



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS · IZTACALA

"EVALUACION DEL METABOLISMO ACIDO DE CRASULACEAS EN TRES ESPECIES DE CACTACEAS CULTIVADAS IN VITRO Y DURANTE SU ACLIMATACION A SUELO"

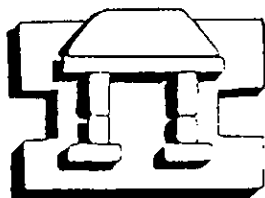
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARGARITA IVONNE GARRIDO GUTIERREZ



IZTACALA

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

264728



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Evaluación del metabolismo ácido de Crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatación a suelo.

ÍNDICE

	Páginas
1. Resumen.	1
2. Abreviaturas.	3
3. Introducción.	4
4. Antecedentes.	8
4.1 <i>Rhipsalidopsis rosea</i> .	8
4.2 <i>Chamaecereus silvestrii</i> .	11
4.3 <i>Epiphyllum crenatum</i> .	13
4.4 Metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM).	15
4.4.1. Fases de CAM.	20
4.4.2. Control de CAM.	29
4.4.3. Variantes de CAM.	30
4.5 Metabolismo ácido de Crasuláceas en plantas cultivadas <i>in vitro</i> .	34
5. Metodología.	43
5.1 Especies.	43
5.3 Cultivo <i>in vitro</i> .	43
5.3 Metabolismo ácido de Crasuláceas.	47
6. Resultados.	50
6.1 Cultivo <i>in vitro</i> .	50
5.1.1 <i>Rhipsalidopsis rosea</i> .	50
5.1.2 <i>Chamaecereus silvestrii</i> .	59
5.1.3 <i>Epiphyllum crenatum</i> .	65
6.2 Metabolismo ácido de Crasuláceas.	67
6.2.1. Acidez titulable e intercambio de CO ₂ .	67
6.2.2. Prolina.	73
6.2.3. Proteínas solubles.	77
6.2.4. Clorofila.	78
7. Discusión	82
8. Conclusiones.	113
9. Bibliografía.	117
10. Agradecimientos y dedicatoria.	124

1. RESUMEN.

No se han realizado estudios relacionados con el metabolismo vegetal CAM en términos del comportamiento fisiológico en sistemas vegetales completas (plantas completas obtenidas *in vitro*), tampoco se han llevado a cabo en plantas pertenecientes a la familia de las cactáceas debido a que se prefiere las especies de fácil propagación *in vitro* y, por consiguiente, se ha marginado a especies que presentan un crecimiento lento. En el presente trabajo se propuso evaluar la actividad metabólica CAM en plantas obtenidas a partir de cultivos *in vitro* y durante su aclimatación a suelo de las especies *Rhipsalidopsis rosea*, *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum*.

Para las tres especies se determinaron las concentraciones hormonales para la generación de brotes axilares a partir de aréolas con las combinaciones de ANA con KIN en 0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L y 0, 0.5, 1.0 y 10.0 mg/L, respectivamente, en medio de cultivo MS. La incubación de los cultivos fue bajo 12 h luz y 12 h oscuridad en una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un PAR de $50 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas de luz fluorescente de luz blanca fría.

Se evaluó la acidez titulable, intercambio de CO_2 , el nivel de estrés hídrico a través de la concentración de prolina, proteínas solubles y clorofila en las plantas de las tres especies de cactáceas obtenidas *in vitro* y durante 5 y 10 días de aclimatación a suelo.

La generación del mayor número de brotes axilares en el menor tiempo se logró en las combinaciones 1, 5 y 10 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA en *E. crenatum*, *R. rosea* y *C. silvestrii*, respectivamente. En las tres especies de cactáceas se obtuvo un 100 % de supervivencia de las plantas generadas *in vitro* trasplantadas a suelo.

En condiciones de cultivo *in vitro* así como después de 5 y 10 días del cambio a suelo, las tres especies de cactáceas evaluadas presentaron patrones marcados de la vía CAM. Asimismo, todas presentaron una disminución de la acidez titulable al final del período de oscuridad pero no disminuyó la fijación de CO_2 , lo cual nos permitió proponer que, en general, la fijación del CO_2 se llevó a cabo por medio de la acumulación de ácido cítrico. En ninguna de las tres especies de cactáceas se presentó una proporción 2:1 en relación con la acidez titulable y la fijación del

Resumen.

CO₂. La primera fue comparativamente mayor con respecto al segundo, por lo que los resultados sugieren un reciclado de CO₂.

Se observó un considerable estrés hídrico en las tres especies de cactáceas bajo las condiciones de cultivo *in vitro*. Éste disminuyó en respuesta al cambio a suelo sólo en *E. crenatum*, en *R. rosea* aumentó y en *C. silvestrii* se mantuvo constante. En consecuencia, se evidenció un mayor y constante crecimiento en la primera y en la última especie.

Las especies epífitas, debido al cambio de atmósfera *in vitro* a *in vivo*, presentaron fotoinhibición, siendo más pronunciada en *R. rosea*. El aparato fotosintético se restableció con el tiempo en cultivo *in vivo* en las tres especies, por lo que, posiblemente, la fotoinhibición sea el factor más importante que se debe cuidar cuando se realice la aclimatación a suelo de las plantas obtenidas *in vitro*, más que las propias condiciones hídricas. La presente investigación pretende ser una contribución pionera que no tiene antecedente en México, así como se pretende es la primera en donde se trabajó con plantas (completas) de la familia de las cactáceas.

2. ABREVIATURAS.

CAM	Crassulacean acid metabolism (Metabolismo ácido de Crasuláceas).
PEP	Fosfoenol piruvato
PEP carboxilasa	Fosfoenol piruvato carboxilasa
Rubisco y RubP	Ribulosa bifosfato carboxilasa
Rubisco Casa	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa
KIN	cinetina: N-(2- furanilmetil)- 1 H-purina 6-amina
ANA	ácido 1-naftalenacético
3-PGA	3-fosfoglicerato
PAR	Photosynthetic active radiation: radiación activa fotosintética
rpm	Revoluciones por minuto
msnm	Metros sobre el nivel del mar
E. E.	Error estándar
mM	milimolar
C ₃	Tipo de fotosíntesis en donde la captación de CO ₂ produce un compuesto de tres carbonos
C ₄	Tipo de fotosíntesis en donde la captación de CO ₂ produce un compuesto de cuatro carbonos
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
mARN	ARN mensajero
Mal	ácido málico

3. INTRODUCCIÓN.

Las plantas son la clave de la vida en la tierra, principalmente por su posición única como productores primarios en todas las cadenas alimenticias, secundariamente, como la única fuente de energía renovable disponible para los animales (Mantell *et al.*, 1985) y, en consecuencia, por ser económicamente importantes.

Como organismos autótrofos, las plantas tienen requerimientos nutricionales básicos muy sencillos, siendo éstos: agua, dióxido de carbono y varias sustancias inorgánicas. Usando la luz solar como fuente de energía, las plantas producen azúcares sencillos por medio de series complejas de reacciones conocidas como fotosíntesis. La energía capturada a partir de la luz del sol y la producción de moléculas orgánicas a través de la fotosíntesis, suministra la base no sólo de todo el alimento, sino también de toda la vida sobre la tierra (Mantell *et al.*, 1985).

Dada la importancia que revisten las plantas, se han implementado varias técnicas enfocadas principalmente en el plano alimenticio para la obtención de mejores cosechas. Sin embargo, recientemente se ha desviado la atención hacia ciertas plantas cuyas características morfológicas las han convertido, en el ámbito comercial, en un artículo sumamente apreciado, las plantas ornamentales.

A principios de la década de los setenta, se desarrollaron dos técnicas importantes, las cuales ofrecieron grandes ventajas en la investigación actual en las ciencias vegetales: las metodologías de cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales (técnica que nos ocupará en este estudio) y la técnica del ADN-recombinante. Ambas tienen un impacto positivo en la industria de la agricultura en tanto que es y será la industria de mayor importancia económica y estratégica del mundo y, las nuevas técnicas biológicas, permitirán incrementar en forma sustancial los rendimientos de las cosechas (Galindo-Fentanes, 1988). Asimismo, tales metodologías, principalmente la técnica de cultivo *in*

vitro, abren una serie de posibilidades para el estudio y comprensión de la fisiología vegetal.

El cultivo *in vitro* es el proceso según el cual pequeñas piezas de tejido vivo (explantes) son aisladas de un organismo, crecidas asépticamente por períodos indefinidos sobre un medio nutritivo, presenta ventajas principalmente en plantas económicamente importantes. El cultivo *in vitro* se utiliza a menudo como un sistema "modelo" para el estudio de aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y problemas estructurales relacionados con las plantas. De esta forma, el estudio con cultivos *in vitro* puede ser usado para responder cuestiones concernientes al metabolismo de plantas completas. Así, tenemos que el cultivo de células vegetales *in vitro* ha sido usado para el estudio de aspectos del metabolismo universal, por ejemplo, la biosíntesis de aminoácidos o síntesis de ácidos nucleicos, y aspectos del metabolismo que están únicamente relacionados con las plantas, tales como la fotosíntesis o la biosíntesis de la pared celular (Dougall, 1980). El metabolismo relacionado con la fotosíntesis se ha empezado a investigar y ya se cuenta con reportes sobre los potenciales de la fotosíntesis en cultivos autotróficos y mixotróficos. Sin embargo, la mayoría de los cultivos reportados de células fotosintéticamente activas son con plantas C_3 tales como *Nicotiana tabacum*, *Ruta graveolens*, *Chenopodium rubrum*, *Daucus carota* y *Spinacia oleracea* (Seeni y Gnanam, 1980).

No obstante, los estudios relacionados con el metabolismo vegetal en términos del comportamiento fisiológico en sistemas vegetales completos (esto es: plantas completas obtenidas *in vitro*), no se han realizado bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Tal es el caso específico del metabolismo ácido de Crasuláceas (Crassulacean acid metabolism, cuyas siglas en inglés son CAM. En este trabajo se manejará esta nomenclatura). Bajo estos términos, CAM básicamente ha sido estudiado en aspectos bioquímicos y biofísicos usando protoplastos y organelos celulares (Kluge *et al.*, 1987). La piña, por ejemplo, planta CAM comercialmente importante, ha sido la única que ha sido estudiada extensamente en la agricultura (Ting, 1985).

El cultivo de tejidos ha sido reconocido como una herramienta del comercio hortícola por cerca de 30 años y es el principal método de propagación para una gran variedad de cosechas; ejemplos notables de ello son las orquídeas, plantas de interiores y rododendros (Fay y Gratton, 1992).

Entre las plantas que presentan el metabolismo CAM, que son potencialmente importantes desde el punto de vista económico y que no han recibido la atención que merecen en nuestro país, se encuentran las cactáceas, las cuales actualmente son sumamente codiciadas por coleccionistas, viveristas y propietarios de jardines botánicos de todo el mundo por su belleza, rareza y aspecto tan peculiar.

Es bien conocido la significación religiosa de *Lophophora* en ciertos grupos indígenas de América. Además, *Opuntia* ha sido usada como una planta hospedera para insectos cochinilla en la producción de colorante. Ciertas especies de *Opuntia* y otros géneros se utilizan por poblaciones locales como alimento de reserva. La principal importancia económica de las cactáceas consiste en el comercio hortícola en todo el mundo como plantas ornamentales y coleccionables. Es difícil determinar su valor comercial. Una estimación de las cactáceas raras y en peligro de extinción es de 5 a 7.5 millones de dólares anuales en Estados Unidos, con 2.5 a 5 millones de unidades en suelo. El comercio ornamental de estas plantas puede ser considerablemente grande en lugares en donde el comercio es especializado en cactus raros y en peligro de extinción. Las principales áreas de producción de cactus ornamentales incluyen Holanda, Alemania, Gran Bretaña, Japón y Estados Unidos (Hubstenberger *et al.*, 1992).

Dado que la demanda de ejemplares de cactáceas es enorme, en países en donde no forman parte de su flora local (Europa, principalmente), se decidió propagarlas por medio del cultivo *in vitro* por las ventajas que ofrece ésta técnica (Clayton *et al.*, 1990; Johnson y Emimo, 1979; Lazarte *et al.*, 1982; Vyskot y Jára, 1984.). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio acerca del comportamiento fisiológico de las plantas completas obtenidas en estas condiciones de cultivo. Asimismo, es necesario un conocimiento detallado del

metabolismo del carbono de los cultivos *in vitro* si se requiere optimizar el crecimiento para propósitos hortícolas de cactáceas. Además, no se tiene al alcance información al respecto en nuestro país dado que, hasta la fecha, sólo existe un trabajo en donde se realizó la evaluación de CAM en cultivos *in vitro* (Doi *et al.*, 1989) y porque, particularmente, el intercambio gaseoso ha sido considerado sólo recientemente para cactus epífitos (Nobel y Hartsock, 1990; Bermejo, 1993).

Por lo anterior, este trabajo propone contribuir a dicho conocimiento a través de la evaluación del metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM) en tres especies de cactáceas que exhiben CAM: *Chamaecereus silvestrii* (Speg.) Britton y Rose, *Rhipsalidopsis rosea* (Lagerheim) Britton y Rose y *Epiphyllum crenatum* (Lindley) Don (las dos últimas epífitas). Estas especies han sido seleccionadas en virtud de que recientemente fueron introducidas al mercado mexicano como plantas ornamentales con una importante y creciente demanda; por ser especies que han sido poco estudiadas -y en cierto modo olvidadas- (Boyle, 1990; Sanderson, *et al.*, 1986; Shields, 1963; Kimnach, 1951); omitiendo al mismo tiempo el hecho de que ellas ofrecen una alternativa futura importante en el ámbito económico. Además, su estudio *in vitro* puede proporcionar información nueva e interesante en este campo de conocimiento.

4. ANTECEDENTES.

4.1 *Rhipsalidopsis rosea* [(Lagerheim) Britton y Rose].

Esta especie de cactácea es llamada comúnmente "cacto enano de Pascua" en Norte América. En México es conocida como "nopalillo". Su descubridor y primer descriptor, Per Dusén, un botánico sueco, le dio el nombre de *Epiphyllanthus opuntioides* (Kimnach, 1951). La encontró creciendo a una altura 1100 a 1300 msnm en el bosque cerca de Caguava, en el estado de Paraná, Brasil (Kimnach, 1951; Britton y Rose, 1963). Esta fue una de las plantas encontradas que él envió en 1911 al Botanical Institute en Estocolmo donde, después de la floración. Posteriormente fue descrita en 1912 por Gustaf Lagerheim bajo el nombre de *Rhipsalis rosea* (Kimnach, 1951) y en 1923 Britton y Rose le dan el estatus de un género monotipo y la proponen con el nombre científico de *Rhipsalidopsis rosea* (Kimnach, 1951).

Britton y Rose (1963) argumentan que la planta presenta una flor mucho más larga y los segmentos están unidos dentro de un tubo corto, razón por la cual no fue correcto el nombre de *Rhipsalis*. El hábitat de *Rhipsalidopsis rosea* se asemeja al de alguna de las especies de *Epiphyllanthus*, pero la planta tiene una floración regular. La clasificaron cerca de *Pfeiffera* pero no creían que estuviera cerca de este género porque tiene una flor alternada y las flores y las ramas son terminales, como en *Zygocactus*. El nombre genérico es dado como explicación del parecido a algunas especies de *Rhipsalis*.

Rhipsalidopsis rosea es una cactácea epífita en forma de arbusto densamente espeso, raramente erecto (Graf, 1970), con un patrón definido de crecimiento, produce una serie de filoladodios (tallos, Boyle *et al.*, 1994). Las plantas son compactas, muy ramificadas; sus ramas son alternadas (Boyle, 1990; Britton y Rose, 1963) y están distribuidas en las selvas del Sur de Brasil por lo que requieren, en esencia, de sombra (Shields, 1963). Son residentes de árboles, pero algunas veces trepan sobre rocas o penden de ellas y habitan en climas cálido-húmedos (Graf, 1970; Britton y Rose, 1963).

Esta especie es interesante por su tallo dimórfico y por sus flores (ver abajo). Presenta filocladodios angulosos y aplanados de acuerdo al número de costillas que se observen en éstos. En los filocladodios angulosos existen de tres a cinco costillas, en los aplanados sólo se presentan dos costillas. En algunos filocladodios angulosos su morfología se modifica al grado de aparentar la forma de un lápiz (Graf, 1970) por el aspecto cilíndrico que adquieren y por el número de costillas. Los filocladodios angulosos son cerosos, con diminutas cerdas como pelos (Graf, 1970), las aréolas se encuentran en mayor proporción y los entrenudos son más cortos con respecto a los filocladodios aplanados. En general, los filocladodios son largos y estrechos, de color verde azulado oscuro y en los bordes se observa color rojo sin brillo (Shields, 1963), su longitud es de 2.5 a 3.8 cm de longitud (Boyle *et al.*, 1994).

Las aréolas (brotes axilares modificados) están restringidas a los bordes y en el ápice de los filocladodios (Liberty Hyde Bailey Hortorium, citado por Boyle *et al.*, 1994). Las aréolas que se desarrollan abajo del ápice de los filocladodios son solitarias; en cambio, las del ápice están aglomeradas, las cuales forman una aréola compuesta (Barthlott, citado por Boyle *et al.*, 1994).

Las flores radialmente simétricas, tienen el color y la forma de una rosa, su longitud es de 2.5 a 3.5 cm de diámetro, brotan casi invariablemente en las aréolas compuestas sobre los filocladodios apicales y casi nunca en las aréolas subapicales o filocladodios subapicales (Boyle, 1990 y 1992). La especie presenta gran cantidad de flores por cada planta. Son atractivas por sus centros brillantes. Sus pétalos son muy amplios, puntiagudos y se expanden completamente, son de un color rosa que generalmente es más intenso hacia el centro (forma un buen contraste con los estambres amarillos y el estigma blanco; Kimnach, 1951). Tienen brillantes estambres exteriores ondulados en el interior sobre amarillo brillante que descienden a la garganta. El estilo es blanco, dividido en cuatro lóbulos del estigma de color blanco, ondulados en el ápice (Shields, 1963). Las flores son segmentadas con extremos redondeados, estrechas y con bordes como los de las orquídeas (Graf, 1970). Presentan una fragancia definida que recuerda a las rosas o al

aceite de cedro (Kimnach, 1951). La planta florece abundantemente a la mitad del invierno (pero según Shields -1963- sólo genera pocas flores), en la primavera según Graf (1970) y Kimnach (1951) y al principio del verano, cada filocladodio presenta de 5 a 6 (o aún más) flores al término de éste según Shields (1963). Las flores permanecen por varias semanas (Shields, 1963) pero después de tres días abren sólo en luz solar y cierran cuando se les lleva a la sombra (Kimnach, 1951). El fruto es un pequeño grano jugoso, blanco, rojo o púrpura y la semilla es diminuta (Britton y Rose, 1963).

Aunque esta especie es el miembro que presenta la flor más fina de Rhipsalidanae, parece estar completamente ausente en las colecciones de México. Suelen confundirla con *Schlumbergera* y *Zigocactus*. Su nombre es raramente mencionado en libros y revistas especializadas; han sido cultivadas pero no se han encontrado cantidades abundantes de ellas; es una planta fácil de cultivar y un espécimen adulto y grande, floreciendo completamente, luce en forma impresionante (Kimnach, 1951). Debido a la belleza de sus flores fragantes que son superiores en forma y color a las especies de *Rhipsalis*, es difícil entender que esta rareza ha sido olvidada y poco estudiada. Se ha escrito poco de esta especie, la literatura disponible acerca de sus datos generales se encuentra, en su mayoría, en Europa (Lagerheim, 1912). Recientemente se han realizado investigaciones de esta especie y de otras del mismo género (Boyle, 1990, 1991 y 1992; Scott *et al.*, 1994; Boyle *et al.*, 1994).

Las plantas de *R. rosea* son propagadas por tallos o con pequeñas ramas (Graf, 1970). Requieren de 8 a 12 meses para la propagación por esquejes hasta la floración (Boyle, 1991). Ya que éste es un período largo de producción comparado con el período de muchas otras cosechas de invernadero, es de interés práctico identificar tratamientos y técnicas para reducir la fase de producción y/o minimizar costos.

Esta especie también amerita atención en el aspecto comercial, ya que es admirablemente adecuada para su cultivo en macetas - que suelen colocarse cerca de la

ventana- (Graf, 1970), en donde florecen (Boyle, 1990); además de ser muy popular en esta forma de cultivo en el norte de América y de Europa (Scott *et al.*, 1994).

4.2 *Chamaecereus silvestrii* [(Spegazzini) Britton y Rose].

Esta especie se conoce como "cacto cacahuete" en Europa y en México por sus brotes cortos y cilíndricos a manera de "dedos" que crecen en pequeños grupos. Esta especie fue nombrada *Cereus silvestrii* por el Dr. Philip Silvestri (Bailey, 1977; Britton y Rose, 1963) amigo del Dr. Spegazzini quien realizó la descripción de la especie por primera vez en 1905 (Spegazzini, 1905). Britton y Rose (1963) la nombran como *Chamaecereus silvestrii*, la primera parte del nombre genérico proviene del griego que significa "sobre el terreno" refiriéndose al hábitat postrado de la planta (cacto geofítico). Es un cacto nativo de Tucumán, Argentina, se localiza en las montañas entre Tucumán y Salta (Argentina; Britton y Rose, 1963).

Chamaecereus silvestrii es una planta pequeña, postrada y forma pequeños grupos; algunas veces los brotes cilíndricos cuelgan y generalmente se producen de la base de los brotes viejos (Britton y Rose, 1963). La longitud de los brotes es de 4 a 6 cm de largo, son de color verde pálido (Britton y Rose, 1963; Bailey, 1977) y presentan de ocho a diez filas de aréolas blancas. Las aréolas se encuentran rodeadas de diez a trece espinas. Las espinas son aciculares, blancas, como cerdas (Martin, 1966; Graf, 1970; Britton y Rose, 1963; Bailey, 1977). Presentan de seis a nueve costillas pequeñas, pero generalmente son ocho (Britton y Rose, 1963). Los brotes se desprenden muy fácilmente, especialmente si la tierra de la planta está seca. Los brotes sueltos fácilmente generan raíces (Martin, 1966).

Sus flores son de un hermoso color anaranjado-escarlata de 7 cm de largo (su tamaño contrasta marcadamente con el tamaño pequeño de la planta (Shields, 1962) y se producen profusamente en los brotes viejos durante la primavera; son diurnas y se

encuentran solas en las aréolas laterales y erectas. Presentan un tubo cilíndrico de 2.5 a 3 cm con escamas agudas cuyos ejes tienen largos pelos axilares negros y blancos y pocas cerdas; los segmentos del perianto se presentan en tres o cuatro series, extendiéndose de 1 a 2 cm de largo, 4 mm de ancho, lanceolados, su parte exterior es aguda y la parte interior muy corta y obtusa; dentro de los segmentos del perianto exhiben estambres cortos, de color escarlata a púrpura; el estilo es de color amarillo pálido a verde-blanco (translúcido), más largo que los estambres; los lóbulos del estigma son de ocho a nueve. Los frutos son pequeños, globulares, secos o casi secos y presentan grandes pelos lanosos; las semillas son de color negro opaco (Britton y Rose, 1963).

En Europa requieren de sol completo ya que de otro modo los brotes se caen y adquieren un color verde pálido (Martin, 1966), además de un abundante riego durante el estado de crecimiento (Shields, 1962). La inducción de la floración en esta especie se produce estando la planta en un suelo rico, sin riego (Martin, 1966).

En Argentina *Chamaecereus silvestrii* es poco estudiada, en cambio en colecciones europeas es exhaustivamente cultivada y altamente apreciada (Britton y Rose, 1963). En México, al igual que *R. rosea*, se requieren investigaciones para la producción a gran escala de esta especie debido a su importancia comercial.

Con anterioridad, Mauseth (1979) produjo brotes axilares de *C. silvestrii* en cultivo *in vitro* a partir de aréolas, pero no proporciona datos acerca de los cultivos en su artículo (ni tampoco de otras especies a las que también hace referencia).

En el presente trabajo se estudiaron aspectos que no habían sido considerados por otros autores como Seeni y Gnanam (1980) quienes realizaron cultivo en suspensión de esta misma especie.

4.3 *Epiphyllum crenatum* [(Lindley) Don].

