMARNAP 1997. Programa de conservación de la vida silvestre y diversificación productiva en el sector rural. SEMARNAT. México.

-Schachtman P. D. 2000. Molecular insights into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 127-139.

-Scheible Rudiger-Wolf, González-Fontes A., Lauerer M., and Muller-Röber B. 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell*. 9:783-798.

-Schwarz G. and Mendel R. R. 2006. Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 623-47

-Sinha R. K. 2004. *Modern Plant Physiology*. Alpha Science International Ltd. 100-121

-Smith W. F., Rae L. A., and Hawkesford J. M. 2000. Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 236-245.

-Smith W. F., Mudge R. S., Rae L. A. and Glassop D. 2003. Phosphate transport in plants. *Plant and Soil*. 248:71-83.

-Takabatake R., Hata S., Taniguchi M., Kouchi H., Sugiyama T., and Izui K. 1999. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial phosphate transporters in soybean, maize, rice, and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. 40: 479-486

-Van Handel, E. 1969. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem*. 22:280-283.

Walch-Liu P., Neumann G., Bangerth F., and Engels C. 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphology in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 51(343):227-237.

-Whorton D. C., and McCarty, R.E. 1972. *Experiments and methods in biochemistry*. Mc Millan, N.Y.

8.0. APENDICES

APENDICE 1. Reactivos

Cuantificación de sacarosa (Micro determinación de Van Mandel, E.1969)

Reactivos: KOH al 30%, H_2SO_4 al 70%, Reactivo de antrona diluir 150mg en 100ml de H_2SO_4 AL 70%, estándar de sacarosa 1mg/ml, agua destilada. Con lo cual se procedió a la elaboración de la curva de sacarosa leyendo en el espectrofotómetro a 620nm.

Cuantificación de Fosfatos (Whorton, D. C. y Mc Carty, R. E. 1972)

Reactivos : (reactivo de color- 2g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ con < (0.0005% PO^-), 36ml de agua destilada, 4ml de molibdato de amonio al 16% en H_2SO_4 10N).

Se elabora la curva patrón de 10 a 50-100 μM de KH_2PO_4

Cuantificación de Nitratos.

Reactivos: Ácido acetyl salicílico al 5% en H_2SO_4 , concentrado, NaOH 2M, Solución stock de KNO_3^- a 50mg/l para la curva la cual fue de 0 a 100 μl y de 100 a 0 de H_2O .

APENDICE 2. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO (Murashige y Skoog 1962).

SOLUCION A (Macronutrientes)	
Compuesto	Pesar en gramos
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3.7
KH ₂ PO ₄	1.7
CaCl ₂ . 2H ₂ O	4.4
KNO ₃	19.0 -
NH ₄ NO ₃	16.5

Colocar en orden los compuestos, agregando inicialmente un poco de agua a un vaso de un litro, agitando -- constantemente, final mente afore a 1 litro de solución y guarde en frío

SOLUCION B	(Micronutrientes)
Compuesto	Pesar en miligramos
H ₃ BO ₃	620 0.62gr
MnSO ₄ . 4H ₂ O	2000 2.0 gr
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	830 0.83gr
KI	83 0.083gr
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25 ml*
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5 ml*
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.5 ml*

Seguir el mismo procedimiento que para la sol. A.

*Se prepara de cada compuesto una solución por - separado conteniendo 100 mg del - compuesto en 100 ml. de agua destilada, de cada solución tomar la cantidad indicada.

Solución C	Na ₂ EDTA	373 mg y	FeSO ₄ .7H ₂ O	278 mg en 100 ml. de agua destilada.
------------	----------------------	----------	--------------------------------------	--------------------------------------

Para preparar el medio finalmente se vierte un poco de agua en un vaso de 1000 ml. y se agrega en orden las siguientes cantidades, agitando constantemente.

Solución A 100 ml.; solución B 10 ml.; solución C 10 ml.; Posteriormente agregar la parte orgánica. Fuente de energía y soporte: Sacarosa (azúcar) 30 g/l Tiamina 1mg/l

*Agar (solo en medio sólido) 7 g/l

APENDICE 3. Análisis de varianza bifactoriales de los tratamientos.