Esta especie de cactácea es conocida como "cacto orquidea" (Graf, 1970), "espinazo de pez" o "nopalillo". En 1844 Lindley la propone como *Cereus crenatum* y en 1855 Don la nombra *Epiphyllum crenatum* (Bravo y Sánchez, 1985). Se encuentra distribuida en Honduras, Guatemala y México.

Epiphyllum crenatum es una planta epífita, muy ramosa; presenta tallos primarios redondeados, de forma cilíndrica angostada y leñosos, más o menos largos, con la porción apical aplanada (rara vez triangular), con podarios inconspicuos; las ramas o tallos secundarios son aplanados (filocladodios), con la base de sección redondeada; la región aplanada tiene podarios que forman lóbulos crenados o aserrados más o menos amplios o pequeños que pueden llegar hasta la nervadura central (Bravo y Sánchez, 1985). Los tallos viejos con frecuencia son leñosos. Los filocladodios (ramas) miden 50 cm de longitud o más (Bravo y Sánchez, 1985), son muy aplanados, delgados, glaucos (como hojas), algunos de ellos tienen tres costillas, con frecuencia presentan raíces en la punta, son mucho muy rígidos, su ancho es de dos a tres centímetros, son obtusos, tiesos y la base cuneada hasta cilíndrica; son erectos al menos al principio, con grandes y profundas dentaciones, de forma cuneiforme en la base; la mitad de la costilla es gruesa y la nervadura central engrosada. Su epidermis es verde, ligeramente grisácea (Bravo y Sánchez, 1985; Britton y Rose, 1963).

Las aréolas en la base de los tallos presentan con frecuencia pelos picudos o pequeñas cerdas; las aréolas de los tallos cilíndricos primarios presentan cerdas o pelos que se generan a lo largo de los márgenes de las ramas aplanadas y las aréolas de los filocladodios (tallos secundarios) se encuentran en las axilas de los lóbulos, sustentadas por pequeñas escamas que son pequeñas, circulares y desnudas o con cerdas finas y a veces espinas rudimentarias. Las espinas normalmente faltan en las plantas maduras, pero con frecuencia se encuentran representadas por delgadas cerdas en los brotes y formas juveniles; en las aréolas del pericarpelo se encuentran de 0 a 2 y hasta 8 espinas

setosas; carecen de hojas verdaderas. Las aréolas se encuentran distantes entre sí de 2 a 5 cm, en promedio 3 cm (Bravo y Sánchez, 1985; Britton y Rose, 1963).

Las flores son grandes, miden de 10 a 15 cm de longitud, su color es blanco o con tinte rosado a carmesí, muy olorosas, diurnas y permanecen expandidas por varios días. La floración ocurre en primavera y en verano (Graf, 1970).

El pericarpelo presenta largos podarios decurrentes y con bractéolas que llevan en las axilas de 0 a 2 espinas setosas hasta de 7 mm de longitud. El tubo, de 10 a 12 cm de largo, casi siempre más largo que el perianto, delgado, cilíndrico, angosto, más o menos curvo, presenta escamas lineales de 2 a 3 cm de largo. El limbo de los pétalos mide de 10 a 12 cm de ancho, de color crema a amarillo verdoso. Los tépalos exteriores brotan 2 cm del ápice del tubo, son lineares, lanceolados, de color crema hasta amarillentos; tépalos interiores más anchos que los exteriores, blancos, con el ápice acuminado y el margen lacerado o serrado.

Los filamentos son comúnmente largos, nacen del ápice del tubo o están diseminados sobre la superficie de la garganta; la cámara nectarial es larga y angosta; la cámara del ovario es oblonga; los segmentos del perianto interiores son oblanceolados, pronto caen del ovario; el estilo es elongado, blanco o coloreado, más corto que el perianto, el estigma es angosto, los lóbulos del estigma son lineares, de éstos se cuentan hasta 21; el ovario es escamoso, algunas de las escamas alcanzan de 2 cm de largo y se pueden observar a simple vista.

Sus frutos no presentan espinas, son de color púrpura o rojos, desnudos o con pocas escamas (raramente presentan muchas), con axilas frecuentemente desnudas. La forma de los frutos es globular u oblonga, es corto o angosto, terminan en un cuello con podarios escasos formando costillas ligeramente marcadas, frecuentemente con pocas arrugas, algunos con tubérculos. El pericarpelo al principio es verde, después rojizo; su pulpa es comestible, insípida; cuando madura se divide de su parte inferior exponiendo el interior

carroso. Las semillas presentan forma ovoide, son pequeñas, de testa negra, brillante y flaveolada; el perisperma es pequeño; el embrión tiene cotiledones grandes y foliados, que algunas veces persisten por un largo tiempo (Britton y Rose, 1963; Bravo y Sánchez, 1985).

Esta planta ornamental ha sido una de las favorita de entre su género y se han producido varios híbridos con ella (Britton y Rose, 1963). Estos híbridos han sido creados por cruzamiento de especies con flores de colores encendidos y diurnas (especies de los géneros *Nopalxochia*, *Heliocereus* y *Disocactus*). *E. crenatum* posee hermosas flores en forma, tamaño y fragancia raras entre otras plantas (Trager, 1985), su color blanco puro o con matices de color carmesí que le confieren un aspecto destellante y llamativo (Graf, 1970). Ya que sus ramas son separadas y largas (se considerada que esta especie enraiza fácilmente; Lazarte *et al*, 1982; Mauseth, 1979), los tallos de 15 a 20 cm (esquejes) pueden ser usados para la multiplicación comercial, por lo que la propagación *in vitro* puede ser favorable para un incremento rápido de plántulas usando menos material vegetal (Lazarte *et al*, 1982).

4.4 Metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM).

El término CAM se utilizó primariamente dando el crédito a las observaciones de Heyde (1813) en hojas de la especie *Bryophyllum calcycinum*, miembro de la Familia Crassulaceae, por lo que se le conoce como el metabolismo ácido de Crasuláceas (Crasulacean acid metabolism, CAM por sus siglas en inglés). Heyde expone que las plantas "son en la mañana como ácido y conforme avanza el día, pierde su acidez", pero los primeros en descubrir el fenómeno fueron los antiguos romanos, quienes notaron que plantas de *Sedum acre* (también Crassulaceae) tenían un sabor más amargo en la mañana en relación con el que se presentaban durante la noche (Winter, 1985).

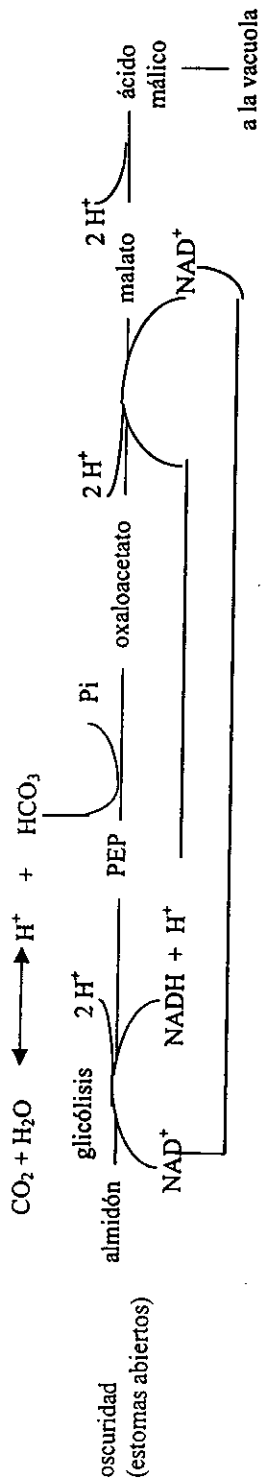
El proceso del metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM) consiste en la fijación nocturna de CO₂ del aire por los órganos fotosintéticos de las plantas superiores en una reacción catalizada por la enzima PEP carboxilasa. El CO₂ fijado es acumulado en forma de ácido málico en la vacuola de la célula. Durante el día, el ácido málico es transportado de nuevo al citoplasma donde es descarboxilado enzimáticamente y el CO₂ liberado es incorporado a carbohidratos a través del ciclo de Calvin en el interior del cloroplasto (Medina *et al.*, 1989; Figura 1). Los cambios del nivel de ácido málico durante el día y la noche son acompañados por fluctuaciones recíprocas de los carbohidratos almacenados, los cuales suministran el sustrato para la síntesis nocturna de ácido (acidificación) y son resintetizados durante el día por la descarboxilación del ácido málico (desacidificación; Winter, 1985)

El ácido más abundante en las plantas CAM es el ácido málico, pero en algunas especies se acumulan en menor grado los ácidos cítrico e isocítrico, derivados del ácido málico. Sin embargo, éstos últimos suelen presentar escaso cambio de concentración durante las horas de luz y de oscuridad (Keeley y Keeley, 1989; Osmond, 1978).

Es posible definir CAM de acuerdo a los siguientes criterios (Ting y Rayder, 1985; Medina *et al.*, 1989):

- Una fluctuación masiva diurna de ácidos orgánicos, ácido málico, de 100 a 200 µeq por gramo de tejido fresco.
- Los ácidos orgánicos, los cuales son altos en la mañana y bajos en la noche, fluctúan recíprocamente con el almacenamiento de glucanos.
- Los estomas están abiertos durante la noche y cerrados durante las horas de luz del día.
- La fijación de CO₂ del aire y la pérdida de agua son principalmente en la noche cuando los estomas están abiertos. Si la única fuente de CO₂ para la acidificación nocturna proviene del aire circundante, por cada mol de CO₂ fijado debería sintetizarse dos equivalentes de ácido (relación ácido málico / CO₂ 2:1).

Antecedentes.



luz del día
(estomas cerrados)

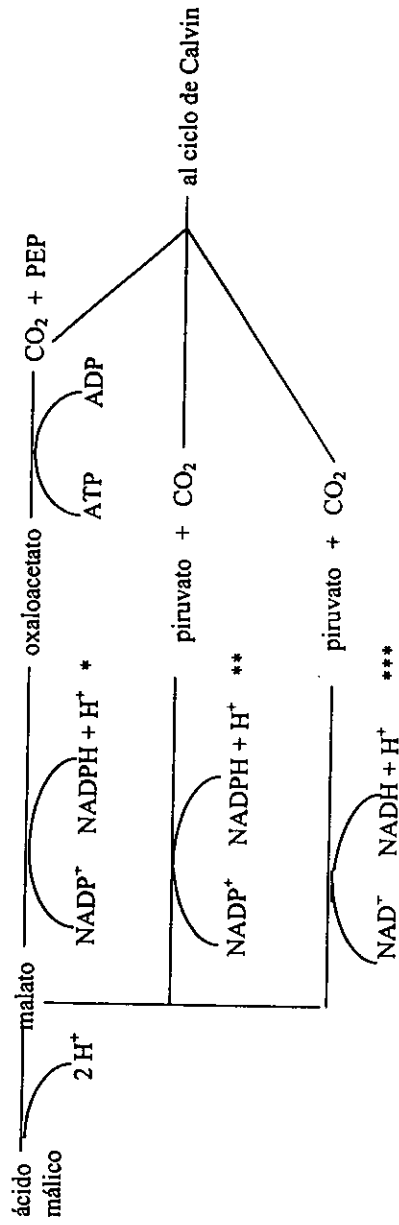


Figura 1. Resumen de la fijación de CO₂ en plantas CAM (Salisbury y Ross, 1994). *, ** y *** ver en texto.

- Los niveles de actividad de PEP carboxilasa son altos durante la noche.
- Abundancia de ^{13}C en el tejido fotosintético. La fijación de CO_2 a través de la enzima PEP carboxilasa conlleva una baja discriminación del isótopo de carbono pesado del aire (^{13}C), en contraste con la fijación de CO_2 a través de RuBP carboxilasa, que presenta una fuerte discriminación contra el ^{13}C . Por lo tanto, la incorporación del CO_2 fijado durante la noche a la materia orgánica sintetizada, durante el día siguiente resulta en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ son más elevados en plantas CAM (similares a los de las plantas C_4) en comparación con las plantas C_3 . Se considera que la determinación del valor de $\delta^{13}\text{C}$ en el tejido fotosintético de una planta puede indicar si la fijación primaria de CO_2 ocurre principalmente a través del mecanismo de PEP carboxilasa (plantas CAM y C_4) o de la RuBP carboxilasa (plantas C_3). Como en las plantas CAM coexisten los dos mecanismos enzimáticos dentro de la misma célula, el valor de $\delta^{13}\text{C}$ de la materia orgánica representa un promedio indicador de la proporción de CO_2 incorporado vía PEP carboxilasa durante la noche, con respecto al CO_2 externo incorporado vía RuBP carboxilasa durante el día.

El metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM) representa una de las tres clases principales de metabolismo fotosintético en plantas superiores. CAM es esencialmente una opción de supervivencia para las plantas que lo presentan (Osmond, 1978). La relevancia ecológica de CAM está basada en el patrón inverso de los movimientos estomáticos realizados por las plantas CAM. (Kluge *et al.*, 1981).

Es casi incuestionable que CAM es una secuencia metabólica relacionada con la adaptación a ambientes áridos (Ting, 1985). Sin embargo, varias explicaciones son técnicamente incorrectas al describir que todos los ambientes para CAM son áridos (Gibson, 1982), pues es bien conocido que el metabolismo CAM no es el único mecanismo exitoso para la supervivencia en zonas áridas en donde se han desarrollado plantas superiores (Medina *et al.*, 1989). Es verdad que las plantas CAM viven en ambientes en donde deben resistir períodos diurnos y estacionales de condiciones alteradas de humedad y muy secos (Gibson, 1982). Suelen encontrarse donde el agua es

escasa o de difícil acceso, incluyendo regiones desérticas y semidesérticas, marismas y sitios epífitos (zonas semiáridas subtropicales y tropicales). Además, aunque los cactus son vistos típicamente como plantas con tallos muy suculentos, aproximadamente el 7 % de las 1 600 especies de cactus son epífitas, muchas de las cuales se encuentran en regiones húmedas tropicales y subtropicales (Nobel y Hartsock, 1990). Numerosas especies de cactus epífitos tienen tallos delgados sin espinas; un tallo delgado como hoja puede ser una adaptación para maximizar la absorción de la radiación lumínica en hábitats sombreados, como las selvas (Nobel y Hartsock, 1990).

Se ha demostrado que el mecanismo bioquímico CAM es más activo en ambientes con marcada oscilación térmica diaria. Las temperaturas nocturnas moderadas favorecen la acumulación de ácido málico, mientras que las temperaturas altas la inhiben. La razón de este comportamiento puede encontrarse en la competencia por el sustrato entre el ciclo de Krebs y la reacción de fijación de CO₂ catalizada por PEP carboxilasa. Aparentemente, un metabolismo CAM activo está asociado a una actividad respiratoria menor dentro de la misma célula. Los óptimos térmicos para la fijación de CO₂ y la acidificación durante la noche varían con las condiciones de temperatura durante el crecimiento (Medina *et al.*, 1989).

Por otra parte, el mecanismo CAM es más activo en ambientes con alta intensidad de luz debido a que favorece la acumulación de carbohidratos en los cloroplastos (almidón) y en el citoplasma (sacarosa), los cuales servirán para generar el sustrato necesario para la reacción de carboxilación y, además, junto con las temperaturas elevadas, favorece en la descarboxilación del ácido málico acumulado en las vacuolas durante la noche (Medina *et al.*, 1989).

El CAM se ha encontrado en cientos de especies en 26 familias de angiospermas (incluyendo Cactaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae, Liliaceae y Euphorbiaceae), en algunas pteridofitas y quizá en la gimnosperma *Welwitschia mirabilis* (Salisbury y Ross, 1994). Una inspección de esas familias, desde un punto de vista filogenético, muestra

claramente que CAM ha evolucionado independientemente en la mayoría, si no es que en todas, esas familias. El origen de CAM puede ser demostrado por varios tipos de evidencia: CAM ocurre en grupos divergentes tales como Pteridofitas, Gnetales (*Welwitschia*), y angiospermas; en angiospermas (en familias altamente especializadas); en algunos órdenes como en los Liliales (Agavoidae) y probablemente en Chenopodiiflorae (Centrospermae, Aizoaceae, Cactaceae, Didiereaceae y Portulacaceae) y dentro de una única familia en donde se presentan en las formas más primitivas de C_3 , como en Orchidaceae (Gibson, 1982). Debido a que CAM ha sido adoptado en varios grados por gran número de plantas de orígenes filogenéticos ampliamente separados y debido a la expresión de CAM en un contexto ecológico de la planta completa, la definición de CAM requiere de un ejercicio de semántica (Osmond, 1978). CAM es, por lo tanto, definido apropiadamente sobre un fundamento puramente mecanicista (Winter, 1985).

De modo general, la anatomía de las plantas CAM se caracteriza por un clorenquima estrechamente empaquetado con gran cantidad de vacuolas donde se acumula el ácido málico, presentan una fracción volumétrica baja de los espacios de aire intercelular del 8 % de aire por volumen (Nobel y Hartsock, 1990) y el tejido dominante es frecuentemente el parénquima almacenador de agua (Nobel y Hartsock, 1990). Además, el mesófilo generalmente no está diferenciado en capas de parénquima en empalizada y esponjoso. Estas características de CAM son importantes bajo condiciones limitadas de agua (Guralnick *et al.*, 1986). Por otro lado, carecen de peridermis por un periodo largo; presentan gran desarrollo de la cutícula para maximizar la resistencia a perder agua; presentan estomas sobre toda la superficie de los brotes pero en densidades bajas; en el clorenquima se observan grandes células vacuoladas con numerosos cloroplastos, no tienen esclereidas y, en su mayoría, carecen de fibras primarias de floema. En dicotiledóneas, es común la ocurrencia de leña blada, la cual algunas veces es pobremente desarrollada y, por último, se observa un alargamiento de la médula en los tallos (Gibson, 1982).

4.4.1. Fases de CAM.

Osmond (1978) observa que muchas especies cuando funcionan en el modo CAM, presentan cuatro fases del metabolismo durante un ciclo de 24 horas, en plantas bajo condiciones de riego adecuadas. Los procesos de asimilación de CO_2 en las cuatro fases están estrechamente relacionadas y no pueden ser tratadas aisladamente. Por ejemplo, la longitud de la fijación de CO_2 y la síntesis de ácido málico en la oscuridad (fase I) es marcadamente dependiente de la intensidad de luz y la temperatura durante la fase IV (Osmond, 1978). Las fases de CAM pueden ser identificadas por su intercambio de gas sólo bajo condiciones ambientales óptimas (Kluge *et al.*, 1982).

Fase I: Procesos nocturnos de CAM y flujo de carbono en CAM. Durante la noche el CO_2 externo junto con el CO_2 suplementado endógenamente por la respiración, es fijado por la β -carboxilación de PEP. La reacción es catalizada por PEP carboxilasa, la cual es considerada la enzima clave de CAM. La PEP usada en la β -carboxilación es generada vía glucólisis de los carbohidratos almacenados, el almidón se degrada por glucólisis hasta PEP (Kluge *et al.*, 1982). La determinación de los valores de ^{13}C de varios extractos de hojas de *K. daigremontiana* en tiempos opuestos del ciclo día/noche han guiado a la conclusión de la existencia de dos vías glicolíticas separadas; una vía provee PEP por β -carboxilación por rompimiento de compuestos de azúcar insoluble relativamente ricos en ^{13}C y otra es el suplemento de piruvato por respiración, por rompimiento de azúcares solubles relativamente pobres en ^{13}C (Winter, 1985).

El CO_2 (HCO_3^-) reacciona con el PEP para formar oxaloacetato, el cual se reduce entonces a ácido málico por la acción de una malato deshidrogenasa dependiente de NADH. La reducción del oxaloacetato puede ocurrir en el citosol y en la mitocondria (Winter, 1985). La enzima NADP malato deshidrogenasa se activa por la luz y está localizada en los cloroplastos (Winter, 1985). Los iones H^+ que provienen del ácido málico, son transportados a la gran vacuola central (la cual comprende aproximadamente el 95 % del volumen total del protoplasto de las células CAM; Winter, 1985) por una ATPasa y una

bomba de pirofosfatasa y los iones malato siguen al H^+ al interior de la vacuola. Aquí se acumula ácido málico, en concentraciones que llegan a 0.3 M o más, y es almacenado durante toda la noche hasta que sale el sol. Esta acumulación hace muy negativo el potencial osmótico de las células, de manera que pueden absorber agua y almacenarla cuando la planta se encuentra en suelo salino o seco (Salisbury y Ross, 1994).

Durante la oscuridad, no opera el ciclo de reducción fotosintética del carbono, como se manifiesta por el decremento en el *pool* de Rubisco y el incremento del *pool* de pseudoheptulosa-1,7-bifosfato en *Kalanchoe daigremontiana* (Winter, 1985). Fructuosa-1,6-bifosfato y sedoheptulosa-1,7-bifosfato de *K. daigremontiana* son fotorreguladas en forma similar, como ocurre en las plantas C_3 y C_4 (Winter, 1985).

Durante el periodo de luz que sigue a la fase I, el ácido málico es liberado de la vacuola y descarboxilado. Este paso provee CO_2 , el cual sirve al ciclo de Calvin como fuente de sustrato endógena; por lo tanto, el CO_2 externo finalmente es asimilado por la vía fotosintética (Figura 2). El residuo de tres carbonos obtenido por la descarboxilación del malato puede ser completamente oxidado (entonces produce más CO_2), o -después de la conversión de PEP- puede ser usado en la gluconeogénesis (Kluge *et al.*, 1982). El patrón del flujo total de CAM sugiere que el ácido málico sintetizado en la noche sirve de almacén de CO_2 , el cual es restaurado por la fijación de CO_2 nocturna y agotado por la fotosíntesis el día siguiente. El almacenamiento endógeno del CO_2 permite a la planta mantener su fotosíntesis operando tras el cierre de los estomas permitiéndole entonces a las plantas asimilar el carbono con una pérdida mínima de agua (Kluge *et al.*, 1982).

Fase II: Flujo de carbono durante el inicio del período de luz. Después del período de oscuridad (en el cual es típica la toma neta de CO_2), aproximadamente las dos primeras horas del período de luz se caracterizan por la toma exclusiva de CO_2 . La duración de esta explosiva toma es igual a la fase II del ciclo diurno de CAM. De hecho, la fase II es una transición entre los procesos de fijación de CO_2 durante la noche y los principales procesos del período de luz (asimilación final del CO_2 cosechado en la noche por la

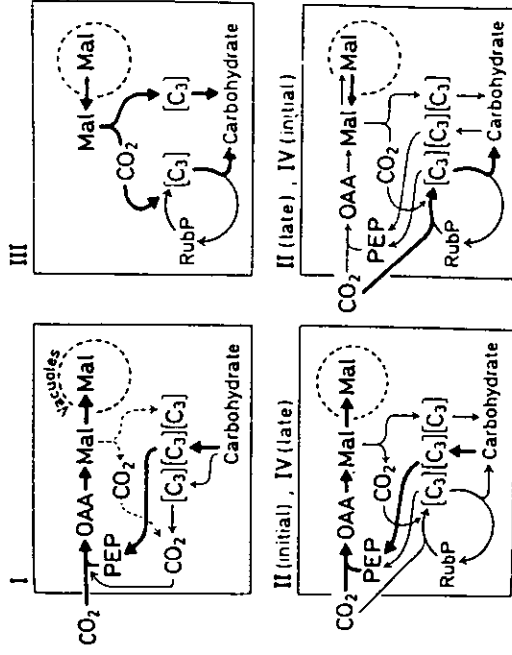
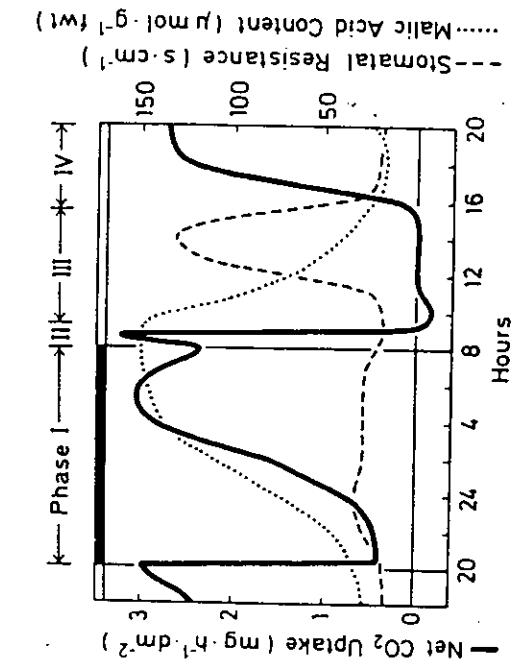


Figura 2. Criterios de CAM junto con las fases de CAM en *Kalanchoé draigemonitana* (izquierda) y patrones del flujo del carbono en las diversas fases de CAM (derecha). Las fases de CAM (izquierda) están indicadas arriba de las curvas. Intercambio neto de CO₂ (—); ritmo del ácido (.....); resistencia estomática (---). La intensidad de las flechas (derecha) indica la importancia relativa de las vías (tomado de Kluge *et al.*, 1982).

fotosíntesis). Durante la fase II existe una complicada situación la cual no está completamente entendida (Kluge *et al.*, 1982).

Una característica de la fase II es la coincidencia de tres procesos básicos, cada uno de los cuales contribuyen a determinar la dirección del flujo de carbono durante esta fase. Estos procesos son: a) Los pasos metabólicos nocturnos de CAM, esto es, la fijación mediante PEP carboxilasa y la síntesis concomitante de ácido málico (vía C_4), y el transporte del ácido málico en la vacuola; b) la exportación de ácido málico de la vacuola y la degradación metabólica del ácido málico y c) la operación del ciclo reductivo de pentosa fosfato (vía C_3 , las enzimas fosfoenolpiruvato y ribulosa bifosfato carboxilasas están activas durante este tiempo), el cual no sólo media la refijación del CO_2 derivado del malato, sino que debe proveer también compuestos de tres carbonos los cuales pueden ser convertidos a PEP y entonces ser consumidos por la vía C_4 . La principal razón de la complicación del flujo de carbono durante la fase II deriva del hecho de que, durante toda esta fase, esos procesos coinciden, cambiando sus actividades continuamente en relación el uno con el otro. Como consecuencia, la corriente de flujo de carbono no es constante durante la fase II; por el contrario, experimenta un cambio continuo, de un patrón tipo fase I al principio del patrón tipo fase III, al término de ésta (Figura 2). Hay evidencia de que estos cambios se deben a la respuesta de las concentraciones del intercambio de CO_2 a O_2 en la fase II (Kluge *et al.*, 1982).

Inicialmente, durante la fase II el CO_2 exógeno es fijado principalmente por la acción de PEP carboxilasa lo cual guía a una dominancia de los productos C_4 en el patrón de marcados, mientras que en la última parte de la fase II la fijación de CO_2 es mediante RuBP carboxilasa, por lo que se suprime la vía C_4 . Esto conduce a un patrón de marcados de tipo C_3 (Fisher y Kluge, 1984; Kluge *et al.*, 1982).

Cerca del pico del intercambio de CO_2 de la fase II, hay un marcado incremento en el eflujo del ácido málico de la vacuola (Winter, 1985). El decline de la fijación de CO_2 en la oscuridad refleja un incremento en la inhibición de la acción de PEP carboxilasa. La

fijación en la luz declina, presumiblemente, porque durante toda la duración de la fase II la descarboxilación del ácido málico previamente almacenado se incrementa de modo importante y estos procesos saturan al aparato fotosintético con los productos de la descarboxilación. Entonces, el CO₂ externo no es excluido de forma elevada de la fotosíntesis y finalmente durante la fase III, la fotosíntesis depende enteramente del carbono endógeno, que es derivado del agotamiento del ácido málico (Fisher y Kluge, 1984).

Durante la primera parte de la fase II, las vacuolas pueden aún almacenar malato. En hojas suculentas bien irrigadas, durante este período la contribución del CO₂ para la ganancia total diaria de carbono puede ser substancial, particularmente en ambientes de temperaturas bajas, después de noches cortas (Winter, 1985) o cuando la acumulación del ácido málico durante la noche previa ha sido advertida (Fisher y Kluge, 1984). Este fenómeno justifica que el comportamiento de almacenaje de las vacuolas sea importante para el control de la vía del flujo de carbono durante la fase III. Es concebible que el cambio de comportamiento de la vacuola como un almacenador a una fuente de ácido málico puede cambiar el pH citoplasmático. Tales transformaciones pueden entonces ser responsables de los cambios drásticos en las propiedades regulatorias de PEP carboxilasa que ocurren en la fase II, esto es, que durante la fase II, PEP carboxilasa se torna más sensible a la inhibición por malato y pierde en un grado alto su afinidad por el sustrato fosfoenolpiruvato. Esto representa una interrelación entre la vacuola y las propiedades de PEP carboxilasa y puede entonces amplificar el cambio en el flujo del carbono del inicialmente (y aún dominante) modo C₄ al modo C₃ al finalizar la fase II (Fisher y Kluge, 1984); entonces, la vacuola puede ser considerada el primer factor determinante en el flujo del carbono en la fase II y también durante las otras fases de CAM (Kluge *et al.*, 1982).

Durante la primera etapa de la fase II la vacuola aún actúa como un reservorio en donde el malato, ya sintetizado, puede ser almacenado. El *pool* de malato citoplasmático es, entonces, mantenido a niveles bajos, permitiendo la actividad no inhibida de PEP

carboxilasa. Por consiguiente, el flujo de CO₂ externo es preferentemente por la vía C₄ en lugar de ser fijado por RuBP carboxilasa (Fisher y Kluge, 1984).

El control de la fase II puede ser explicado asumiendo que dos factores principales están involucrados en la regulación del flujo del carbono: (a) el comportamiento de almacenaje de la vacuola y (b) el control de la actividad de PEP carboxilasa (Kluge *et al.*, 1982). En la última parte de la fase II, el comportamiento de la vacuola deja de actuar como reservorio para funcionar como una fuente de ácido málico, esto es, con el duración de la fase II el ácido málico previamente almacenado es liberado de modo considerable, posteriormente metabolizado y el ácido málico sintetizado menos recientemente puede entrar a la vacuola. Este cambio en la vacuola no es disparado por la señal de la luz, en su lugar, de manera no conocida, por la concentración de ácido málico. Como consecuencia del cambio del comportamiento del almacenaje, el nivel del ácido málico del citoplasma incrementa, convirtiendo a la PEP carboxilasa de una forma metabólicamente activa a una forma metabólicamente inactiva y entonces inhibe la síntesis de ácido málico. El ácido málico previamente almacenado ahora se encuentra disponible para la descarboxilación y los productos de este paso entran a la fotosíntesis y saturan la capacidad de la vía fotosintética (Fisher y Kluge, 1984). En las plantas CAM, las propiedades regulatorias de PEP carboxilasa experimentan cambios característicos durante todo el ciclo diurno de CAM. Durante la noche (fase I), PEP carboxilasa tiene una sensibilidad baja al inhibidor L-malato o una afinidad alta para el sustrato PEP. Tales propiedades pueden favorecer la fijación de CO₂ vía C₄. En contraste, durante el día, PEP carboxilasa es altamente sensible a la inhibición por malato y tiene una baja afinidad por el sustrato PEP (Kluge *et al.*, 1982).

La sincronización de esos cambios en el metabolismo del carbono de la fase II varía considerablemente, en especial cuando el ciclo luz/oscuridad deriva de un patrón "estándar" 12h luz/12h oscuridad; conforme el período de oscuridad es acortado, la duración de la toma brusca de CO₂ estimulada por la luz se incrementa y una proporción incrementada de CO₂ durante la fase II es fijada por PEP carboxilasa. Las observaciones

indican el hecho de que el contenido de ácido málico del tejido se incrementa marcadamente durante la fase II siguiendo un decremento producido inmediatamente después de la iluminación, puede estar relacionado a las condiciones de noche corta. Después de periodos de oscuridad largos sólo ocurre una pequeña toma brusca de CO₂ estimulada por la luz, con una contribución insignificante de la carboxilación de PEP para la adquisición de carbono (Winter, 1985).

Fase III: flujo de carbono durante la descarboxilación. La fase III ocurre en la luz y consiste en la descarboxilación del ácido y la refijación del CO₂ con los estomas cerrados (Kluge *et al.*, 1982) a través del ciclo de reducción fotosintética del carbono (ciclo de Calvin), más la reducción de los remanentes esqueletos de tres carbonos a carbohidratos. Durante la luz del día, el ácido málico se difunde pasivamente hacia afuera de la vacuola y se descarboxila mediante uno o más de tres mecanismos (Winter, 1985). La descarboxilación del ácido málico es por la acción secuencial que involucra la NAD malato deshidrogenasa y la PEP carboxikinasa en el citosol, por la enzima NADP málica en el citosol o por la enzima NAD málica en la mitocondria (ver *, ** y *** de la Figura 1).

El mecanismo que se utiliza depende en gran parte de la especie. La distribución de las enzimas entre las especies parece obedecer a fronteras taxonómicas y las plantas CAM han sido clasificadas en las especies tipo PEP carboxikinasa y especies tipo enzima málica. PEP carboxikinasa esta presente, por ejemplo, en especies de Asclepiadaceae, Bromeliaceae y Euphorbiaceae, especies de estas familias tienden a presentar actividades muy bajas de enzimas NADP y NAD málica. Las familias Agavaceae, Aizoaceae, Cactaceae, Crassulaceae y Orchidaceae son enzima NADP y NAD málica (Winter, 1985).

El CO₂ que se libera se concentra mucho en las células y es refijado (sin fotorrespiración) por la rubisco en 3-PGA del ciclo de Calvin, lo que conduce a la formación de sacarosa, almidón y otros productos fotosintéticos. El piruvato que se forma por descarboxilación se convierte en PEP por acción de la piruvato fosfatodicina; después el PEP es utilizado:

parte en la respiración, parte se convierte en azúcares y almidón por glucólisis inversa; y parte se transforma en aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y compuestos aromáticos (Winter, 1985).

Durante la fase III, el consumo del ácido málico y la refijación del CO_2 liberado internamente por el ciclo de reducción fotosintética del carbono, son procesos estrechamente relacionados. En la parte inicial de la fase III, la tasa de producción de CO_2 del ácido málico excede la tasa de toma de CO_2 , causando la presión parcial intracelular del CO_2 (p_i). Se asume comúnmente que este incremento en p_i conduce al cierre de estomas. Esta alta presión parcial intercelular explica por qué las plantas CAM muestran las tasas más rápidas de fotosíntesis durante la fase III. Las altas tasas fotosintéticas combinadas con una conductancia foliar baja, también causan la presión parcial intercelular de O_2 que se incrementa. La presión de gas incrementada está asociada con una proporción considerablemente reducida del O_2/CO_2 en espacios intercelulares durante la desacidificación. Esto sugiere que una de las principales funciones de CAM es servir como un mecanismo concentrador de CO_2 en la luz, reduciendo la fotorrespiración y la inhibición de la fotosíntesis por O_2 (Winter, 1985; Medina *et al.*, 1989). Este mecanismo concentrador de CO_2 asociado en CAM durante la fase III permite una inversión reducida de nitrógeno dentro de la proteína RuBP la cual constituye menos del 20 % de las proteínas solubles totales en hojas de *K. pinnata*, en lugar de arriba del 50 % frecuentemente en hojas de especies de C_3 (Winter, 1985).

Es característico de la fase III que la fotosíntesis dependa enteramente del carbono suplementado de la descarboxilación del ácido málico. Como ya se mencionó, las propiedades de PEP carboxilasa, junto con aquellas de la vacuola, previenen la vía C_4 interfiriendo la asimilación final del carbono derivado del malato. El CO_2 externo es excluido casi completamente del aparato de fijación de CO_2 . Las concentraciones altas de CO_2 intercelular, que se presentan como consecuencia de la descarboxilación del malato, pueden ser una razón de este fenómeno (Kluge *et al.*, 1982).

Con anterioridad se mencionó que la señal de la luz no es necesaria para disparar la liberación del ácido málico. Sin embargo, la luz tiene un efecto claro sobre la velocidad y el grado en el cual el ácido málico es consumido durante la fase III. Se puede concebir que la luz actúe sobre la descarboxilación por la regulación fotosintética de la concentración interna de CO₂. Una concentración razonablemente baja de CO₂ interno durante la fase III es un pre-requisito para el funcionamiento de las descarboxilasas involucradas en el agotamiento del malato. Las altas tasas de descarboxilación son esencialmente requeridas para mantener el citoplasma libre del malato y, de esta forma, mantener un gradiente adecuado cuesta abajo en la concentración del ácido málico entre la vacuola y el citoplasma. Debido a que el eflujo del ácido málico de la vacuola hacia el citoplasma es pasivo, una liberación efectiva del malato de la vacuola puede depender estrictamente de ese gradiente. La necesidad de altas tasas de descarboxilación es ilustrada mejor por la circunstancia de que, en las células de plantas CAM, el volumen del citoplasma es menor que el 1 % de la vacuola, por lo que, aún cantidades pequeñas de malato acumulado en el citoplasma podrían destruir el gradiente y prevenir el posterior flujo del ácido málico de la vacuola (Kluge *et al.*, 1982).

Fase IV: flujo del carbono durante el último periodo de luz. La fase IV ocurre durante la última parte del periodo de luz después de que la desacidificación se completa (Edwards y Walker, 1983), cuando, en presencia de un potencial hídrico foliar lo suficientemente alto, los estomas puedan abrirse y el CO₂ externo sea fijado. La fase IV se realiza en un periodo de luz adecuado y condiciones ambientales en donde se permita el consumo del malato, esto es, intensidades de luz y temperatura altas (Kluge *et al.*, 1982).

Durante la fase IV, el consumo del malato es completado y el CO₂ endógeno no satura de modo considerable el aparato fotosintético (Kluge *et al.*, 1982). La fase IV consiste en la fijación de CO₂ atmosférico predominantemente vía la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (Edwards y Walker, 1983). Conforme el *pool* del ácido málico se agota, la tasa de fijación de CO₂ progresivamente excede la tasa de producción de CO₂ interna causando el decline de la presión parcial de CO₂ intercelular. La conductancia estomática

se incrementa y cantidades substanciales de CO_2 atmosférico pueden ser tomadas a una tasa más o menos elevada y, en cantidades substanciales constantes hasta el comienzo del período de oscuridad (Winter, 1985). En especies de *Kalanchoe*, los productos de la fijación de CO_2 durante la fase IV son azúcares sumamente solubles, los cuales pueden ser usados de modo preferencial para crecimiento en vez de utilizarse en la regeneración de PEP para la fijación de CO_2 en la oscuridad. PEP carboxilasa no es completamente inactiva durante la fase IV (Winter, 1985), pues el CO_2 externo puede ser transferido substancialmente a malato. Este efecto indica la actividad de la vía C_4 durante la fase IV (Kluge *et al.*, 1982).

Resultados recientes sugieren que la fase IV no se encuentra en una situación de estado-estable, al menos no durante las primeras dos horas de la fase IV. Los experimentos de $^{14}\text{CO}_2$ indican una situación similar a la observada durante la fase II. Esto es, las tasas de fijación de $^{14}\text{CO}_2$, indican que también existe un cambio al ser observadas durante la noche y en la oscuridad y junto con el patrón de marcadores obtenidos, sugieren que también existe un cambio en la fase IV entre las actividades relativas de las vías C_3 y C_4 . Sin embargo, este cambio es casi una "imagen de espejo" de la fase II: durante las etapas iniciales de la fase IV, la vía C_3 domina sobre la vía C_4 y así la fase IV se mantiene, esta situación se invierte gradualmente (Figura 2; Kluge *et al.*, 1982).

Puede considerarse que, como ocurre durante la fase II, la vacuola y el control de PEP carboxilasa son los principales factores involucrados en la regulación del flujo del carbono durante la fase IV. La vacuola, ahora con el ácido málico agotado, actúa como reservorio, una vez que el ácido málico sintetizado pueda entrar en la vacuola con una gran facilidad y pueda ser almacenado ahí. Asimismo, los cambios de las propiedades de PEP carboxilasa permiten la síntesis efectiva de ácido málico. En otras palabras, durante la fase IV la sensibilidad de la enzima a la inhibición del malato decrece y la afinidad a PEP se incrementa. Al final de la fase IV, se presenta un patrón del flujo del carbono muy parecido al de la fase I: el CO_2 externo ahora guía predominantemente a la síntesis de malato. Sin embargo, ya que la luz está presente, la fijación fotosintética del carbono

puede proceder, pero los fragmentos C-3 producidos hasta este punto son consumidos en la vía C₄. La similitud entre las últimas etapas de la fase IV con el flujo de carbono durante la fase I se hace más evidente si la fase IV es prolongada extendiendo el período de luz (Kluge *et al.*, 1982).

4.4.2. Control de CAM.

Debido a que CAM responde a un complejo de factores externos e internos, resulta difícil estar seguros de que CAM esté presente en una planta determinada bajo condiciones particulares de cultivo (Osmond, 1978).

Aunque la capacidad de una planta para realizar metabolismo CAM está genéticamente determinada, su control también es ambiental y ontogénico. En general, el metabolismo CAM se ve favorecido por los días calurosos con niveles de irradiación elevados, noches frías y suelos secos, situaciones todas que predominan en los desiertos. Las concentraciones elevadas de sal en el suelo, que causan una sequía osmótica, también favorecen un metabolismo CAM.

Algunas especies (cactáceas en especial) pueden permanecer, en condiciones de sequía, con los estomas cerrados por semanas, sin ganar ni perder mucho CO₂, aunque aún haciendo uso de cierta energía luminosa para fotofosforilar durante las horas de luz.

Dentro de las 25 ó más familias con especies CAM, hay especies que cambian de C₃ a CAM en respuesta a perturbaciones ambientales (disponibilidad de agua) o como un resultado de la ontogenia (Ting y Gibbs, 1982). Estos cambios han llevado a la conclusión de que CAM es una forma de adaptación a ambientes secos. La razón es que los estomas están abiertos en la noche, cuando la demanda de evaporación es baja, y cerrados durante la luz del día, cuando la demanda de evaporación es alta. La conservación de agua es entonces, claramente, un aspecto decisivo de CAM. (Ting y Gibbs, 1982).

4.4.2. Variantes de CAM.

Donde algunas especies CAM presentan estrés hídrico, los estomas tienden a cerrarse y hay una disminución del metabolismo CAM, a lo cual se ha nombrado "idling" (Ting y Rayder, 1985). En CAM-idling los estomas están cerrados en el día y en la noche, resultando que casi no existe pérdida de agua mientras que se restringe la toma de CO₂ externo (Winter *et al.*, 1986), pero aún hay una fluctuación diurna de ácidos orgánicos, aunque muy disminuida. CAM-idling es interpretado como un mecanismo conservador de carbono que permanece del resultante reciclado del CO₂ generado internamente. Tal reciclado puede mantener a las plantas en equilibrio (es decir, que sobrevivan) en un estado moderadamente activo con una rápida respuesta a condiciones favorables de agua y asimilar CO₂ atmosférico (Ting y Gibbs, 1982; Winter *et al.*, 1986). No se puede presentar un crecimiento neto ya que no existe una toma neta de CO₂, pero parece que el metabolismo activo es mucho más prolongado que como se presenta normalmente (Ting y Rayder, 1985). También el reciclado (CAM "idling") influye en una fotosíntesis activa (si bien en un nivel bajo), quizás previniendo la inhibición foto-oxidativa de los fotosistemas, la cual puede producir un daño irreversible (Ting y Gibbs, 1982).

En otros grupos de plantas tales como *Peperomia* (Peperaceae), y *Pereskia* (Cactaceae), las plantas muestran fotosíntesis C₃ bajo condiciones de agua adecuada. Cuando están en estrés hídrico, los estomas se cierran en el día y en la noche y hay una inducción de CAM-idling. Como en *Peperomia*, algunas otras especies tales como *Portulacaria afra* (Portulacaceae) y *Mesembryanthenum* (Aizoaceae) son C₃ cuando crecen bajo un estatus hídrico favorable, pero cambian a CAM o CAM-idling cuando están en estrés hídrico o cuando se irrigan con solución salina.

En el grupo de plantas suculentas, hay especies que presentan CAM cuando crecen en sus hábitats naturales, éstas son frecuentemente llamadas especies CAM "obligadas". Al menos alguna de ellas cambiarán a CAM-idling cuando entren en estrés. Otras suculentas son C₃ cuando crecen en hábitats favorables, pero cambian a CAM o CAM-idling cuando

se estresan. En algunos casos estos cambios son reversibles, aunque hay evidencia de que algunos cambios C₃ a CAM son el resultado del desarrollo ontológico (Ting y Rayder, 1985; Altesor *et al.*, 1992).

Por otro lado, se encuentra la modificación de CAM nombrada como "CAM-cycling" que parece ser intermediario, en términos de evolución, entre el metabolismo C₃ completo y el CAM completo (Altesor *et al.*, 1992). CAM-cycling se caracteriza por el intercambio de gas de tipo C₃ acompañado por una fluctuación diurna de ácido. La conductancia estomática es alta durante el día y baja durante la noche, pero aún hay una acidificación nocturna debida principalmente al reciclado del CO₂ respirado (Guralnick *et al.*, 1986).

Es bien sabido que CAM puede ser considerablemente modulado durante la ontogenia de la planta (Kluge *et al.*, 1987), puesto que existe una transición dependiente de la edad en la asimilación del carbono por la vía C₃ a CAM (Thomas *et al.*, 1992). El estatus de desarrollo gobierna aspectos del ciclo de vida vegetal, particularmente aquellos involucrados en la transición del crecimiento vegetal al reproductivo (Cushman *et al.*, 1990).

El grupo de trabajo de Altesor (1992) sugieren, a partir de sus estudios con cactáceas, que los caracteres ancestrales, en este caso la vía C₃, pueden aún ser expresados durante los primeros estados del ciclo de vida. Una "memoria" ontogenética, revelada por la presencia de un metabolismo C₃ durante el desarrollo temprano de especies típicas CAM, tiene importantes implicaciones en la sistemática, en los niveles ecológicos y morfofisiológicos.

Para entender el metabolismo durante las semanas iniciales de vida -un tiempo muy crítico para la sobrevivencia de las plántulas de cactus - puede interpretarse, desde el punto de vista de las relaciones planta-ambiente, la adaptabilidad de algunos patrones observados en el establecimiento de la planta. Como regla general, las plántulas de cactus tienden a establecerse bajo el dosel de las plantas adultas (que a la vez fungen de

"nodrizas") proporcionándoles sombra y protección de la radiación dañina. Estas plantas también permiten la retención de nitrógeno y acumulación de suelo, les dan protección contra la erosión del viento y en algunos casos pueden bombear agua de los horizontes profundos de los perfiles del suelo. En otros casos, estas plantas "nodrizas" pueden aun servir como refugios contra depredadores. La sombra de las plantas "nodrizas" tiene un efecto positivo en la supervivencia de las plántulas, pues incrementan la probabilidad de éxito de su establecimiento. Estas ventajas, sin embargo, implican un costo en la proporción de crecimiento de las plántulas, ya que la sombra de las plantas "nodrizas" hace decrecer la densidad del flujo fotosintético de fotones (PPF) (Altesor *et al.*, 1992).

Se ha demostrado que la radiación excesiva y las temperaturas altas son los principales factores de mortalidad para las plántulas de cactus (Winter, 1985). De esta forma, un metabolismo C_3 en las semanas iniciales de vida de las plántulas de los cactus puede tener consecuencias importantes desde el punto de vista adaptativo (Altesor *et al.*, 1992).

Por otro lado, la proporción de crecimiento rápido que caracteriza a las plantas C_3 posiblemente puede compensar los bajos niveles de la radiación activa fotosintética, provocados por la planta "nodriza", permitiendo a las plántulas enraizar, evitar el período crítico de establecimiento y así incrementar sus posibilidades de sobrevivir (*op. cit.*).

El equipo de trabajo de Altesor en 1992, concluyen que especies de cactus de subfamilias ampliamente diferentes muestran todas un metabolismo C_3 intermediario después de la germinación y que esto posiblemente sea una característica en la familia completa. Con excepción de especies de *Pereskia*, el metabolismo CAM se desarrolla en todas las otras especies durante las primeras semanas de la ontogenia de las plántulas. En el caso de las plántulas de cactus, hay razones poderosas para inferir que un metabolismo C_3 puede ser adaptativo en las primeras etapas de germinación y desarrollo, cuando el agua es pocas veces un factor limitante.

Aunque CAM es claramente controlado por el ambiente, la capacidad para el cambio está determinada por el desarrollo, pues existe un programa de desarrollo que regula la transcripción de PEP carboxilasa y la estabilidad de mRNA. Este programa parece estar sincronizado con las condiciones climáticas en el ambiente nativo de las plantas. El cambio de C₃ a CAM es programado por el desarrollo, pero la magnitud de la respuesta es potenciada por el estrés ambiental por lo que las plantas adquieren la capacidad para responder. La capacidad de las plantas para inducir CAM por la expresión del gene para PEP carboxilasa está íntimamente relacionada con el estatus del desarrollo de la planta (Cushman *et al.*, 1990).