Anava de sacarosa trat-concentración/sacarosa

1-TRATAMIE, 2-CONCENT

	df	MS		df	MS		
	Effect	Effect		Error	Error	F	p-level
1*	2	*203,734253		72	16,5470543	*12,312418	2,51637E-05
2	2	36,3336983		72	16,5470543	2,19578052	0,118668653
12	4	5,19386482		72	16,5470543	0,31388456	0,867812276

Anava trat.-dia/fosfatos

1-TRATAMIE, 2-DIA

	df	MS		df	MS		
	Effect	Effect		Error	Error	F	p-level
1*	2	1286864,13		72	103872,344	*12,3889008	2,37707E-05
2	2	86168,7266		72	103872,344	0,82956368	0,440365613
12	4	143234,094		72	103872,344	1,37894356	0,24979125

Anava trat-dia/potasio

1-TRATAMIE, 2-DIA

	df	MS		df	MS		
	Effect	Effect		Error	Error	F	p-level
1*	2	53119344		72	6712041,5	*7,91403723	0,000781932
2	2	4047731,75		72	6712041,5	0,60305524	0,549877465
12	4	1464057,63		72	6712041,5	0,21812405	0,927525401

Anava trat-dia/nitratos

1-TRATAMIE, 2-DIA

	df	MS		df	MS		
	Effect	Effect		Error	Error	F	p-level
1*	2	857554688		72	14335778	*59,8191948	4,94993E-16
2*	2	277815904		72	14335778	*19,3792019	1,84675E-07
12	4	173108896		72	14335778	12,075305	1,45644E-07

Anava trat-dias/peso

1-TRATAMIE, 2-días

	df	MS		df	MS		
	Effect	Effect		Error	Error	F	p-level
1*	2	3,19751477		72	1,42142653	2,249511	0,112812728
2*	2	15,9111147		72	1,42142653	*11,1937647	5,84849E-05
12	4	1,11199629		72	1,42142653	0,78231007	0,540369332

*diferencias significativas con prueba de Tukey (0.05), en la concentración de fosfatos.

Tabla d. Efecto de la aplicación de citocininas sobre la concentración de nitratos en el medio líquido.

NO ₃	BAP 1	BAP 2	BAP 3	KIN 1	KIN 2	KIN 3	2ip 1	2ip 2	2ip 3
	4395,5	4118,2	5196,547	20829,56	7238,120	8154,899	17967,35	17096,65	11753,18
BAP1		1	0,99995	<u>*0,000137</u>	0,80569	0,47746	<u>*0,00014</u>	<u>*0,000137</u>	<u>*0,00311</u>
BAP2			0,99957	<u>*0,000137</u>	0,71512	0,37893	<u>*0,00014</u>	<u>*0,000137</u>	<u>*0,00189</u>
BAP3				<u>*0,000137</u>	0,96521	0,76963	<u>*0,00014</u>	<u>*0,000137</u>	<u>*0,01288</u>
KIN1					<u>*0,00014</u>	<u>*0,00014</u>	0,79978	0,487248	<u>*0,00022</u>
KIN2						0,99987	<u>*0,00014</u>	<u>*0,00015</u>	0,23574
KIN3							<u>*0,00015</u>	<u>*0,000247</u>	0,53773
2ip1								0,999912	<u>*0,02278</u>
2ip2									0,08453
2ip3									

*diferencias significativas con prueba de Tukey (0.05), en la concentración de nitratos.-

Tabla f. Efecto de la aplicación de citocininas sobre la concentración de potasio en el medio líquido

K	BAP 1	BAP 2	BAP 3	KIN 1	KIN 2	KIN 3	2ip 1	2ip 2	2ip 3
	4513,6	3927,95	4315,209	3637,471	5116,118	4118,140	5577,240	5105,238	9419,411
BAP1		0,9998	1	0,996452	0,99978	0,99999	0,98695	0,999804	<u>*0,00092</u>
BAP2			0,99999	0,999999	0,97389	1	0,84548	0,975315	<u>*0,00023</u>
BAP3				0,999463	0,99814	1	0,96253	0,998315	<u>*0,00053</u>
KIN1					0,90983	0,99996	0,6946	0,913239	<u>*0,00017</u>
KIN2						0,9914	0,99997	1	<u>*0,00542</u>
KIN3							0,91589	0,992002	<u>*0,00033</u>
2ip1								0,999965	<u>*0,01997</u>
2ip2									<u>*0,00525</u>
2ip3									

*diferencias significativas con Tukey (0.05), en la concentración de potasio en el medio