Por ejemplo, las hojas jóvenes *Bryophyllum fedtschenkoi* emplean primariamente la fotosíntesis C₃ y desarrollan CAM conforme maduran. Las hojas jóvenes *Kalanchoë blossfeldiana* asimilan el CO₂ por medio de la vía C₃ cuando la planta crece en días largos, pero son inducidas a llevar a cabo CAM bajo condiciones de día corto. Sin embargo, las hojas maduras también llevan a cabo CAM bajo condiciones de días largos. La inducción de CAM en *Mesembryanthemum crystallinum* es, de igual forma, influenciada por la ontogenia de las hojas. En un estudio reciente, se observó que PEP carboxilasa sólo puede ser inducida después de cinco semanas de crecimiento, siguiendo la formación del quinto par de hojas y el comienzo del crecimiento secundario de *M. crystallinum*. En *Bryophyllum fedtschenkoi* no fue posible inducir CAM hasta que alcanzó un cierto estado de desarrollo. En su hábitat natural, en el área de costa del Mediterráneo, la planta germina durante la temporada de lluvia en enero y crece de modo fotosintético C₃. El comienzo de la inducción de CAM ocurre tres meses después de la germinación, aparentemente en respuesta al agua limitada en el suelo (Cheng y Edwards, 1991).

La gran plasticidad en la expresión de CAM entre las distintas especies y dentro de ellas ciertamente ha sido una de las razones del continuo y creciente interés de los fisiólogos y ecólogos vegetales en CAM, lo cual se refleja en el importante número de trabajos que se han publicado acerca del tema en la última década (Winter, 1985).

4.5 Metabolismo ácido de Crasuláceas en cultivos *in vitro*.

El metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM) ha sido objeto de constante estudio desde que De Saussure en 1804 se percató de su existencia (Edwards y Walker, 1983) dada su peculiaridad. Las investigaciones detalladas que han analizado el metabolismo ácido de Crasuláceas a través del cultivo *in vitro* son sumamente escasas y raras.

Wilkins y Holowinsky en 1965 investigaron de qué depende el que ocurra un ritmo circadiano endógeno de intercambio metabólico de CO₂ en callos de *Kalanchoë daigremontiana* en continua oscuridad y aire libre de CO₂. El acontecimiento del ritmo en hojas completas, segmentos de hojas y en los cultivos de callo a partir de fragmentos de hojas mostró la *ritmicidad*, lo cual los llevó a concluir que ésta es una propiedad celular general y no depende de la organización de la hoja. Mencionan que los cultivos de callos de *K. daigremontiana* poseen un ritmo que es fácilmente detectado bajo condiciones ambientales uniformes. Observaron que, de modo semejante a las hojas completas y segmentadas de *K. daigremontiana*, la fase del ritmo en callos es determinada por el crecimiento del período de oscuridad. Este ritmo del metabolismo de CO₂ en los cultivos de callos de *K. daigremontiana* fue sugerido evidentemente porque el ritmo persistió bajo condiciones ambientales uniformes de temperatura y oscuridad, porque la fase puede ser establecida en algún momento del día y finalmente debido a que el periodo es significativamente menor de 24 horas.

McLaren y Thomas (1967) compararon el ritmo diurno de ácido málico y la toma nocturna de CO₂ en callos verdes y sin color de *Kalanchoë crenata*. No pudieron observar dichos parámetros y asumieron la ausencia de CAM en estos cultivos de callos.

Al respecto del ritmo en la producción de CO₂ en cultivos de callos, Scheider-Moldrickx (1983, citado por Kluge *et al.*, 1987) realiza un estudio detallado sobre el cultivo de callos derivados de varios híbridos de *K. blossfeldiana*. Los callos estudiados mostraron una

producción permanente de CO_2 , por lo que concluyó que esta característica no es una propiedad indicativa de CAM.

Seeni y Gnanam, en 1980, estudiaron las propiedades fotosintéticas CAM en los cultivos de células en suspensión de *Chamaecereus silvestrii*. Evaluaron las reacciones de fotofosforilación, el transporte de electrones, la fijación de CO_2 ; analizaron los productos de fotosíntesis, la actividad de las principales enzimas componentes de la maquinaria enzimática de CAM, la acidez titulable, el contenido de malato y estimaron las concentraciones de clorofila y proteínas solubles. Observaron que la oscilación diurna de la acidez titulable y el contenido de malato encontrados en los tejidos intactos estuvieron ausentes en las células cultivadas. Los cultivos de células no mostraron alguna oscilación diurna, aunque poseen las enzimas características para la vía CAM. Sin embargo, los perfiles de la toma de CO_2 y los asimilados (productos de fotosíntesis) en la oscuridad mostraron que las células en suspensión llevan a cabo un metabolismo CAM, pues el CO_2 se fija por la noche y es incorporado principalmente a malato. Asimismo, sus resultados mostraron un completo funcionamiento en las reacciones de fotofosforilación y en el transporte de electrones. Señalan que la ausencia de estomas y vacuolas puede explicar la carencia de una oscilación diurna de la acidez titulable en los cultivos de células en suspensión de *C. silvestrii*.

Seeni y Gnanam (1980) arguyen que existen evidencias que explican el agotamiento rápido y continuo del carbono en el malato. Ésto es debido a que el malato presente se transforma a citrato e isocitrato (del ciclo de ácidos tricarbóxicos) por la vía piruvato; después de la descarboxilación del citrato e isocitrato, los productos entran al *pool* de aminoácidos. La ausencia de vacuolas grandes y el cambio rápido de malato fueron considerados para explicar la falta de la fluctuación diurna de ácido en las células cultivadas.

En 1987, el equipo de trabajo de Brulfert, inducen CAM en cultivos de callos de *Kalanchoë blossfeldiana* por medio de tratamientos con diferentes fotoperíodos (día largo y día corto),

midiendo los niveles y oscilaciones diurnas de la cantidad de malato y la enzima PEP carboxilasa. El objetivo fue observar si la inducción de CAM por fotoperíodos adecuados puede ser realizada por la maquinaria celular, o requiere una organización supracelular. Por lo tanto diseñaron su investigación para conocer los procesos dependientes del fitocromo en el control de la síntesis y operación de PEP carboxilasa.

Se encontró que las células de los callos fueron inducibles a CAM por tratamiento en días cortos, de acuerdo con los niveles y oscilaciones diurnas de los *pools* de malato y la capacidad de PEP carboxilasa. Evidenciaron también la síntesis *de novo* de la enzima PEP carboxilasa bajo el régimen de día corto. No obstante la continua producción de CO₂, obtuvieron patrones semejantes a CAM bajo tratamiento de día corto.

En el mismo año (1987), Kluge *et al.*, estudiaron CAM en cultivos mixotróficos de callos de *Kalanchoë blossfeldiana*. Sus experimentos se dirigieron primordialmente a obtener más información acerca de la probable operación de la vía del flujo del carbono de CAM en células cultivadas de la planta CAM *Kalanchoë blossfeldiana*. Gracias a la ventaja que ofrecen los fragmentos de células y plantas intactas para el estudio de CAM y dado que éste es modulado por la ontogenia de la planta, continuaron con el estudio de CAM durante la diferenciación controlada de las células de los callos a través de la etapa de brotes adventicios y organismos desarrollados de callos cultivados, para lo cual evaluaron el intercambio neto de CO₂ a través del monitoreo de la incorporación de ¹⁴C en el malato, siguiendo el flujo típico en CAM del ácido málico sintetizado durante la noche hasta los productos finales de la fotosíntesis; de igual modo analizaron las actividades enzimáticas de PEP carboxilasa, NADP-enzima malica, NAD⁺ enzima malica y Rubisco carboxilasa en callos, plántulas obtenidas a partir de callos trasplantadas en maceta y de plantas cultivadas *in vivo*.

En los tres sistemas hubo una fluctuación diurna del contenido de malato, con la acumulación de malato durante la noche y un agotamiento del mismo durante el día. La amplitud de la fluctuación diurna del malato, indicada por la diferencia entre el contenido

máximo de malato al final del día, fue más baja en los callos y más altas en las plantas adultas: en las plántulas regeneradas a partir de callos la diferencia de malato fue tan alta como la que se encontró en los callos.

El intercambio de CO₂ neto por el callo se caracterizó por la producción de CO₂ independientemente de la luz o la oscuridad. Sin embargo, la producción neta permanente de CO₂ por los callos -argumentan- no necesariamente se contraponen con lo que se asumió que es la vía CAM. El perfil del intercambio de CO₂, característica de las plantas en función CAM, fue también encontrado en los callos, esto fue particularmente evidente cuando trazaron una línea de cero arbitrario al nivel del medio día del intercambio de CO₂ sobre la gráfica mostrando el intercambio del gas en el callo. Se asumió que esta línea arbitraria de CO₂ correspondía, aproximadamente, al intercambio neto de CO₂ por la planta adulta. Las plantas regeneradas y las cultivadas *in vivo* mostraron una curva típica de consumo de CO₂.

En lo referente al flujo típico de CAM encontraron que, en los tres sistemas vegetales que manejaron, el ¹⁴C incorporado en la noche se localizó principalmente en el malato. Cuando el ¹⁴CO₂ fue fijado en la luz, el ¹⁴C incorporado, fue encontrado, predominantemente, en los productos de la fotosíntesis, es decir, principalmente en azúcar, glucanos (es decir, compuestos de alfa-amilasa solubles) y ésteres fosfato. Obtuvieron una diferencia clara entre los callos y las plántulas obtenidas a partir de callos en cuanto a la distribución del ¹⁴C incorporado entre los productos fotosintetizados. En los callos fueron mayores los compuestos fosforilados en relación con la fracción soluble de alfa-amilasa. De modo inverso ocurrió en los brotes obtenidos a partir de callos, pues la sacarosa fue el producto fotosintético en donde la incorporación de ¹⁴C fue predominantemente. Por lo anterior, concluyeron que la corriente del carbono en CAM está presente en sistemas cultivos de callos y de plántulas regeneradas a partir de callos. No obstante, los resultados revelaron que la capacidad de CAM en callos es muy baja en comparación con plantas desarrolladas de los mismos.

Doi y colaboradores, en 1989, midieron la concentración de CO₂ y O₂ en *Caladium bicolor* (planta C₃), *Phalaenopsis sp* (planta CAM) y *Dendrobium phalaenopsis* (planta CAM) bajo condiciones de cultivo *in vitro*, en fotoperíodos de 16h, 8h luz y luz continua. Obtuvieron que en luz continua, la concentración de CO₂ en los recipientes de cultivo permaneció baja, esto es, en un 0.01 %, -el cual fue un nivel de CO₂ deficiente para las plantas cultivadas. Por otro lado, el nivel de O₂ fue alrededor de 21.1 %. En los recipientes de cultivo de *Caladium bicolor* en fotoperíodo de 16h y 8h luz, el nivel de CO₂ se incrementó continuamente durante el período de oscuridad y decreció inmediatamente después de la luz. Finalmente, el nivel del punto de compensación del CO₂ de 0.05 % se alcanzó pocas horas después de la luz. En *Phalaenopsis* y *Dendrobium phalaenopsis*, la toma de CO₂ se observó a la mitad del período de oscuridad, pero el nivel del CO₂ en los recipientes se incrementó otra vez al final del período de oscuridad. Estos resultados les indicaron que los *pools* de ácidos orgánicos no se desarrollaron y que las plantas cultivadas *in vitro* muestran una pequeña actividad de CAM. Por otro lado, el nivel de O₂ decreció gradualmente durante el período de oscuridad y se incrementó durante el período de luz en plantas C₃ y en plantas CAM.

Con base en las evidencias de que el modo de fotosíntesis en callos verdes obtenidos de hojas de la planta *Kalanchoe blossfeldiana* cv. Montezuma es controlado por la longitud del día, Mricha y colaboradores, en 1990, diseñaron experimentos para determinar el comportamiento o participación del fitocromo en el control de CAM en los tejidos de callos. Compararon los resultados que obtuvieron con las plantas tratadas con días largos, días cortos y plantas sujetas a luz interrumpida aplicada durante noches largas. Su objetivo fue saber si las diferencias en la respuesta en función de la longitud del día son estrictamente dependientes del fotoperíodo y poder evidenciar que las correlaciones con la planta completa no son necesarias para la operación del fitocromo, como se conoce en cultivos de células en suspensión.

Los criterios metabólicos que utilizaron para verificar la inducción de CAM fueron la síntesis de PEP carboxilasa y el incremento en el *pool* de ácido málico durante la noche.

Encontraron que después de una etapa lag de 30 a 35 días, en los callos tratados por fotoperíodos cortos presentaron un incremento rápido en el *pool* de ácido málico y la actividad de PEP carboxilasa. En contraste, en las noches interrumpidas y en noches largas no se presentó la inducción -como en los días cortos- y se mantuvieron los niveles enzimáticos y metabólicos. Estos resultados mostraron una mediación en las respuestas de los callos al fotoperíodo, pero la fase lag requerida para la inducción de CAM fue significativamente mayor que la observada para las plantas completas, la cual es de 7 días cortos.

Las respuestas de los protoplastos a la modulación fitocromática por radiaciones monocromáticas mostraron un tamaño incrementado de los protoplastos sujetos a una radiación sucesiva de 5 min. con luz roja. Los resultados sugieren que la luz roja tiene un efecto acumulativo durante el subsecuente período de oscuridad. El aumento del tamaño de los protoplastos es mediado por el fitocromo. Estos resultados son un ejemplo de la respuesta a corto tiempo de los protoplastos CAM en función de la modulación del fitocromo por radiaciones monocromáticas específicas. Asimismo los resultados proporcionan evidencia de que no fueron necesarias correlacionar plantas completas a la operatividad del fitocromo.

Thomas *et al.*, en 1992, observaron la influencia del NaCl sobre los niveles de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (indicadora y componente del metabolismo CAM) en cultivo de células en suspensión (no fotosintético) de *Mesembryanthemum crystallinum*, con el objetivo de discernir si la iniciación de CAM (medida por la inducción del gene inducido por estrés salino *ppc1* de PEP carboxilasa) está basada en el nivel celular o si es a nivel tejido/órgano en respuesta a la sal. Para lo cual compararon los cultivos de células indiferenciadas y de plantas completas diferenciadas para determinar el nivel de organización celular necesario para provocar una respuesta particular a la sal. Partieron del hecho que se cuenta con registros de algunas respuestas comunes encontradas a causa del estrés osmótico por NaCl en cultivos en suspensión y en plantas intactas (tales como incrementos en los niveles de solutos compatibles, principalmente prolina,

glicibetaina y otros polioles), estimaron la cantidad de aminoácidos solubles, el crecimiento celular y la cuantificación de la proteína PEP carboxilasa en cultivos de células en suspensión de *M. crystallinum* en presencia de 400 mM de NaCl. Los resultados que obtuvieron mostraron que los cultivos celulares de *M. crystallinum* crecieron en presencia de 400 mM de NaCl y respondieron al tratamiento salino verificándose la acumulación de prolina. No observaron respuestas más complejas a la sal, tales como la adopción fotosintética del cambio a CAM a partir de C₃, medida por la acumulación del gene *ppc1* PEP carboxilasa. Al no obtener la inducción de CAM en sus cultivos de células, debido a que los niveles de los genes *ppc1* y *ppc2* (gene constitutivo) fueron iguales en sus tratamientos, concluyeron que el hecho sería mejor estudiado en cultivos celulares fotoautotróficos o en plantas completas, pues, posiblemente, la respuesta es tejido-dependiente o fotoautotrófica-dependiente. Asimismo, afirman de modo concluyente que, como las células en suspensión son presumiblemente liberadas de sus necesidades de desarrollo y fotosintéticas -las cuales han sido implicadas en la inducción de PEP carboxilasa *in vivo*-, el cambio del mecanismo para la inducción de CAM no puede ser activado en células crecidas heterotróficamente.

Partiendo del hecho de que muchas reacciones al estrés ambiental requieren la jerarquía de la organización de tejidos para ser expresadas (según conclusiones de Thomas *et al.*, 1992), Adams *et al.*, en 1992, compararon los efectos metabólicos en alta salinidad entre plantas y cultivos de células en suspensión de la halofita facultativa *Mesembryanthemum crystallinum*. Ellos incluyeron en su investigación otras observaciones características de las respuestas al estrés salino y temperaturas bajas en *M. crystallinum* tales como la acumulación de los osmoprotectores putativos, azúcares y azúcares-alcohol. Verificaron la distribución de estos azúcares encontrando que ésta era marcadamente diferente entre las células y las plantas en estrés, particularmente la distribución entre tipos de células, en cuanto a la composición diferente de azúcares y polioles (específicamente de las células vejiga de la epidermis). El contenido de iones, de azúcares y de azúcares-alcohol de las células vejiga de la epidermis indica que Na⁺, Cl⁻, pinitol y compuestos de carbono desconocidos son los causantes de la presión osmótica de estas células, mientras que las

concentraciones de aniones son bajas. Ésto los llevó a concluir que las células en cultivo presentan sólo parcialmente los mecanismos de respuesta al estrés de plantas intactas y proponen que la comunicación entre diferentes tejidos se requiere para alcanzar una completa respuesta al estrés ambiental.

Es importante destacar que especies fácil y comúnmente propagadas *in vitro* constituyen sistemas "modelo" útiles para investigación de tejidos cultivados (Starling y Dodds, 1983; Thomas *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1992), tal es el caso de especies *Kalanchoë*, y *Mesembryanthemum*, ya que debido a su capacidad tan alta de regeneración *in vivo* e *in vitro* de algunas de ellas y por el conocimiento detallado de sus necesidades en este tipo de cultivo, han sido ampliamente usadas en el desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos y en experimentos bioquímicos, moleculares y fisiológicos *in vitro*. Razón por la cual han marginado a especies que presentan un crecimiento lento, dentro de éstas se encuentran las cactáceas, un grupo de importancia económica. Sin embargo, dada la importancia que revisten las cactáceas, lo anterior no debe ser un impedimento para experimentar con ellas.

Con base en las investigaciones citadas, se concluye que el metabolismo CAM ofrece posibilidades de estudio aún no exploradas en plantas completas obtenidas a partir de cultivos *in vitro*, lo cual puede constituir una aportación para conocer el funcionamiento vegetal bajo estas condiciones de cultivo. En consecuencia, este trabajo está orientado para obtener más información acerca de la presencia de CAM en tales sistemas de cultivo *in vitro*. Por lo tanto, se proponen los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad metabólica CAM en plantas obtenidas a partir de cultivos *in vitro* y durante su aclimatación a suelo de las especies *Rhipsalidopsis rosea*, *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar las concentraciones hormonales, en condiciones de cultivo *in vitro*, en las cuales sea posible obtener profusa y rápidamente brotes y plántulas de *R. rosea*, *C. silvestrii* y *E. crenatum*.
- Evaluar la acidez titulable, patrón diario de respiración y fotosíntesis por la medición de CO₂, así como la cuantificación de la concentración de prolina, el contenido de clorofila y la cantidad de proteínas solubles, durante el período de oscuridad en plantas obtenidas de los cultivos *in vitro* y durante el trasplante a tierra de cada una de las tres especies de cactáceas mencionadas.
- Establecer el período en el cual se presenta el metabolismo CAM en las plantas obtenidas de cultivos *in vitro* trasplantadas a tierra.

5. METODOLOGÍA.

5.1 ESPECIES.

La especie *Rhipsalidopsis rosea* fue proporcionada por el Jardín Botánico del Campus Iztacala, UNAM. Las especies *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum* fueron proporcionadas por el M. en C. Ernesto Aguirre León (Unidad de Biotecnología y Prototipos, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Campus Iztacala, UNAM) de su colección personal. Las tres especies se sometieron a un pretratamiento que consistió en trasladarlas de luz solar directa a luz solar indirecta para permitir la activación de los meristemas axilares (Tran Thanh Van, 1981) por un mes.

5.2 CULTIVO *IN VITRO*.

La propagación *in vitro* de las especies de cactáceas se realizó por medio de meristemas tipo (aréolas) obtenidos de plantas adultas (Fay y Gratton, 1992; Mauseth, 1979; Lazarte *et al.*, 1982; Vyskot y Jára, 1984; Escobar *et al.*, 1986; Ault y Blackmon, 1987; Stuppy y Nagl, 1992; Starling y Dodds, 1983) en medio de cultivo aséptico (Steinhart, 1962) ya que las plantas derivadas de aréolas de una planta madura son mucho más similares a la planta original (Starling y Dodds, 1983).

Se determinaron las combinaciones hormonales en las cuales se logró una la generación de brotes a partir de estas aréolas (en donde se obtuvieron brotes con las características morfológicas a la planta madre) con las fitohormonas ANA y KIN, mediante la siguiente matriz de tratamientos hormonales:

Concentraciones de ANA (mg/L)

	0	0.1	0.5	1.0
0	0/0	0/0.1	0/0.5	0/1.0
0.5	0.5/0	0.5/0.1	0.5/0.5	0.5/1.0
1	1/0	1/0.1	1/0.5	1/1.0
5	5/0	5/0.1	5/0.5	5/1.0
10	10/0	10/0.1	10/0.5	10/1.0

Concentraciones de KIN (mg/L)

El medio de cultivo que se utilizó fue el MS (Murashige y Skoog, 1962). De cada una de las combinaciones hormonales (tratamientos) se realizaron cinco repeticiones. Dado que en experimentos previos los cultivos se contaminaron por causa de hongos (causados por una contaminación sistemática en la planta madre), se agregó fungicida [Benlate: Methyl 1-(butyl carbomoyl)-2-benzimidazolecarbamate] al medio de cultivo en concentración de 0.005 g/L.

Brotes y cladodios completos e intactos de cada una de las cactáceas fueron sujetos al procedimiento de desinfección de su superficie (desinfestación). El material vegetal fue lavado con agua y detergente comercial. Posteriormente, se incluyeron en una solución de alcohol al 80 % por un minuto. A partir de este momento, el procedimiento se realizó bajo condiciones asépticas. Se retiró el alcohol y como paso siguiente se colocó el material vegetal en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % (a partir de la concentración del cloro comercial; Mauseth y Halperin, 1975; Dabekaussen *et al.*, 1991; Clayton *et al.*, 1990; Johnson y Emimo, 1979; Lazarte *et al.*, 1982; Ault y Blackmon, 1987) por 30 minutos adicionando una gota por litro de solución de Tween-20 como surfactante (Boyle *et al.*, 1994; Boyle, 1992; Vyskot y Jára, 1984; Dabekaussen *et al.*, 1991). El material vegetal se mantuvo en agitación leve en una parrilla con agitador magnético evitando el daño o maltrato del vegetal y sobre todo de las aréolas. Se eliminó el hipoclorito de sodio y se enjuagó 3 ó 4 veces el material vegetal con agua destilada estéril. Se realizaron los cortes y los explantes se sembraron los frascos con medio de cultivo en las diferentes combinaciones hormonales.

Los explantes de *R. rosea* fueron obtenidos cortando fragmentos con una longitud de aproximadamente 1.5 cm de largo, del ápice de los filoclodios, en los cuales se incluyó la aréola compuesta entera. Los explantes fueron orientados verticalmente en el medio de cultivo (Boyle *et al.*, 1994).

Los brotes de la planta *in vivo* de *C. silvestrii* fueron seccionados transversal y longitudinalmente para la obtención de explantes. En todos los cultivos los explantes fragmentados longitudinalmente mostraron un número alto de brotes desarrollados, por lo tanto, en cultivos subsecuentes fueron usados explantes longitudinales (Escobar *et al.*, en 1986 observaron un comportamiento similar en cuanto a la disección de los cladodios de *Opuntia*). Los explantes de *C. silvestrii* fueron colocados con la zona de corte sobre el medio de cultivo (Dabekaussen *et al.*, 1991).

Los cladodios de *E. crenatum* fueron cortados de modo horizontal, de tal forma que los explantes contenían una o dos aréolas. Los explantes, al igual que en *R. rosea*, fueron orientados verticalmente en el medio de cultivo (Mauseth, 1979).

Los cultivos se incubaron bajo 12 h luz y 12 h oscuridad (fotoperíodo largo) en una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dabekaussen *et al.*, 1991; Clayton *et al.*, 1990; Johnson y Emíno, 1979; Ault y Blackmon, 1987; Vyskot y Jára, 1984). La irradiación lumínica (PAR) fue de $50\text{ }\mu\text{moles m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (Dabekaussen *et al.*, 1991; Ault y Blackmon, 1987; Johnson y Emíno, 1979), con lámparas fluorescentes de luz blanca-fría.

Los brotes obtenidos de cada una de las especies de cactáceas fueron subcultivados cada cuatro semanas en los mismos medios de cultivo pero sin fungicida para permitir la continuación del crecimiento de los mismos (Johnson y Emíno, 1979; Hubstenberger *et al.*, 1992; Clayton *et al.*, 1990; Dabekaussen *et al.*, 1991).

Los parámetros que se estimaron en cada uno de los cultivos de las tres especies con las diferentes combinaciones hormonales fueron los siguientes:

1. Número de brotes axilares por explante (Clayton *et al.*, 1990).
2. Inicio de brotación. A partir de la fecha de siembra hasta la aparición del primer brote axilar (0.2 - 0.3 cm).
3. Longitud de los brotes axilares (cm).
4. Inicio de formación de raíz (sólo en el caso de que se presentase en algún tratamiento, Clayton *et al.*, 1990).
5. Peso fresco (g; Dabekaussen *et al.*, 1991).

Las variables de respuesta se estimaron después de dos meses en cultivo para tener una uniformidad en el tiempo en las tres especies de cactáceas (Mauseth y Halperin, 1975; Clayton *et al.*, 1990; Dabekaussen *et al.*, 1991). Se buscó la presencia de vitrificación de los brotes obtenidos en cada una de las especies y se observó la morfología de los brotes axilares obtenidos (Clayton *et al.*, 1990).

Los brotes axilares obtenidos de las tres especies de cactáceas fueron enraizados cuando alcanzaron de 1 a 2 centímetros de largo y fueron subcultivados en medio de cultivo con solo 0.1 mg/L de ANA para la inducción de raíz (Fay y Gratton, 1992; Clayton *et al.*, 1990).

Por medio de un análisis de varianza de dos vías y por la prueba de comparación de medias (Tukey Rango Estandarizado; con una significancia de 0.01), además de la morfología de las plantas obtenidas en los cultivos *in vitro*, se determinó la combinación hormonal óptima para la producción efectiva de plantas (muy parecidas a la madre). Este tratamiento se ocupó para la siembra y obtención masiva de plantas *in vitro*.

Posteriormente, las plantas de 1 a 3 cm de largo (dependiendo de la especie) se transplantaron en tierra, en macetas de plástico de 5 cm de diámetro y 4 cm de largo, en una mezcla pasteurizada por medio de vapor (Sanderson *et al.*, 1986; Clayton *et al.*, 1990) cuya proporción fue de 1:1:2 de tierra negra, *peat moss* y tezontle triturado con un diámetro de 0.2 a 0.3 cm. A estas plantas se les evaluó el metabolismo CAM. Una planta por maceta fue considerada como una unidad mínima experimental.

5.3 METABOLISMO ÁCIDO DE CRASULÁCEAS.

Una vez obtenidas al menos 60 plantas *in vitro* de cada especie de cactácea con una longitud aproximada de 2 a 2.5 cm (dependiendo de la especie), los frascos de cultivo se cambiaron, al menos dos semanas antes de comenzar los experimentos de la caracterización fisiológica, a un PAR de $80 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Altesor *et al.*, 1992). La temperatura fue de 29°C día / 22°C noche. Se cambió el fotoperíodo a 8 h luz 16 h oscuridad (día corto) debido a que se sabe con certeza que se requieren días cortos para realizar CAM (Kluge *et al.*, 1987),

Las plantas obtenidas *in vitro* (después de la primera evaluación de los parámetros que definen CAM en este trabajo; ver abajo) se transplantaron a tierra en macetas (aclimatación a suelo), se mantuvieron de igual forma a un PAR de $80 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una humedad relativa de aproximadamente 50 % (humedad ambiental) y a la misma temperatura (29°C día / 22°C noche). El riego de las plantas se realizó cada tres días por medio de un aspersor (Altesor *et al.*, 1992; Nobel y Hartsock, 1990).

La frecuencia de estimación de los parámetros que definieron el metabolismo CAM (ver abajo parámetros) fue cada ocho horas durante 16 horas, el cual correspondió al período de oscuridad. La caracterización fisiológica se estimó en las plantas en cultivo *in vitro* (día 0) y en los días 5 y 10 después del traspaso (o aclimatación) a suelo (Dai, *et al.*, 1994; Nobel y Hartsock, 1990).

De igual forma, a las cactáceas en cultivo *in vivo* (plantas madre) se les estimó el metabolismo CAM con fines de comparación (plantas control). Todas las determinaciones fueron bajo luz artificial.

Acidez titulable.

Se maceró un gramo del tejido de la planta con 5 ml de agua destilada. Se tituló con KOH 0.002 N (Altesor *et al.*, 1992) hasta un pH 8.3 (Mandujano, 1988). Los datos fueron expresados como $\mu\text{eq g}^{-1}$ de tejido fresco.

Dióxido de carbono.

Se midió por medio de un analizador de gas infrarrojo (Gas analyzer CI - 301, CID, Inc.) en sistema cerrado. Se sustituyeron la tapas de papelaluminio de los frascos de cultivo por tapones de hule con la tubería suficiente para llevar a cabo la medición del CO₂. La tubería fue de plástico y de longitud lo suficientemente pequeña para que no interfiriera con los cálculos posteriores. La temperatura del aire, el fotoperíodo, el PAR, la concentración de CO₂ (350 μl^{-1} , concentración ambiental de CO₂) y la humedad relativa fueron en las mismas condiciones mencionadas con anterioridad. Las plantas aún en condiciones de cultivo *in vitro*, a las cuales se les realizó la medición del CO₂, se plantaron en tierra debido a que la medición no se realizó en condiciones asépticas o se emplearon para alguna otra estimación. Los datos se reportaron como $\mu\text{moles de CO}_2$ consumidos g^{-1} de tejido fresco m^{-1} .

Concentración de prolina.

La concentración de prolina se determinó, como indicador de estrés hídrico, con el método de Bates (1973) con las siguientes modificaciones: se maceraron 100 mg de tejido fresco con 5 ml de ácido sulfosalicílico al 3 %, las muestras se colocaron en tubos de centrifuga eppendoff y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su cuantificación. Las muestras descongeladas se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos. Se hicieron reaccionar 2 ml del sobrenadante con de ninhidrina ácida y 2 ml de ácido acético glacial concentrado en un tubo de ensayo, por una hora a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reacción se concluyó en un baño de hielo. Posteriormente, la prolina se extrajo de la mezcla de la reacción con 4 ml de tolueno,

agitando vigorosamente con vórtex durante 15 ó 20 segundos. El tolueno fue aspirado de la fase acuosa y la absorbancia fue leída a 520 nm usando tolueno como blanco. La concentración de prolina fue determinada por medio de una curva patrón y calculada sobre una base de peso fresco en la forma siguiente: $\mu\text{moles prolina} / \text{g de tejido fresco} = [(\mu\text{g prolina} / \text{ml} \times \text{ml tolueno}) / 115.5 \mu\text{g}/\mu\text{moles}] / [\text{g muestra} / 2.5]$.

Clorofila.

Fue determinada espectrofotométricamente. Se maceró 0.1 gramos de tejido fresco con 5 ml de acetona al 80 % y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. Se midió la densidad óptica en una longitud de onda de 647 y 664 nm. Se utilizaron las ecuaciones de Arnon (1949) para realizar los cálculos. Los resultados se reportaron como mg de clorofila por gramo de tejido fresco (Guralnick *et al.*, 1986; Arnon, 1949).

Proteínas solubles.

El contenido de proteína se cuantificó con el método de Azul Coomassie brillante de acuerdo con Bradford (1976) usando suero de albúmina de bovino como estándar.

6. RESULTADOS.

6.1 CULTIVO *IN VITRO*.

6.1.1 *Rhipsalidopsis rosea*.

En la Tabla 1 se muestra en resumen los resultados que se obtuvieron del cultivo de esta especie de cactácea.

Hubo diferencias significativas de las combinaciones hormonales sobre el número de brotes axilares obtenidos por explante. En la combinación hormonal 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA se obtuvo el número significativamente mayor de brotes axilares por explante (4.800 ± 0.374 brotes; ver Tabla 1). La combinación hormonal en la cual se obtuvo brotes axilares en un tiempo significativamente menor (25.600 ± 1.631 días). En contraste, hubo cinco tratamientos hormonales en donde no se obtuvieron brotes axilares (ver Tabla 1). El más lento fue en 0 mg/L de KIN con 0.1 mg/L ANA y 0.5 mg/L de KIN con 1 mg/L de ANA con 183.200 ± 31.470 y 299.000 ± 0.000 días, respectivamente; un período significativamente mayor con respecto a la primera combinación hormonal.

En el sistema *in vitro* también hubo generación de tallos dimórficos, característicos de esta especie de cactácea (ver Tabla 1). Se observó un efecto significativo en la longitud de los tallos de forma angulosa (cuatro costillas, forma cilíndrica, aréolas muy continuas) en las diferentes combinaciones hormonales. La longitud significativamente mayor de este tipo de brote fue 2.600 ± 0.195 cm, la cual se presentó en el tratamiento hormonal 5 mg/L de KIN con 0.5 mg/L de ANA y la combinación de fitohormonas en donde la longitud de los brotes axilares fue menor: 0.300 ± 0.032 cm fue 10 mg/L de KIN con 0.5 mg/L de ANA. De forma similar, la longitud de los brotes de morfología aplanada fue significativamente mayor en ese mismo tratamiento hormonal con magnitud de 1.980 ± 0.334 cm. Las longitudes significativamente menores de los brotes con morfología aplanada fueron 0.550 ± 0.250 cm en la combinación hormonal de 10 mg/L de KIN con 1 mg/L de ANA.

Tabla 1. Efecto de los tratamientos hormonales sobre el número de brotes por explante, el inicio de aparición, la longitud, la morfología, el peso fresco y el inicio de raíz de los brotes axilares generados en la especie *Rhipsalidopsis rosea*.

TRATAMIENTO HORMONAL (KIN / ANA)	LONGITUD DE BROTES ^a			MORFOLOGÍA DE BROTES		PESO FRESCO (g)	INICIO DE RAÍZ (DÍAS)
	NÚMERO DE BROTES	INICIO DE BROTACION (DÍAS)	(cm)		No. de brotes aplamados / No. de brotes angulosos / No. total de brotes		
			I	II			
0/0	0	0	0	0	0/0/0	0,000±0,000	128,200±4,769
0/0.1	1,200±0,200	183,200±31,470	0	0,460±0,051	0/5/6	0,015±0,002	283,400±5,231
0/0.5	0	0	0	0	0/0/0	0,000±0,000	91,200±5,064
0/1.0	0	0	0	0	0/0/0	0,000±0,000	73,400±8,841
0.5/0	0,200±0,200	69,000±0,000	0	0,900±0,000	0/1/1	0,004±0,004	95,400±11,075
0.5/0.1	1,600±0,245	74,200±12,504	0	0,500±0,084	2/6/8	0,053±0,015	85,800±14,722
0.5/0.5	0,600±0,245	94,333±6,960	0	0,420±0,067	0/3/3	0,033±0,006	96,800±4,872
0.5/1.0	0,200±0,2000	299,000±0,000	0	0,900±0,000	0/1/1	0,011±0,011	124,800±8,321
1/0	0	0	0	0	0/0/0	0,000±0,000	189,400±14,052
1/0.1	1,400±0,245	48,600±9,574	0	0,560±0,051	0/7/7	0,029±0,006	97,000±8,678
1/0.5	1,000±0,000	72,200±3,323	0	0,440±0,051	0/5/5	0,021±0,004	77,400±3,415
1/1.0	0	0	0	0	0/0/0	0,000±0,000	386,800±28,788
5/0	2,000±0,316	27,000±1,581	0	0,925±0,269	5/5/10	0,039±0,008	91,200±8,935
5/0.1	4,800±0,374	25,600±1,631	1,415±0,113	2,060±0,127	10/14/24	0,066±0,008	105,000±9,039
5/0.5	1,800±0,374	39,800±4,833	1,980±0,334	2,600±0,195	4/11/15	0,065±0,010	198,200±37,582
5/1.0	2,000±0,447	37,080±1,975	0,760±0,108	1,480±0,150	4/7/11	0,067±0,008	35,200±6,111
10/0	1,167±0,477	55,200±7,144	0	0,560±0,087	0/6/6	0,048±0,010	100,600±2,909
10/0.1	2,200±0,583	71,250±5,313	0,500±0,000	0,475±0,189	1/10/11	0,048±0,004	108,000±16,056
10/0.5	1,000±0,000	57,000±7,508	0	0,300±0,032	0/6/6	0,036±0,010	274,600±61,230
10/1.0	2,200±0,374	53,667±4,177	0,550±0,250	1,020±0,213	2/7/9	0,038±0,010	402,600±31,783

I: cladodios aplamados.

II: cladodios angulosos.

Con respecto al número de brotes axilares de morfología angulosa y aplanada obtenidos en total en los cultivos *in vitro* el número de brotes angulosos fue significativamente mayor con respecto con los brotes aplanados en cada una de las combinaciones hormonales ensayadas. Se obtuvieron 21 y 13 brotes, respectivamente, en el tratamiento 5 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA; siendo estos lo números máximos de producción de brotes. En ningún otro tratamiento se suscitó tal cantidad de brotes.

Se observaron diferencias significativas en cuanto al inicio de raíz en las plantas obtenidas *in vitro* con los diferentes tratamientos hormonales. La aparición de raíz, en un tiempo comparativamente más rápido, ocurrió a los 35.200 ± 6.111 días en la combinación hormonal 5 mg/L de KIN y 1 mg/L de ANA; en el tratamiento con 1 mg/L de KIN con 1 mg/L de ANA se presentó la rizogénesis en un tiempo comparativamente mayor: 395.800 ± 28.788 días.

Por último, no se presentaron efectos significativos de los tratamientos sobre el peso fresco registrado en los brotes axilares producidos *in vitro*. No obstante, las combinaciones hormonales en donde se obtuvieron las magnitudes comparativamente más elevadas fueron 5 mg/L de KIN con 0.1, 0.5 y 1 mg/L de ANA con promedios de 0.0668 ± 0.008 g, 0.0652 ± 0.010 g y 0.0672 ± 0.008 g, respectivamente.

En función de que la variable de respuesta más importante en el experimento fue el número de brotes axilares generados por explante, se consideró la combinación hormonal 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA como la más adecuada para la propagación *in vitro* de esta especie de cactácea. En esta combinación hormonal en promedio se formaron 4.800 ± 0.374 brotes axilares por explante, en el período más corto (25.600 ± 1.631 días). Empero, la longitud de los brotes en promedio mayor, no se presentó en esta misma combinación hormonal, como se definió anteriormente. Sólo existe una diferencia de aproximadamente medio centímetro entre el tratamiento en donde se obtuvo la mayor longitud y esta combinación hormonal considerada como la adecuada (ver Tabla 1). Además, con el transcurso del tiempo de cultivo, las plantas obtenidas a partir de medios

de cultivo que contenían 5 mg/L de KIN, casi todas alcanzaron una longitud de brote muy similar y aún más cuando se trasladaron a tierra. Después de algún tiempo de ser cultivadas *in vivo*, todas las plantas generadas *in vitro* en diferentes combinaciones hormonales, presentaron una longitud similar en sus brotes, aunque con diferente morfología .

Una característica relevante considerada fue la apariencia de los brotes que se obtuvieron. En la Tabla 1 resulta evidente que en la combinación 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA ocurrió una producción mayor y semejante en proporción de los dos tipos de tallos que se generaron; no obstante que hubo combinaciones en donde también las proporciones de las dos morfologías del tallo fueron similares, pero en magnitudes menores a la primera (ver Tabla 1).

De la misma forma ocurrió con el peso fresco obtenido en esta combinación hormonal propuesta como la conveniente para la propagación *in vitro* de esta especie de cactácea. Aunque en ésta no se dio el mayor peso fresco, si se obtuvo un promedio elevado. Por otro lado, los promedios obtenidos del peso fresco no presentaron diferencias significativas, lo cual favoreció la elección del mencionado tratamiento.

En relación con el inicio de raíz, en la combinación hormonal propuesta (5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA) el período en el cual ésta se presentó, no se consideró importante debido a que después de que se obtuvieron los brotes axilares y alcanzaron aproximadamente 1.5 cm de longitud enraizaron convenientemente, en un período relativamente rápido (15 días en promedio) cuando se subcultivaron a medio fresco con 0.1 mg/L de ANA como regulador de crecimiento.

Para obtener brotes más desarrollados fue necesario enraizar los brotes junto con su explante, el cual mientras fuera más grande, producía brotes más desarrollados y el sistema radicular de la planta nueva más desarrollado. En caso contrario, el brote axilar generado *in vitro* enraizado sin el explante cesó su desarrollo, la raíz fue muy escasa

(apenas salieron los primordios de raíz) y los brotes secundarios cuando se presentaron (brotes generados a partir del brote obtenido primariamente) presentaron una longitud menor a la mitad de la del primer brote, nunca alcanzaron, a través del tiempo, la longitud del primer cladodio e invariablemente su morfología fue angulosa, sumamente delgados y flácidos.

En relación con lo que específicamente ocurrió en cada una de las combinaciones hormonales (ver Tabla 2), los explantes reaccionaron al tratamiento 0 mg/L de KIN y 0 mg/L de ANA produciendo raíz de 0.6 cm de largo, como máximo. No hubo desarrollo de brotes en las aréolas. La generación de callo sólo se dio en una unidad experimental, en la zona de corte. El callo fue sumamente escaso, muy friable y de color verde claro hialino, observándose oxidación con las resiembras.

En el tratamiento hormonal 0 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA hubo unidades experimentales (2/5; Tabla 2) en las cuales se generaron brotes. Sin embargo, éstos no sobrepasaron 0.5 cm de largo, tenían cuatro costillas muy juntas, dando un aspecto cilíndrico, de "lápiz", además de las aréolas muy contiguas (entrenudos muy cortos) a diferencia de como se encuentran en estado natural este mismo tipo de tallo. No hubo desarrollo de raíz.

Los brotes que se presentaron en este tratamiento hormonal, surgieron de la aréola apical compuesta. Solamente hubo un brote por aréola. Asimismo, hubo dos unidades experimentales que generaron callo escaso de color verde claro hialino en la zona de corte, el cual con las resiembras se oxidó, perdiéndose en consecuencia. No obstante, el explante desarrolló raíz después de los dos meses de observación. Las unidades experimentales restantes sólo generaron raíz que con el tiempo incrementó de tamaño y presentó color verde en la raíz primaria.

En el tratamiento 0 mg/L de KIN con 0.5 mg/L de ANA, cuatro de las cinco unidades experimentales tuvieron formación escasa de callo que se oxidó con las resiembras.

Resultados.

Tabla 2. Resultados obtenidos en los tratamientos ensayados para la obtención de brotes en la especie *Rhipsalidopsis rosea*.

Tratamiento hormonal KIN/ANA	No. de explantes respondiendo/ No. de explantes probados			Promedio \pm E.E.*		
	Callo	Brotos	Raíz	Callo	Brotos	Raíz
0/0	1/5	0/5	5/5	0.200 \pm 0.200	-	1.000 \pm 0.000
0/0.1	2/5	2/5	1/5	0.400 \pm 0.245	0.400 \pm 0.245	0.200 \pm 0.200
0/0.5	4/5	0/5	1/5	0.800 \pm 0.200	-	0.200 \pm 0.200
0/1.0	1/5	0/5	4/5	0.200 \pm 0.200	-	0.800 \pm 0.200
0.5/0	0/5	0/5	5/5	-	-	1.000 \pm 0.000
0.5/0.1	0/5	2/5	5/5	-	0.400 \pm 0.245	1.000 \pm 0.000
0.5/0.5	0/6	3/5	3/5	-	0.500 \pm 0.224	0.500 \pm 0.224
0.5/1.0	3/5	0/5	2/5	0.600 \pm 0.245	-	0.400 \pm 0.245
1/0	0/5	0/5	0/5	-	-	-
1/0.1	1/5	0/5	1/5	0.200 \pm 0.200	-	0.200 \pm 0.200
1/0.5	0/5	0/5	0/5	0.600 \pm 0.245	-	-
1/1.0	2/5	0/5	1/5	0.400 \pm 0.245	-	0.200 \pm 0.200
5/0	0/5	2/5	1/5	-	0.400 \pm 0.245	0.200 \pm 0.200
5/0.1	1/5	4/5	0/5	0.200 \pm 0.200	0.800 \pm 0.200	-
5/0.5	0/5	3/5	1/5	-	0.600 \pm 0.245	0.200 \pm 0.200
5/1.0	0/5	3/5	1/5	0.400 \pm 0.200	0.600 \pm 0.245	0.200 \pm 0.200
10/0	0/5	1/5	0/5	-	0.200 \pm 0.200	-
10/0.1	1/5	5/5	0/5	0.200 \pm 0.200	0.833 \pm 0.167	-
10/0.5	0/5	2/5	0/5	-	0.400 \pm 0.245	-
10/1.0	0/5	1/5	0/5	-	0.200 \pm 0.200	-

*Error estándar.

Posteriormente, ocurrió la rizogénesis. En los cultivos restantes sólo se presentó la rizogénesis. No hubo formación de brotes axilares.

En el tratamiento 0 mg/L de KIN con 1.0 mg/L de ANA sólo se presentó la rizogénesis en los cultivos y ligera proliferación celular en la zona de corte de una unidad experimental.

En el tratamiento 0.5 mg/L de KIN con 0 mg/L de ANA las cinco unidades experimentales generaron raíz prominente, sin organogénesis ni proliferación celular (callo). De igual forma, los cultivos con el tratamiento 0.5 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA reaccionaron con una rizogénesis prominente sin producción de brotes. Este estado perduró hasta que el explante se cambió a medio de cultivo fresco sin KIN y solamente con 0.1 mg/L de ANA. En este medio únicamente fue posible la generación de brotes en donde sólo hubo un brote por aréola. Los brotes no sobrepasaron los 0.6 cm de longitud, presentaron un aspecto de "lápiz". Después de un promedio de 130 días, se generaron los brotes secundarios que no excedían de uno por brote generado (primer brote), con morfología y longitud similar al primero (longitud menor a 0.6 cm, 4 costillas, forma cilíndrica-angulosa). Sin embargo, la producción de brotes secundarios fue escasa en relación con los que se produjeron en la combinación de hormonas 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA (ver abajo). No hubo formación de callo.

En el tratamiento 0.5 mg/L de KIN con 0.5 mg/l de ANA tres de los cultivos generaron raíz muy prominente (5.3 cm), sin brote; no generaron callo. Se presentó formación de brotes en la aréola apical. En el período en el que se estimó (dos meses), el número de brotes fue de dos, en dos de las cinco unidades experimentales (2/5, ver Tabla 2). Los brotes tenían cuatro costillas (forma de "lápiz"). El explante generó, asimismo, raíz de dimensiones menores a aquellos que no presentaron brotes.

En el tratamiento hormonal 0.5 mg/L de KIN con 1.0 mg/L de ANA dos unidades experimentales generaron raíz y tres generaron callo verde hialino, escaso y friable. El

crecimiento del callo tenía la apariencia de pequeñas gotas con un ligero color verde claro. No hubo producción de brotes axilares.

En los tratamientos con 1 mg/L de KIN y todas sus combinaciones de ANA se presentó una marcada proliferación de callos (Tabla 2) de tamaño evidentemente mayor en comparación con los que se llegaron a producir en los tratamientos hormonales anteriores, además de presentarse brotes axilares con morfología angulosa (ver Tabla 1).

Los callos presentaron un color verde más intenso al centro y verde claro a transparente en la superficie del mismo. Fueron callos duros, muy consistentes en el centro y menos en la superficie. Sin embargo, no se logró mantener y mucho menos diferenciar alguno. Tal eventualidad se debió a que los callos resultaron sumamente susceptibles a la oxidación. Las resiembras se realizaron con todo el explante (pues no se querían perder o maltratar) en medio de cultivo fresco con el mismo tratamiento hormonal; con una concentración hormonal menor (0 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA); en medio de cultivo líquido, sin explante, con un puente de papel filtro, en concentraciones de fitohormonas iguales o menores (0 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA). En cada caso ocurrió la muerte del callo por oxidación y en donde aún persistía el explante, el callo oxidado se disgregó completamente para dar lugar, posteriormente, a la rizogénesis en el explante. Es importante resaltar que los callos generados se produjeron con rapidez (en promedio 20 días) y mayor abundancia (2.5 cm de diámetro) en comparación con la de los otros tratamientos en donde también se generaron.

Posteriormente, se optó por cortar los callos de los explantes. Éstos se sembraron solos en medio de cultivo fresco, sólido y con la concentración original de hormona. Después de tener una semana en el medio de cultivo fresco se oxidaron completamente. Por lo tanto, es necesario diseñar otros métodos para mantenerlos. Posiblemente se preserven si al medio de cultivo se le agrega un agente antioxidante (por ejemplo ácido ascórbico o carbón activado).

Por otro lado, hubo explantes (1 mg/L de Kin con 0 mg/L de ANA) en los que el callo fue escaso y, que al ser resembrados, se oxidaron y dieron lugar a la rizogénesis en aquél. En otros explantes no hubo respuesta y se resembraron en el tratamiento 5 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA para la inducción de organogénesis. Seis de los ocho sistemas de cultivo transferidos de concentraciones hormonales menores (0 y 1 mg/L de KIN junto con variantes de ANA) hacia altas, generaron de 1 a 3 brotes (en promedio 1.375 brotes \pm 0.420 E.E.).

El tejido del explante fue sensible a un amplio intervalo de concentraciones en cada uno de los tratamientos con 5 mg/L de KIN y todas las concentraciones de ANA. Algunos de los brotes generados en el tratamiento 5 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA alcanzaron una longitud de hasta 2.9 cm (ver promedio en la Tabla 1), los brotes se desarrollaron con mayor rapidez y la longitud que alcanzaron fue la máxima en relación con los otros brotes obtenidos en el resto de los tratamientos (Tabla 1).

Es difícil evidenciar el inicio de formación de brotes en esta especie debido a que se encuentran espinas largas, gruesas y espesas en las aréolas; sin embargo, se logró observar. El inicio de formación de brotes se presentó en forma típica como se presenta en condiciones *in vivo*. De entre las espinas se denota un color rojo carmesí, característico de los brotes emergentes. Conforme se produce el crecimiento, el color persiste en gran parte del ápice del brote y en las partes laterales del mismo; en brotes con 0.5 cm de longitud el color se empieza a desvanecer. El desarrollo se produjo rápidamente en la combinación hormonal 5 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA: entre 20 ó 25 días alcanzaron el centímetro de longitud a diferencia de las demás combinaciones hormonales, las cuales apenas alcanzaron el centímetro de longitud en el mismo período. De modo general, los brotes obtenidos por aréola fueron de 1 hasta 4. En la mayoría de los casos se generaron uno a la vez (un brote de 0.5 cm, una vez obtenida tal longitud, se empieza a diferenciar el o los demás brotes). Sin embargo, se presentó una producción masiva de brotes: en un explante se generaron hasta 16 brotes aplanados en la aréola

compuesta, presentando todos una misma longitud desde su formación inicial y la mayoría presentó una morfología aplanada.

La mayoría de los brotes se generaron en la aréola compuesta (como ocurre en condiciones *in vivo*) y, de modo poco frecuente, en las aréolas subapicales. De estas aréolas subapicales se obtuvieron hasta tres brotes por cada una; esto ocurrió del mismo modo en todas las combinaciones hormonales en donde se generaron brotes.

Los brotes con morfología angulosa son los únicos que se presentan en las combinaciones hormonales menores y mayores a 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA (Tabla 1). En cambio, en esta combinación de hormonas se obtuvieron brotes en números similares (ver Tabla 1). En condiciones de cultivo *in vivo* las proporciones cambian. Por rama, el número promedio de brotes aplanados fue de 10.222 ± 1.730 ; el número promedio de brotes angulosos fue de 6.556 ± 1.501 (datos obtenidos de nueve ramas).

Es importante resaltar que los brotes axilares primarios obtenidos *in vitro* con morfología angulosa invariablemente produjeron brotes secundarios angulosos y de dimensiones menores (la mitad de la longitud del brote primario). Estos brotes secundarios no crecieron más, es decir, nunca alcanzaron las dimensiones de los primeros. En algunos casos, los brotes secundarios generaron brotes terciarios, de dimensiones ligeramente menores a los secundarios, siempre de morfología angulosa y, de igual forma, nunca alcanzaron el tamaño de aquellos que le dieron origen. Generalmente, del brote primario obtenido *in vitro*, se generaron de 2 a 3 brotes secundarios.

Los brotes axilares primarios obtenidos *in vitro* con morfología aplanada generaron brotes secundarios de los dos tipos de morfología. Sin embargo, éstos últimos fueron de morfología angulosa tanto en los angulosos como en los aplanados y fueron también de dimensiones menores a los primarios. Con el transcurso del tiempo, la longitud de todos los brotes generados fue relativamente igual. Esto sólo ocurrió en la combinación hormonal 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA, porque en 10 mg/L de KIN y sus

concentraciones de ANA los brotes secundarios y terciarios permanecieron con su longitud original, es decir, se observaron brotes axilares de longitud menor a los que le dieron origen.

El crecimiento ramificado característico en la planta *in vivo* también se observó en los cultivos *in vitro*. La generación de brotes secundarios es relativamente rápida en la combinación hormonal 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA. Una vez que los brotes primarios alcanzaron la longitud promedio de 1.664 ± 0.091 cm (en el mismo tratamiento), los secundarios se generaron después de 17.333 ± 9.333 días. El tiempo de producción de los brotes secundarios se prolongó aún más en relación con la concentración de la combinación hormonal. En tratamientos con 0, 0.5 y 1 mg/L de KIN (con sus respectivas combinaciones de ANA) el tiempo de obtención de brotes secundarios se extendió hasta un promedio de 83.012 ± 1.698 días o definitivamente no hubo tal generación. Estos brotes secundarios, en todos los casos en donde se obtuvieron, fueron de dimensiones menores a los brotes primarios y en mayor proporción (3:1), fueron de morfología angulosa y su longitud no rebasó los 0.6 cm.

Los brotes de morfología angulosa obtenidos *in vitro* resultaron ser más resistentes en comparación con los brotes aplanados. En las primeras resiembras realizadas, los cladodios aplanados no se lograron mantener en los cultivos *in vitro*, es decir, al ser resemebrados se oxidaron. Asimismo, al momento del traspaso a tierra, las plantas con cladodios aplanados se deshidrataban evidentemente; en cambio, las plantas con cladodios angulosos permanecieron turgentes.

En ningún tratamiento hormonal se presentaron brotes vitrificados.

Como lo muestra la Tabla 1, en todas las combinaciones hormonales con 10 mg/L de KIN y las diferentes concentraciones de ANA se suscitó la producción de brotes. La apariencia de los brotes obtenidos invariablemente fue angulosa. La generación de brotes secundarios fue más rápida y mayor en número en comparación con el resto de las

combinaciones hormonales ensayadas. La morfología de estos brotes secundarios fue, en su totalidad, angulosa. La longitud que alcanzaron los brotes secundarios fue casi similar a los brotes primarios (menos de 1 cm). Sin embargo, los brotes terciarios presentaron una longitud de al menos la mitad de los brotes secundarios.

En estas combinaciones hormonales se logró un crecimiento muy ramificado, es decir, se obtuvo un pequeño matorral *in vitro*. Este aspecto se pudo apreciar después de 11 meses de cultivo. En ningún otro tratamiento (ni siquiera en 5 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA) se observó este aspecto.

Consecuentemente y en relación con los resultados obtenidos del cultivo *in vitro*, se procedió a propagar masivamente a la planta en la combinación hormonal 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA. Se procuró que el explante fuera lo más grande posible.

Una vez que los brotes alcanzaron su altura máxima en cultivo *in vitro* (1.5 cm) se resemebraron (junto con el explante) a medio para enraizar. Una vez obtenida la raíz, se transfirió a las plantas en medio de cultivo libre de hormonas, por un mes, para eliminar el efecto de las hormonas (Clayton *et al.*, 1990) y continuar con la siguiente fase de evaluación del metabolismo CAM con plantas estandarizadas en un medio de cultivo de composición común.

6.1.2 *Chamaecereus silvestrii*.

Como lo muestra la Tabla 3 esta especie de cactácea fue sensible a un amplio intervalo de concentraciones de KIN, pues se obtuvieron brotes en todos los tratamientos hormonales propuestos. No obstante el número, el inicio de formación de brotes (organogénesis) y la apariencia de los mismos, fueron significativamente diferentes entre los tratamientos (de acuerdo con el análisis estadístico en las dos primeras variables de respuesta).

Tabla 3. Efecto de las combinaciones hormonales sobre el número de brotes por explante, inicio de formación, longitud, inicio de formación de raíz y peso fresco de los brotes axilares obtenidos de *Chamaecereus silvestrii*.

TRATAMIENTO HORMONAL (KIN / ANA)	NÚMERO DE BROTOS	INICIO DE FORMACION DE BROTOS (DIAS)	LONGITUD DE BROTOS (DIAS)	INICIO DE RAIZ (DIAS)	PESO FRESCO (g)
0/0	1,000±0,000	22,400±2,182	0,840±0,209	231,200±83,621	0,024±0,007
0/0,1	1,800±0,583	47,800±4,705	0,960±0,357	404,800±63,399	0,051±0,005
0/0,5	2,000±0,316	44,800±4,737	1,220±0,215	364,200±28,920	0,170±0,035
0/1,0	2,800±1,114	49,400±8,704	1,180±0,198	250,600±33,245	0,170±0,021
0,5/0	2,500±0,764	32,200±4,727	1,080±0,289	163,600±15,487	0,017±0,001
0,5/0,1	2,286±0,680	34,400±8,693	0,800±0,100	217,600±46,423	0,054±0,005
0,5/0,5	1,571±0,297	35,200±5,643	1,300±0,335	298,400±52,851	0,215±0,029
0,5/1,0	1,429±0,297	36,400±4,118	1,040±0,124	191,600±28,715	0,259±0,019
1/0	1,600±0,600	20,400±2,874	0,760±0,166	262,750±47,058	0,065±0,006
1/0,1	2,600±1,030	23,400±7,659	1,560±0,396	310,400±18,592	0,196±0,038
1/0,5	2,600±0,812	23,600±5,202	1,280±0,215	282,200±21,544	0,278±0,028
1/1,0	3,400±1,364	22,400±2,249	1,060±0,136	229,167±24,592	0,287±0,025
5/0	2,625±0,420	28,400±1,030	2,040±0,340	294,600±27,261	0,126±0,015
5/0,1	5,600±1,364	28,800±1,562	1,280±0,198	277,000±50,887	0,244±0,034
5/0,5	4,800±0,800	29,600±3,855	1,020±0,265	153,800±8,405	0,270±0,035
5/1,0	3,800±0,490	27,200±4,598	1,380±0,372	247,200±36,437	0,193±0,032
10/0	5,800±0,800	20,200±2,653	0,620±0,097	235,600±34,513	0,125±0,015
10/0,1	14,800±0,860	11,800±0,860	1,460±0,144	197,200±33,214	0,497±0,032
10/0,5	9,406±1,806	28,600±8,453	1,360±0,366	211,000±32,410	0,402±0,056
10/1,0	9,400±0,748	13,800±1,319	1,760±0,246	189,000±35,484	0,293±0,065

Con respecto al número de brotes axilares generados por explante, la combinación hormonal en la que se obtuvo un número significativamente mayor fue 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA con una media y error estándar de 14.800 ± 0.860 . En el control (tratamiento sin reguladores de crecimiento vegetal) fue en donde se obtuvo el número significativamente menor de brotes axilares generados por explante (1.000 ± 0.000).

De modo semejante, en la combinación hormonal 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA se generaron los brotes axilares en un tiempo menor (11.200 ± 0.860 días). De forma contraria, en la combinación hormonal 0 mg/L de KIN y 1 mg/L de ANA los brotes se obtuvieron en un período mayor: 49.400 ± 8.704 días. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, pues se observa -en la misma Tabla 3- que el inicio de formación de brotes axilares fue, en general, semejante en los veinte tratamientos hormonales.

No hubo diferencias significativas en relación con la longitud de los brotes axilares obtenidos en los tratamientos hormonales, posiblemente, debido al tiempo que transcurrió en la toma de los datos de los resultados (dos meses).

En el inicio de raíz no hubo diferencias significativas en los cultivos. No obstante, se advirtió que en la combinación de hormonas 5 mg/L de KIN y 0.5 mg/L de ANA apareció primero la raíz (153.800 ± 8.405 días) y en el tratamiento 0 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA apareció en último término (404.800 ± 63.399 días).

El peso fresco de los brotes axilares fue significativamente diferente en todos los tratamientos ensayados. El tratamiento en el cual se obtuvo un peso fresco significativamente mayor fue 10 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA (0.497 ± 0.056 g), siguiendo en magnitud el tratamiento 10 mg/L de KIN con 0.5 mg/L de ANA (0.402 ± 0.056 g). El tratamiento en donde se obtuvo un peso fresco significativamente menor (0.017 ± 0.001 g) fue 0.5 mg/L de KIN con 0 mg/L de ANA.

En el tratamiento hormonal 10 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA se obtuvo el mayor número de brotes, en el tiempo más corto (ver Tabla 3), cuya morfología fue similar a la planta madre y en el que el peso fresco fue comparativamente mayor al resto de los tratamientos. Por consiguiente, esta combinación hormonal fue elegida como la apropiada para la propagación masiva *in vitro* de *C. silvestrii*.

De modo particular, en las concentraciones hormonales de 0 mg/L de KIN los brotes generados fueron largos o cortos pero siempre delgados. En los primeros (0 y 0.1 mg/L de ANA), las aréolas se observaron definidas (con morfología típica en relación con la planta madre); en los segundos (0.5 y 1.0 mg/L de ANA) los brotes se observaron vitrificados. La vitrificación en las plantas está caracterizada por una desorganización de sus tejidos normales, ausencia de cera epicuticulares y como característica principal la presencia de células hipertrofiadas (Leshem *et al.*, 1988). La apariencia de las plantas vitrificadas es vitrosa, sus tallos y hojas son gruesos y rígidos, presentan característicamente un contenido inferior de proteínas y clorofila y por último, presentan un contenido de agua mayor (Böttcher *et al.*, 1988). En nuestro caso, la vitrificación en los brotes de esta especie se manifestó además con aréolas apenas indicadas por una o dos espinas, tallo con epidermis delgada, como si no presentasen cutícula y de color verde claro, (los cactus referidos como anormales; Dabekaussen *et al.*, 1991).

En los tratamientos hormonales con 0.5 y 1.0 mg /L de KIN, en todas sus series de concentraciones de ANA, se obtuvieron brotes alargados y generalmente de mayor longitud con respecto a los obtenidos en la combinación hormonal elegida 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA (ver Tabla 3). Aunque los brotes presentaron el color verde característico de la planta madre, no mostraron la estructura aréolar típica, es decir, las aréolas tuvieron un número reducido de espinas (2 a 5); asimismo, el ápice de algunos brotes generado fue cóncavo (no se evidenció el meristemo apical). A pesar del tiempo transcurrido en los cultivos *in vitro* no se observó crecimiento en estos brotes.

En los tratamientos hormonales con 5 mg/L de KIN y sus combinaciones de ANA los brotes generados fueron de longitud menor a los generados en 0.5 y 1.0 mg/L de KIN (con sus respectivas concentraciones de ANA) y con un grosor mayor, pero menor en comparación con el grosor de los brotes que se obtuvieron en la combinación hormonal 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA. Las aréolas mostraron una morfología característica.

En las combinaciones con 10 mg/L de KIN y sus respectivas concentraciones de ANA, los brotes presentaron características morfológicas sumamente similares a la planta cultivada *in vivo*. En estas combinaciones hormonales no se presentaron brotes anormales, en cambio, se observó un desarrollo superior de los brotes y raíces en comparación con los brotes obtenidos en el resto de las combinaciones hormonales. En la combinación hormonal 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA se llegó a obtener en un explante hasta 42 brotes axilares normales, con aréolas bien definidas y con morfología idéntica a la planta madre.

La formación de brotes en los cultivos *in vitro* se presentó de manera semejante a como se presenta en la planta cultivada en condiciones *in vivo*. La formación de brotes empezó con una proliferación celular a manera de callo de color verde claro en cada una de las aréolas (en la planta *in vivo* se observa un aspecto lanudo de color blanco con matices amarillos en la aréola). Posteriormente, el brote se diferencia ya que se observaron las primeras espinas; no se presentó en el brote incipiente el color rojo carmesí como ocurrió en *R. rosea*. Sólo se produjo un brote por cada aréola. A diferencia de las plantas cultivadas *in vivo* bajo condiciones de luz solar, los brotes obtenidos *in vitro* se desarrollaron de manera elongada en los tratamientos hormonales con 0, 0.5 y 1.0 mg/L de KIN. En los tratamientos con 5 y 10 mg/L de KIN los brotes se produjeron en forma de esferas, tal como ocurre en condiciones *in vivo*; sin embargo, el tamaño de los brotes generados *in vitro* fue menor y la morfología de éstos tendió a ser ovoide en la mayoría de los casos, conforme se desarrollaban.

En los doce primeros tratamientos hormonales de la Tabla 3, los brotes formados *in vitro* presentaron la base ensanchada y las aréolas del área poco diferenciadas, el resto del brote fue alargado y con aréolas bien desarrolladas y diferenciadas hasta el ápice.

La formación de callo sólo se presentó en aquellos explantes cuyas aréolas quedaron incrustadas en el medio de cultivo. Cuando se obtuvo callo, éste fue de color verde de intensidad mayor al centro y verde claro hialino a blanco transparente en su superficie. Al realizarse los subcultivos sólo se oxidó la parte de los callos que estuvo en contacto con el medio de cultivo, el resto prosperó. El crecimiento de los callos obtenidos fue mayor cuando la intensidad lumínica en el cultivo disminuyó y el medio de cultivo no presentó reguladores de crecimiento. En esta condición lumínica el color verde fue uniforme en todo el callo. Debido a que la obtención de callo en los tratamientos hormonales fue fortuita y que se obtuvo una buena respuesta en la producción de brotes, no se realizó la diferenciación de los callos obtenidos. Sin embargo, se empezó a generar la diferenciación de brotes en callos que no se subcultivaron por un tiempo largo (cuatro a seis semanas). Los brotes diferenciados a partir de callos se observaron como pequeñas estructuras con apariencia de embriones de forma cilíndrica, posteriormente, se inició la diferenciación de las aréolas y pronto adquirieron la morfología de brotes axilares de 0.5 cm de largo; una vez desarrollados fueron semejantes en morfología a los obtenidos en la combinación hormonal 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA, con la característica de que su crecimiento fue mayor con respecto a los obtenidos en mencionada combinación. Por otro lado, su color fue ligeramente claro en comparación con el resto de los brotes obtenidos en todos los tratamientos. La raíz se generó de forma similar a la de la concentración 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA. Si los callos con estructuras como embriones se subcultivaban a medio fresco, la diferenciación de los brotes no llegaba a su término. Los callos solamente se diferenciaron en brotes; no se presentó la diferenciación en raíz.

Los brotes vitrificados en esta especie de cactácea sólo se presentaron, como en el caso de *R. rosea*, cuando los brotes y aréolas entraron en contacto con el medio de cultivo, por lo que se consideró que no fue relevante la vitrificación en esta especie de cactácea.

Para obtener una buena y rápida respuesta en relación con la formación de brotes se observó, al igual que en las otras dos especies, que el tamaño del explante debe de ser de 1.5 cm por lo menos, ya que en tratamientos hormonales en donde se obtuvieron brotes vigorosos, con explantes de menor magnitud no se obtuvo tal respuesta en el mismo tratamiento hormonal. En los explantes de 1.5 cm todas las aréolas reaccionan al tratamiento hormonal 10 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA iniciando la formación de brotes simultáneamente. En explantes de menor dimensión no se obtuvo la activación de todas las aréolas, sino de al menos la mitad de ellas; los brotes generados de explantes de dimensiones menores no se diferenciaron, ni se desarrollaron y se oxidaron con el paso del tiempo.

Por otro lado, no resultaron ser adecuados los explantes que formaron parte de la zona apical de las plantas *in vivo* ya que la formación de brotes se interfirió y, en algunas ocasiones, se bloqueó completamente. Explantes con esta característica continuaron su crecimiento apical, formaron una extensión de la parte apical del mismo explante; los brotes que se formaron debajo del ápice de éste, presentaron una tendencia a la vitrificación, no se desarrollaron y se oxidaron con el paso del tiempo (no alcanzaron 0.7 cm de longitud).

Una vez más se puso de manifiesto el hecho de que las condiciones ambientales y estacionales de la planta *in vivo*, en esta especie en particular, fueron decisivas para la obtención de una buena respuesta en los cultivos *in vitro*. Se observó que los explantes cultivados en los primeros seis meses del año (en la combinación hormonal 10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA), presentaron una buena respuesta en la formación de brotes, siendo en el mes de febrero cuando se obtuvo una rápida respuesta al tratamiento hormonal; en cambio, en los meses de la segunda mitad del año, particularmente en el mes de septiembre, el inicio de formación de brotes se retrasó alrededor de 150 días (147.600 ± 12.176) en el mismo tratamiento hormonal (10 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA).

A diferencia de *R. rosea*, fue posible el enraizamiento de los brotes separados del explante obtenidos *in vitro* de *C. silvestrii*, sin el inconveniente de que el crecimiento de éstos cesara, el sistema radicular generado fuese escaso o que los brotes secundarios no se desarrollaran como los primarios que les dieron origen.

Considerando la información obtenida en respuesta a los tratamientos hormonales ensayados, se procedió al cultivo masivo de esta especie de cactácea en la combinación hormonal elegida (10 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA). Se realizó el cultivo *in vitro* a partir de los brotes previamente obtenidos para la multiplicación de los mismos. No obstante que se obtuvieron brotes en los lapsos observados con anterioridad (ver Tabla 3), el tiempo de desarrollo de los brotes se prolongó demasiado ya que no presentaron raíz, razón por la cual todos los brotes se obtuvieron a partir de la planta *in vivo*. Una vez que los brotes alcanzaron 1.5 cm de largo se enraizaron en medio de cultivo sin KIN, sólo con 0.1 mg/L de ANA; las plántulas fueron transferidas a medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, por un mes, para obtener plantas libres de influencia de alguna fitohormona y dar comienzo a la estimación del metabolismo CAM.

6.1.3 *Epiphyllum crenatum*.

En la tabla 4 se muestra la respuesta de *E. crenatum* al cultivo *in vitro* con la combinación hormonal única 1 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA.

Esta especie de cactácea reaccionó favorablemente a la combinación hormonal propuesta por Lazarte y colaboradores en 1982 para *E. chrysocardium* mencionada anteriormente. El inicio de formación de brotes axilares empezó con una proliferación celular en la aréola a manera de callo de color verde-claro opaco; posteriormente, el brote adquirió forma. No se observó el pigmento de color carmesí en el brote incipiente como en *R. rosea*. El brote fue de un color verde de mayor intensidad con respecto al callo inicial.

Tabla 4. Efecto de la combinación hormonal sobre el número de brotes por explante, inicio de formación de brotes, longitud, inicio de raíz y peso fresco de los brotes generados a partir de *Epiphyllum crenatum*. Promedio de 10 repeticiones.

TRATAMIENTO HORMONAL (KIN / ANA)	NUMERO DE BROTOS	INICIO DE FORMACION DE BROTOS (DIAS)	LONGITUD DE BROTOS (cm)	INICIO DE RAIZ (DIAS)	PESO FRESCO (g)
1 / 0,1	2,000±0,228	23,815±2,835	2,859±0,308	94,667±31,629	0,142±0,034

Generalmente, los brotes axilares formados *in vitro* presentaron tres costillas, razón por la cual les confería un aspecto cilíndrico, estrecho y compacto (forma característica de las plantas jóvenes cultivadas *in vivo*). Sin embargo, al aumentar la longitud del explante se lograron obtener, desde el principio de la síntesis, brotes completamente planos, similares a la forma de las plantas maduras *in vivo*, pero de menor longitud que los primeros y con el transcurso del tiempo, en el cultivo *in vitro*, su longitud aumentó.

La vitrificación de los brotes no tuvo lugar en esta especie de cactácea; así como tampoco hubo formación de callo. La formación de raíz se presentó muy tempranamente en el explante y en las aréolas del mismo. Mauseth (1979) obtuvo raíces adventicias de forma espontánea cuando cultivó *in vitro* híbridos de *Epiphyllum*. Una vez obtenido un brote de esta especie, las aréolas del brote empezaron a generar raíz. El dato que se encuentra en la tabla No. 4 se refiere al período que tardó el brote axilar obtenido, bajo condiciones *in vitro*, para la generación de raíz (no se consideró el inicio de raíz del explante ni el de las aréolas del mismo).

De modo semejante a *R. rosea*, en *E. crenatum* los brotes generados *in vitro* debieron presentar el explante para que prosperase la nueva planta. Asimismo, el número de brotes en esta especie de cactácea aumentó con el tiempo. Las plantas obtenidas, se subcultivaron en medio sin reguladores de crecimiento durante un mes, para contrarrestar el efecto de los mismos. A estas plantas se les estimó los parámetros del metabolismo CAM.

Resultó evidente que *Chamaecereus silvestrii* fue la especie con la cual se obtuvo un número significativamente superior de brotes axilares (14.800 ± 0.860 brotes axilares por explante; ver tabla 3), *Rhipsalidopsis rosea* en segundo término con 4.800 ± 0.374 brotes axilares por explante (Tabla 1) y por último, *Epiphyllum crenatum* con 2.000 ± 0.228 brotes axilares por explante (Tabla 4). Además, también fue *Chamaecereus silvestrii* la especie en donde la generación de brotes axilares se presentó con mayor rapidez (11.800 ± 0.860 días) y la especie en la que el peso fresco fue superior con respecto a las dos epífitas

(0.497 ± 0.056 g). Sin embargo, en *R. rosea* se logró estimular al máximo la producción de brotes axilares, pues en condiciones normales la planta genera dos y hasta tres brotes por cladodio; en condiciones de cultivo *in vitro*, la planta generó en promedio cinco brotes por cladodio y en un explante se obtuvieron hasta dieciséis brotes sólo en la aréola compuesta. En *E. crenatum* la producción de brotes axilares fue similar a la planta *in vivo* (un brote por aréola) pero el tiempo de generación de brotes se redujo, tanto en la síntesis *de novo* como en la obtención de un segundo brote en la misma aréola.

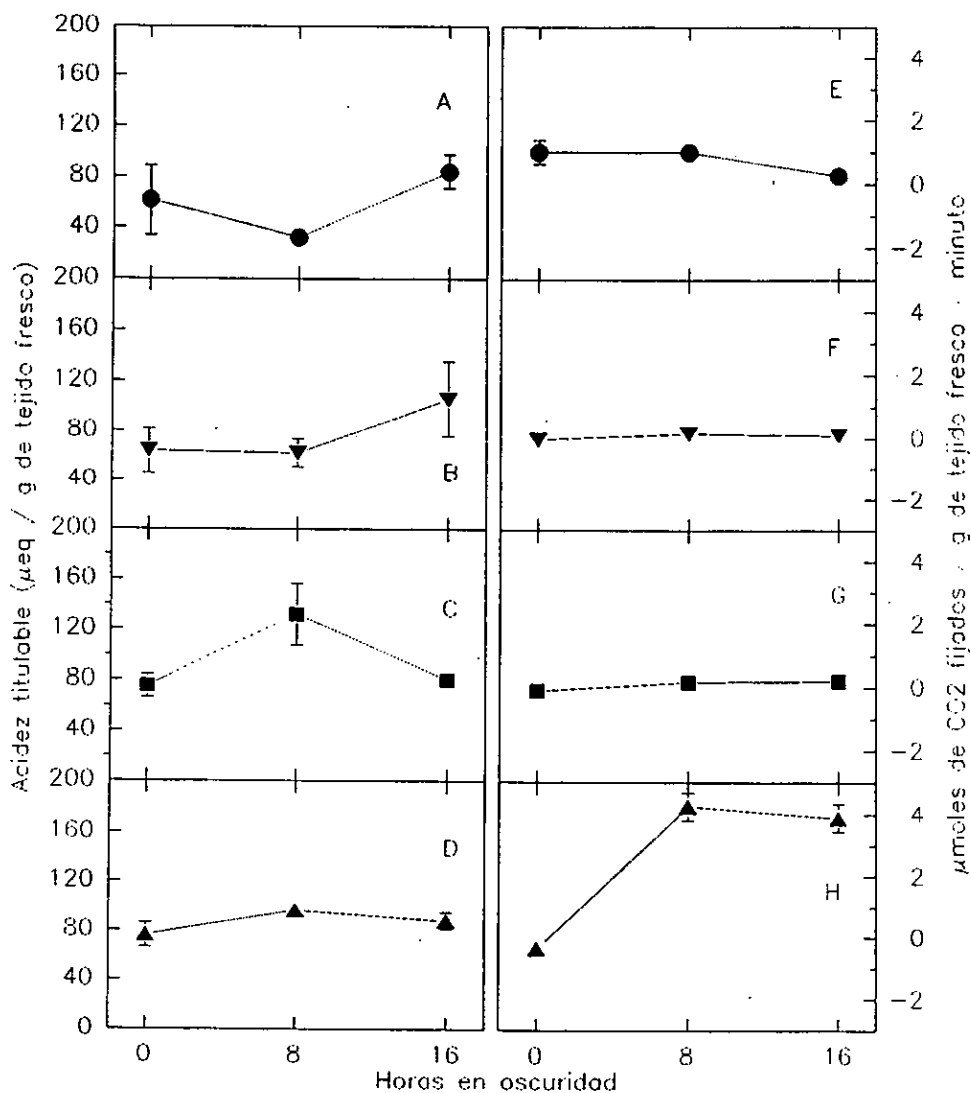
En las tres especies de cactáceas se obtuvo un 100 % de supervivencia de las plantas generadas *in vitro* y trasplantadas a suelo.

6.2 METABOLISMO ÁCIDO DE CRASULACEAS (CAM).

El comportamiento fisiológico de las tres especies de cactáceas evaluadas, en términos del contenido de acidez titulable y la fijación de CO_2 , sugiere un metabolismo CAM en las plantas bajo condiciones de cultivo *in vitro* (día 0) y en las plantas, de origen *in vitro*, colocadas después de 5 y 10 días en suelo (día 5 y 10, respectivamente) (Figuras 3, 4 y 5).

6.2.1. Acidez titulable e intercambio de CO_2 .

En *Rhipsalidopsis rosea* el comportamiento de la acidez titulable en los días 0 y 5 fue similar y, por tanto, difiere del comportamiento de la acumulación de la acidez titulable del día 10. Este último comportamiento fue parecido al patrón de acumulación de acidez en la planta control (Figura 3). En la especie se observó un aumento en la cantidad de acidez titulable y en la fijación de CO_2 , acumulados a través del día 0 hasta el día 10, por lo que sugiere un restablecimiento o potenciación de CAM (Figura 3). La acidez total obtenida durante el período completo de oscuridad de las plantas del día 0 correspondió al 68.186 % de la acidez observada en la planta control (planta *in vivo*). En el día 5 la proporción



Figuras 3. Estimación de la acidez titulable (izquierda) y el intercambio de CO₂ (derecha) a lo largo de los días de cultivo y en el transcurso del período de oscuridad en *Rhipsalidopsis rosea*, A y E: día 0; B y F: día 5; C y G: día 10; D y H: plantas control. Los valores son la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes.

aumentó hasta un 88.870 % y en el día 10 la proporción aumentó, sorprendentemente, 1.102 veces (110.2 %) con respecto a la acidez total observada en la planta control.

En tanto, a las 16 horas de permanecer las plantas en oscuridad, se presentó la mayor acumulación de acidez en el día 0 y 5 (83.866 ± 13.171 y 105.523 ± 24.797 $\mu\text{eq/g}$ de tejido fresco, respectivamente). En las plantas del día 10 y las plantas control, la máxima acumulación de acidez ocurrió a las 8 horas de oscuridad (131.717 ± 24.537 y 96.457 ± 5.828 $\mu\text{eq/g}$ de tejido fresco, respectivamente). A las 16 horas se presentó una disminución en la acumulación de acidez en estas mismas plantas (Figura No. 3, A-D). En otras palabras esta especie de cactácea tiene su máxima acumulación de acidez a la mitad del período de oscuridad, bajo las condiciones ambientales manejadas. No obstante, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas a lo largo de las horas en oscuridad, en el transcurso de los días ni de éstos con respecto a la planta control en esta especie de cactácea.

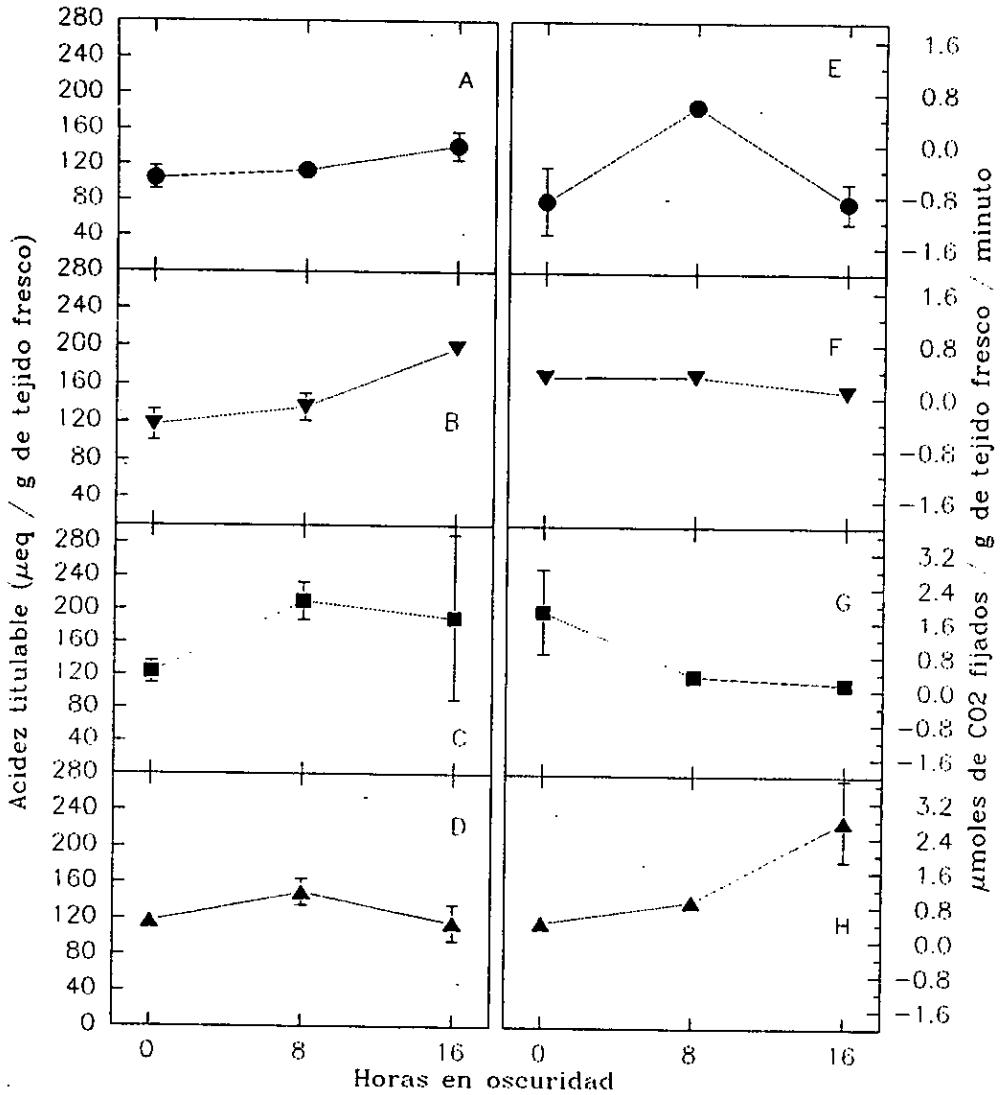
En relación con el CO_2 asimilado por *R. rosea* (Figura 3, E-H), se obtuvo una fijación significativamente mayor en la planta control. En el día 0 se observó una fijación de CO_2 por la especie que correspondió al 40.828 % de la proporción del CO_2 fijado por las plantas control. A diferencia de lo que se observó en la acumulación paulatina de acidez en las plantas del día 5, el cambio de las condiciones de cultivo *in vitro* a *in vivo* (aclimatación a suelo) afectó la fijación de CO_2 en las plantas y se obtuvo una clara disminución de la toma de CO_2 . La proporción de la fijación de CO_2 bajó hasta un 2.944 % del CO_2 total fijado por las plantas control en la noche. En el día 10 se presentó un aumento del 6.029 % en la proporción de fijación de CO_2 con respecto al CO_2 total fijado por la planta control, por lo que, de acuerdo con estos resultados, se esperaría un restablecimiento en la toma de CO_2 por la planta durante la noche a lo largo del tiempo.

El patrón de fijación de CO_2 con respecto a la hora del día fue significativamente mayor al comienzo del período de oscuridad en las plantas del día 0 (22.222 ± 0.797 $\mu\text{moles de CO}_2$ fijados/g de tejido fresco/ minuto) y, posteriormente, la fijación disminuyó a través del

período de oscuridad hasta un punto de 0.255 ± 0.116 $\mu\text{moles de CO}_2$ /g de tejido fresco/ minuto al final del período de oscuridad. En el día 5, el nivel de fijación del CO_2 por las plantas fue el menor en relación con el resto de las plantas en sus respectivas condiciones experimentales (Figura 3, F). La mayor cantidad de CO_2 adquirido fue a la mitad del período de oscuridad 0.156 ± 0.015 $\mu\text{moles de CO}_2$ /g de tejido fresco/ minuto y la menor fue al final del período de oscuridad (0.041 ± 0.007 $\mu\text{moles de CO}_2$ /g de tejido fresco/ minuto). En el día 10 la fijación de CO_2 por la planta presentó un patrón cercano al de la planta control (Figura 3, G). Es decir, la fijación de CO_2 fue mayor durante la última parte del período de oscuridad: en el día 10, las plantas fijaron 0.198 ± 0.052 $\mu\text{moles de CO}_2$ /g de tejido fresco/ minuto a las 16 horas de permanecer en oscuridad y la fijación menor fue al inicio del período de oscuridad (0.121 ± 0.021 $\mu\text{moles de CO}_2$ /g de tejido fresco/ minuto). En la planta control, la fijación significativamente mayor fue 4.257 ± 0.422 $\mu\text{moles de CO}_2$ /g de tejido fresco/ minuto en 8 horas de oscuridad (Figura 3, H) y la menor fue 0.373 ± 0.150 $\mu\text{moles de CO}_2$ /g de tejido fresco/ minuto al comienzo del período de oscuridad.

En *Chamaecereus silvestrii* el comportamiento del patrón de acumulación de acidez titulable (Figura 4, A-D) fue semejante al de *R. rosea*. En los días 0 y 5 la acumulación de acidez en las plantas fue máxima al final del período de oscuridad y en el día 10 junto con la planta control fue a la mitad del mismo. Además, se presentó un aumento en la acumulación de acidez en *C. silvestrii* con el transcurso del tiempo de cultivo en suelo y a partir del cambio de condiciones de cultivo *in vitro* a *in vivo*.

En la Figura 4, A-D, se advierte que la acumulación de acidez titulable en esta especie fue superior en las plantas cultivadas *in vitro* junto con las plantas aclimatadas a suelo, (de origen *in vitro*), en comparación con la planta control, en las proporciones fueron de 1.026, 1.289 y 1.588 veces mayores que la cantidad de la planta control en los días 0, 5 y 10, respectivamente.



Figuras 4. Estimación de la acidez titulable (izquierda) y el intercambio de CO₂ (derecha) a lo largo de los días de cultivo y en el transcurso del periodo de oscuridad en *Chamaecereus silvestrii*. A y E: día 0; B y F: día 5; C y G: día 10; D y H: plantas control. Los valores son la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes.

En los días 0 y 5 se observa un progresivo incremento en la acumulación de acidez titulable conforme avanza la noche. Se obtuvo la mayor acumulación de acidez al final del período de oscuridad, esto es, 141.223 ± 15.612 (día 0) y 198.727 ± 8.598 (día 5) $\mu\text{eq/g}$ de tejido fresco, respectivamente. De igual forma, la menor acumulación en estos días fue al principio del período de oscuridad: 104.566 ± 12.795 $\mu\text{eq/g}$ de tejido fresco en el día 0 y 116.900 ± 16.085 $\mu\text{eq/g}$ de tejido fresco en el día 5.

Por otro lado, en el día 10 y en la planta control, el patrón de acumulación de acidez alcanzó un pico máximo a la mitad del período de oscuridad (209.900 ± 22.767 $\mu\text{eq/g}$ de tejido fresco en el día 10 y 144.977 ± 14.404 $\mu\text{eq/g}$ de tejido fresco en la planta control) y posteriormente declinó dicha acumulación al final de la noche (Figura 4, C). Empero, estas diferencias en la acumulación de la acidez en las plantas a lo largo de las horas en oscuridad y de los días no fueron estadísticamente significativas.

La fijación de CO_2 en *C. silvestrii* alcanzó, también, proporciones mayores en función del tiempo transcurrido las plantas cultivadas en suelo y en plantas trasplantadas de condiciones *in vitro* (día 0) a condiciones de cultivo *in vivo* (día 5 específicamente; Figura 4, E-H). Se presentaron diferencias significativas en relación con la cantidad de CO_2 fijado en los días evaluados en la especie y no a lo largo de las horas en oscuridad. A diferencia de *R. rosea*, en *C. silvestrii* no se presentó una disminución de la cantidad de CO_2 fijado por efecto del cambio en las condiciones de cultivo, esto es, del cultivo *in vitro* al cultivo en suelo (comparar Figuras 3 y 4). En el día 0, la proporción de CO_2 fijado por las plantas correspondió al 14.477 % del CO_2 total fijado por la planta control, en el día 5 la proporción subió a 17.027 % y para el día 10 alcanzó 56.546 %. A pesar de tales condiciones, el patrón de fijación de CO_2 no fue uniforme (ver Figura 4, E-H), pues los picos de máxima fijación de CO_2 fueron a 8 horas de oscuridad en las plantas del día 0 y 5 (0.596 ± 0.080 y 0.315 ± 0.044 $\mu\text{moles de CO}_2 / \text{g de tejido fresco/minuto}$, respectivamente) y al principio del período de oscuridad para el día 10 (1.836 ± 0.985 $\mu\text{moles de CO}_2 / \text{g de tejido fresco/minuto}$) y al final del mismo para la planta control (2.785 ± 0.931 $\mu\text{moles de CO}_2 / \text{g de tejido fresco/minuto}$).

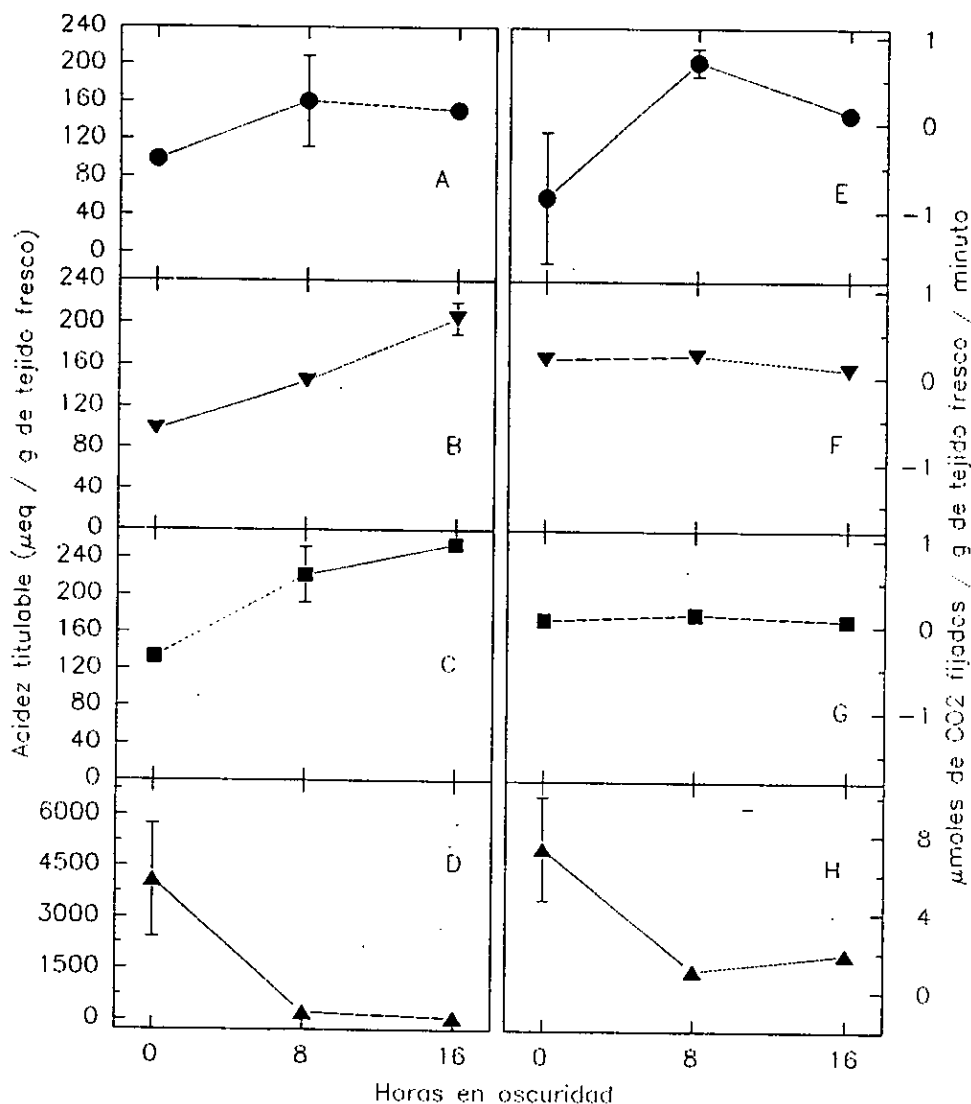
En la figura 4-E, resultó evidente la liberación de CO₂ durante el principio y final del período de oscuridad en esta especie de cactácea bajo condiciones de cultivo *in vitro* (día 0).

En *Epiphyllum crenatum* el patrón de la acumulación de la acidez titulable durante el período de oscuridad fue semejante (comparar Figuras 5 A-D), es decir, se observó una creciente acumulación de acidez en las horas de oscuridad durante los días 0, 5 y 10. Sin embargo, este patrón no coincidió con el de la planta control, en el cual, la principal toma de CO₂ fue, de forma inversa, al comienzo del período de oscuridad (posiblemente la planta control se encontraba en algunas de las modalidades de CAM, en respuesta al ambiente). La acidez titulable que mostró la planta control fue significativamente superior a las plantas de los días 0, 5 y 10.

En proporción, el día 0 presentó 9.410 % de la acidez total acumulada en la planta control. Este porcentaje aumentó con el tiempo de cultivo *in vivo* a 10.283 % en el día 5 y 14.007 % en el día 10. No obstante, las diferencias entre estos tres días no fueron estadísticamente significativas, aunque sí fueron significativamente diferente con respecto a la planta control.

En los días 0, 5 y 10 se obtuvieron los puntos significativamente mayores de acumulación de acidez en esta especie durante la noche, esto es, 150.430±2.430, 205.000±15.000 y 254.375±0.625 µeq/g de tejido fresco, respectivamente. No se presentaron diferencias significativas entre las 8 y 16 horas en oscuridad en cada uno de estos días. Los niveles significativamente menores fueron al principio del período de oscuridad (98.421±6.199 µeq/g de tejido fresco en el día 0, 97.857±2.143 µeq/g de tejido fresco en el día 5 y 133.270±8.270 µeq/g de tejido fresco en el día 10).

Con respecto a la fijación de CO₂ en esta especie, se obtuvo una marcada disminución a partir del cambio de condiciones *in vitro* a suelo (Figura 5, E-H) en proporciones considerablemente reducidas en relación con la planta control. En el día 0, se obtuvo



Figuras 5. Estimación de la acidez titulable (izquierda) y el intercambio de CO₂ (derecha) a lo largo de los días en cultivo y en el transcurso del período de oscuridad en *Epiphyllum crenatum*. A y E: día 0; B y F: día 5; C y G: día 10; D y H: plantas control. Los valores son la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes.

15.182 % del CO₂ total fijado por la planta control. Posteriormente, en los días 5 y 10 las proporciones de fijación de CO₂ disminuyeron en las plantas durante el periodo de oscuridad hasta 5.265 % y 2.274 %, respectivamente, del CO₂ total fijado por la planta control. No obstante, las diferencias entre estas proporciones de fijación de CO₂ durante los días evaluados no fueron estadísticamente significativas. En cambio, se presentaron diferencias significativas entre los niveles altos de fijación de CO₂ de la planta control con respecto al resto de los días en los cuales se encontraron las plantas cultivadas en suelo con origen *in vitro*. Asimismo, la cantidad de CO₂ fijado durante el comienzo del periodo de oscuridad en la planta control fue, evidentemente, significativamente mayor al resto de las plantas.

En el día 0 la mayor fijación de CO₂ fue a la mitad del periodo de oscuridad con un nivel de 0.792 ± 0.116 μ moles de CO₂ fijados/g de tejido fresco/minuto, también en el día 5 (0.253 ± 0.039 μ moles de CO₂ fijado/g de tejido fresco/minuto) y, por último, en el día 10 (0.106 ± 0.015 μ moles de CO₂ fijado/g de tejido fresco/minuto). Posteriormente, los niveles declinan, aunque no se encontraron diferencias significativas entre la fijación de CO₂ durante las 8 y 16 horas de oscuridad en los días 0, 5, 10 ni en la planta control.

Los resultados obtenidos en términos de la fijación de CO₂ en las plantas cultivadas *in vitro*, sugieren que la actividad del CAM fue mayor en *R. rosea* pues esta especie fijó la mayor proporción de CO₂ durante la noche (40.828 %), con respecto a las otras dos especies. *E. crenatum* y *C. silvestrii* fijaron sólo cerca de 15 % del CO₂ total nocturno con respecto a las plantas control. Sin embargo, la magnitud de la actividad del CAM en *R. rosea* disminuyó por el cambio drástico de las condiciones ambientales de los cultivos a las cuales se enfrentaron las plantas por la necesidad de su restablecimiento en suelo. Esta disminución de la actividad CAM se observó marcadamente en ambas epífitas. En cambio, en *C. silvestrii* (geofítica), la actividad de CAM se potencia con el transcurso del tiempo durante la aclimatación a suelo (comparar figuras 3, 4 y 5), en donde alcanza una respuesta superior a las dos epífitas en términos de la acumulación de acidez y en la toma de CO₂. En tanto, en *R. rosea* y *E. crenatum* la actividad de CAM cae drásticamente hasta

que las plantas responden al nuevo ambiente restableciendo la actividad del CAM o evolucionando posiblemente hacia otra variante de CAM (como lo evidenciaron los resultados de la toma CO₂ que progresivamente disminuyen en *E. crenatum* y aumenta, a la vez, la concentración de acidez).

6.2.2. Prolina.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos en la estimación de los niveles de prolina en *Rhipsalidopsis rosea* en el transcurso de los días y de las horas del período de oscuridad. Se obtuvieron diferencias significativas entre las cantidades de prolina acumulada en las plantas por días de cultivo, entre las horas en oscuridad y entre los días por las horas. En comparación con la planta control, las plantas del día 0 presentaron 4.580 veces más acumulación de prolina y en el día 5, 4.091 veces más prolina que la planta control. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre estos dos días (0 y 5), pero, éstos fueron significativamente menores que la proporción de la acumulación de prolina que se obtuvo en el día 10 (6.994 veces mayor que la proporción de la prolina observada en la planta control) y, a su vez, estos tres días (0, 5 y 10) fueron significativamente mayores que los niveles de prolina obtenidos en la planta control. En tanto, la acumulación de prolina significativamente mayor fue a las ocho horas de permanecer las plantas en oscuridad y al comienzo y término del período de oscuridad; los niveles de prolina fueron significativamente menores con respecto a los de la mitad del período de oscuridad, pero entre estas dos etapas del período de oscuridad no se presentaron diferencias estadísticamente significativas.

El menor nivel de prolina fue obtenido en las plantas del día 0, al principio del período de oscuridad (4.153 ± 1.998 μ moles de prolina/g de tejido fresco). A la mitad del período de oscuridad el nivel de prolina presente en la especie aumentó a 10.637 μ moles de prolina/g de tejido fresco y al final del período de oscuridad casi alcanzó al nivel de prolina que se presentó al comienzo del mismo (4.599 ± 2.312 μ moles de prolina/g de tejido fresco).

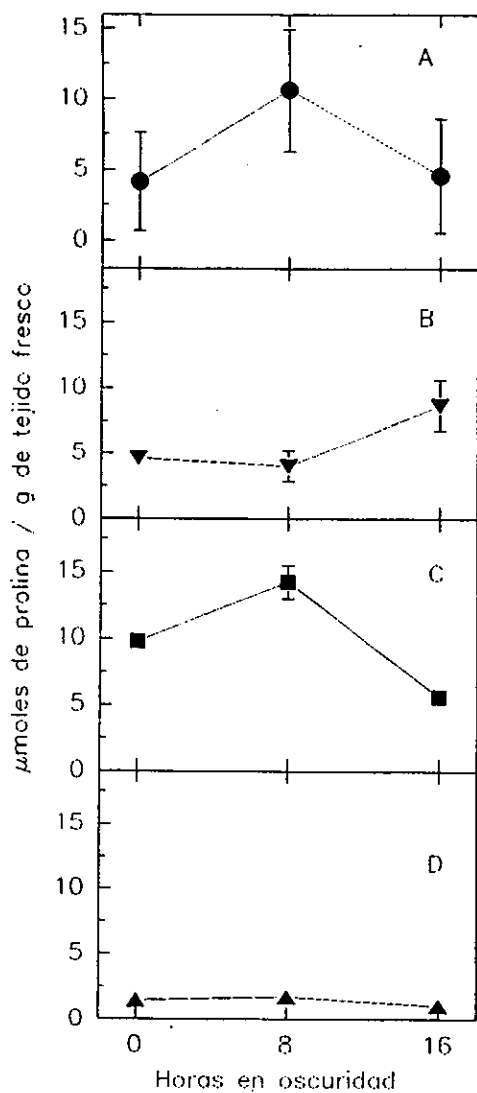


Figura 6. Determinación de la cantidad de prolina en *Rhipsalidopsis rosea* a lo largo de los días de cultivo y en el transcurso del período de oscuridad. A: día 0; B: día 5; C: día 10; D: plantas control. Los valores son la media \pm error estándar de tres muestras independientes.

En el día 5, las plantas mantuvieron niveles de prolina bajos hasta la mitad del período de oscuridad, esto es, 4.593 ± 0.419 μ moles de prolina/g de tejido fresco a las cero horas de oscuridad y 4.005 ± 1.187 μ moles de prolina/g de tejido fresco a las 8 horas en oscuridad. A las 16 horas de oscuridad se observó un aumento en la cantidad de prolina acumulada (8.719 ± 1.919 μ moles de prolina/g de tejido fresco) aunque esta elevación, como ya se mencionó, no fue estadísticamente significativa.

En el día 10 la acumulación de prolina fue significativamente mayor con respecto a los demás días, pues se obtuvieron niveles de 9.797 ± 0.639 , 14.210 ± 1.285 y 5.598 ± 0.393 μ moles de prolina/g de tejido fresco durante las cero, las ocho y las dieciséis horas del período de oscuridad, respectivamente.

En la figura 7 se observa el comportamiento de la acumulación de prolina en *Chamaecereus silvestri* al paso de los días y horas en oscuridad. La acumulación de prolina en la especie fue, evidentemente, disminuyendo a partir del comienzo del período de oscuridad, en donde se obtuvieron niveles altos, hasta el final del mismo (figura 7).

La acumulación de prolina obtenida en los días 0, 5 y 10 fue significativamente mayor en relación con la planta control, pero la cantidad de prolina que se observó en cada uno de estos tres días no fue significativamente diferente. En el día 0 la acumulación total de prolina durante la noche fue 1.422 veces mayor que la obtenida en la planta control; además, esta proporción de prolina acumulada, en el mismo día, fue menor en comparación con las proporciones obtenidas en los días 5 y 10, esto es, 1.623 y 1.653 veces mayor que la proporción de prolina en la planta control.

En las horas 0 y 8 del período de oscuridad, no se presentaron diferencias significativas en la acumulación de prolina en *C. silvestri* en los tres días evaluados, ni en la planta control. Sin embargo, los niveles de prolina acumulada en estas horas fueron significativamente mayores en relación con el nivel de prolina que se obtuvo al final del período de oscuridad y con respecto a los tres días evaluados y a la planta control. En

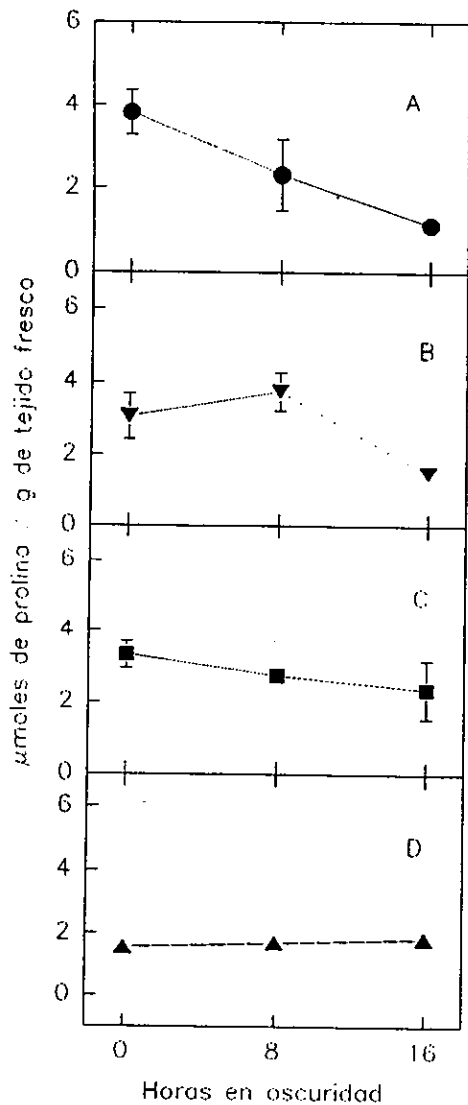


Figura 7. Determinación de la cantidad de prolina en *Chamaece-reus silvestrii* a lo largo de los días de cultivo y en el transcurso del período de oscuridad. A: día 0; B: día 5; C: día 10; D: plantas control.

Los valores son la media \pm error estándar de tres muestras independientes.

otras palabras, en *C. silvestrii* la acumulación de prolina se mantiene relativamente a niveles altos hasta la mitad del período de oscuridad y, posteriormente, disminuye.

No obstante, las diferencias ya mencionadas y de acuerdo al análisis estadístico realizado, es posible considerar que los niveles de prolina en las plantas del día 0 y los de las plantas control son muy semejantes (o muy probablemente iguales) y que, en respuesta, al cambio de ambiente, las plantas aumentan ligeramente la acumulación de prolina.

La cantidad más baja de prolina se obtuvo en el día 0 a las 16 horas (1.120 μ moles de prolina/g de tejido fresco) en comparación con la que se presentó en la planta *in vivo* a la misma hora (1.839 μ moles de prolina/g de tejido fresco) y la mayor cantidad de prolina se obtuvo en el día 10 al principio del período de oscuridad (3.330 μ moles de prolina/g de tejido fresco).

En *Epiphyllum crenatum* la acumulación de prolina (Figura 8) se advirtió de modo considerable en las plantas del día 0. Después del cambio de atmósfera *in vitro* a *in vivo* los niveles de prolina disminuyeron notoriamente, siendo casi iguales a aquellos que presentó la planta *in vivo*.

En las plantas del día 0 se presentó, durante el período completo de oscuridad, una elevación en la acumulación de prolina, diferencia estadísticamente significativa, de 11.919 veces en relación con la planta control. Esta proporción disminuyó en el día 5, sin embargo, fue todavía 3.356 veces mayor que la proporción obtenida en la planta control. En el día 10, se presentó un aumento de la proporción de 4.767 veces con respecto a la planta control. No obstante, de acuerdo con el análisis estadístico realizado, las diferencias mencionadas entre los días 5, 10 y la planta control no fueron estadísticamente significativas.

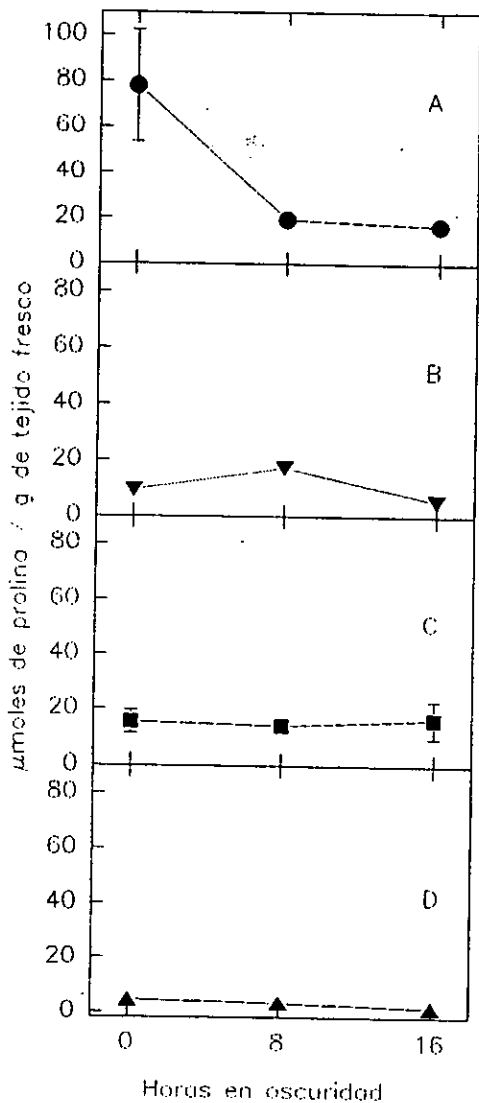


Figura 8. Determinación de la cantidad de prolina en Epiphyllum crenatum a lo largo de los días de cultivo y en el transcurso del período de oscuridad. A: día 0; B: día 5; C: día 10; D: plantas control. Los valores son la media \pm el error estándar de tres muestras independientes.

Las concentraciones de prolina mostradas en la figura 8, al transcurrir de las horas del período de oscuridad, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ni con respecto a la planta control en los tres días evaluados.

Al principio del período de oscuridad en el día 0, las plantas acumularon 77.849 ± 24.362 μ moles de prolina/g de tejido fresco; en la mitad del período de oscuridad la cantidad de prolina disminuyó considerablemente a 19.295 ± 0.222 μ moles de prolina/g de tejido fresco y, al final del período de oscuridad, la cantidad de prolina fue menor, en orden 16.764 ± 1.570 μ moles de prolina/g de tejido fresco (Figura 8).

Las plantas del día 5 al inicio del período de oscuridad presentaron 9.341 ± 1.713 μ moles de prolina/g de tejido fresco; en la hora 8 del período de oscuridad se obtuvo una elevación de la cantidad de prolina de 17.276 ± 1.256 μ moles de prolina/g de tejido fresco y, en la hora 16 del mismo período, se presentó una cantidad de prolina que fue la menor en este día, del orden de 5.453 ± 1.935 μ moles de prolina/g de tejido fresco.

Para el día 10 la cantidad de prolina al comienzo del período de oscuridad fue 15.327 ± 4.209 μ moles de prolina/g de tejido fresco; en la mitad del período de oscuridad se presentó una cantidad de prolina de 13.938 ± 0.186 μ moles de prolina/g de tejido fresco y al finalizar el período de oscuridad se obtuvo un nivel de prolina de 16.290 ± 6.767 μ moles de prolina/g de tejido fresco.

Por último, en la planta control se obtuvieron 4.598 ± 1.010 , 3.343 ± 1.263 y 1.216 ± 0.323 μ moles de prolina/g de tejido fresco al principio, en la mitad y al final del período de oscuridad, respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la especie, posiblemente la acumulación de prolina en las plantas trasplantadas a suelo aumenta y, posteriormente, se espera un comportamiento como el de la planta control.

En general, *Chamaecereus silvestrii* presentó la menor acumulación de prolina en relación con las otras dos especies, ya que así se observó durante la noche completa en el día 0. Asimismo ésta fue la especie en la cual se obtuvo la menor elevación de los niveles de prolina en respuesta al cambio de atmósfera *in vitro* a *in vivo*. Sin embargo, los niveles de prolina en la planta control de *R. rosea* fueron ligeramente menores que los niveles de prolina de la planta control de *C. silvestrii*.

6.2.3. Proteínas solubles.

En la tabla 5, se muestran los valores de proteínas solubles obtenidos en cada una de las tres especies de cactáceas que fueron evaluadas.

En *Rhipsalidopsis rosea* se observó un incremento constante en los niveles de proteína soluble a partir de las plantas cultivadas *in vitro* (día 0) hasta las plantas del día 10 (Tabla 5). La cantidad de proteínas solubles significativamente mayor fue en el día 10. Esta cantidad de proteínas solubles correspondió a una proporción 5.398 veces mayor que la cantidad obtenida en la planta control. Las cantidades de proteínas solubles en los días 0 y 5 fueron significativamente menores con respecto a la cantidad obtenida en las plantas del día 10. En estos días (0 y 5), las proporciones de proteína soluble con respecto a la que se presentó en la planta control fueron 3.914 y 4.497 veces mayores, respectivamente, pero entre estos dos días, los valores no fueron estadísticamente significativos. La cantidad de proteína soluble que se obtuvo en la planta control fue significativamente menor con respecto a los valores obtenidos en las plantas de los días 0, 5 y 10.

En *Chamaecereus silvestrii*, de modo contrario a lo que ocurrió en *R. rosea*, se presentó una disminución significativa de la cantidad de proteína soluble en las plantas de los días 0, 5 y 10 (Tabla 5).

Resultados.

Tabla 5. Contenido de proteínas solubles en las tres especies de cactáceas evaluadas a lo largo de los días de cultivo *in vitro* e *in vivo*. Promedio de tres muestras y error estándar.

Proteínas solubles (mg / g de tejido fresco)			
Día ^a	Especie		
	<i>R. rosea</i>	<i>C. silvestrii</i>	<i>E. crenatum</i>
0	5.112±1.023	3.191±1.099	3.293±1.397
5	5.873±0.424	1.3360±0.386	7.848±0.421
10	7.050±1.078	0.984±0.338	14.373±5.073
IV ^b	1.306±1.084	4.412±0.459	3.867±0.787

a - día 0: cultivo *in vitro*, día 5 y 10: días después del traspaso a suelo de las plantas obtenidas de los cultivos *in vitro*.

b - planta *in vivo*.

Tabla 6. Contenido de clorofila a lo largo de los días de cultivo *in vitro* e *in vivo* de las tres especies de cactáceas estudiadas. Promedio de tres muestras y error estándar.

Especie	Día ^a	mg clorofila / g de tejido fresco			
		a	b	Total	a / b
<i>R. rosea</i>	0	4.895±1.590	4.737±1.666	9.629±3.251	1.056±0.033
	5	1.100±0.475	0.917±0.391	2.017±0.866	1.196±0.008
	10	1.814±0.878	1.534±0.804	3.346±1.681	1.217±0.065
	IV ^b	1.310±0.541	1.066±0.348	2.459±0.826	1.148±0.163
<i>C. silvestrii</i>	0	0.362±0.106	0.300±0.093	0.662±0.198	1.217±0.024
	5	1.527±0.194	0.802±0.109	2.329±0.302	1.910±0.021
	10	1.927±0.329	1.031±0.204	2.958±0.532	1.893±0.070
	IV	1.011±0.099	0.669±0.062	1.680±0.160	1.512±0.044
<i>E. crenatum</i>	0	3.205±1.183	3.054±1.175	6.259±2.357	1.069±0.028
	5	3.448±0.548	1.809±0.527	4.899±0.742	2.050±0.273
	10	3.020±0.115	2.625±0.177	5.645±0.267	1.158±0.062
	IV	3.880±2.346	3.315±2.296	7.192±4.636	1.378±0.151

a - día 0: cultivo *in vitro*, día 5 y 10: días después del traspaso a suelo de las plantas obtenidas de los cultivos *in vitro*.

b - planta *in vivo*.

En el día 0 la cantidad de proteína soluble representó el 72.325 % con respecto a la planta control. No obstante, de acuerdo con el análisis estadístico, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En los días 5 y 10 apenas se obtuvieron 30.825 % y 22.303 % de la proporción total de proteínas solubles obtenidas en la planta control. Las diferencias encontradas entre estos dos días no fueron significativas.

En *Epiphyllum crenatum* se presentó un incremento continuo en la cantidad de proteína soluble a través de los días de cultivo (Tabla 5). En el día 0 sólo se alcanzó 85.156 % de la cantidad correspondiente a la planta control. En los días 5 y 10 los niveles de proteína soluble fueron 2.029 y 3.717 veces mayores que la cantidad de proteína soluble en la planta control, respectivamente. No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de proteínas solubles entre los días de cultivo (0, 5 y 10) ni con respecto a la planta control.

De acuerdo con los resultados, fue evidente que *E. crenatum* presentó la mayor cantidad de proteínas solubles con respecto a las otras dos especies de cactáceas. La segunda en magnitud fue *R. rosea* y la que presentó menor cantidad de proteína fue *C. silvestrii*.

6.2.4. Clorofila.

En la tabla 6 se evidencian los resultados obtenidos en la estimación de la clorofila en las tres especies de cactáceas.

En *Rhipsalidopsis rosea* se observó un nivel de clorofila *a* 3.737 mayor que la planta control en el día 0. No obstante, la cantidad de clorofila *a* (y en general la cantidad de clorofila *b* y clorofila total) disminuyó en el día 5 hasta sólo alcanzar 83.969 % de la cantidad total de clorofila *a* obtenida en la planta control. En el día 10 la concentración de clorofila *a* (clorofila *a*, clorofila total y la proporción clorofilas *a/b*) se restableció de modo

considerable y sobrepasó la cantidad obtenida en la planta control por 1.385 veces más. En la Tabla 6, resultó evidente que la menor concentración de clorofila *a* fue en el día 5 y la mayor en el día 0. Sin embargo, estas diferencias en las concentraciones de clorofila *a* en la especie no fueron estadísticamente significativas.

De igual forma, las concentraciones de las clorofilas *b* y total presentaron una baja y, posteriormente, un restablecimiento en respuesta al cambio de atmósfera que sufrieron las plantas de la especie (Tabla 6). En el día 0 la concentración de clorofila *b* que se obtuvo fue 4.444 veces mayor que la cantidad de la misma clorofila de la planta control. Posteriormente la proporción disminuyó y sólo representó el 86.023 % del total de la clorofila de la planta control. En el día 10, la cantidad restablecida de clorofila *b* aumentó de tal manera que fue 1.439 veces mayor que la clorofila *b* obtenida en la planta control. En tanto, la concentración de clorofila total en las plantas del día 0 fue 3.916 veces mayor que la que se presentó en la planta control, alcanzando sólo el 82.025 % de la clorofila total de la planta control en el día 5, elevándose a 1.361 veces más que la proporción de la planta control en el día 10.

Los resultados, por lo tanto, sugieren un cese de la síntesis de clorofila por el cambio de condiciones de cultivo *in vitro* a *in vivo* y, posiblemente, también una degradación de clorofila y, predominantemente, un ajuste en la proporción de clorofila *a* presente con respecto a la clorofila *b* (Tabla 6). La proporción de clorofilas *a/b* fue en incremento a lo largo de los días en cultivo. Sin embargo, la proporción de clorofilas *a/b* en las plantas de los tres días estimados y en la planta control fue considerablemente baja en relación con las plantas en ambiente natural (Salisbury y Rose, 1994; Tabla 6), aunque se registra un ligero aumento. Las diferencias que se observaron en la clorofila *b* total y en la proporción *a/b* no fueron estadísticamente significativas.

En *Chamaecereus silvestrii*, a diferencia de *R. rosea*, se presentó un aumento continuo en la cantidad de clorofila *a*, *b* y total, así como en la proporción de clorofila *a* con respecto a la clorofila *b* (Tabla 6) a lo largo de los días de cultivo.

En el día 0, las concentraciones de clorofilas *a*, *b* y total representaron sólo el 35.806 %, 44.843 % y 39.405 % de las concentraciones obtenidas en la planta control, respectivamente. En el día 5 las concentraciones 1.510, 1.199 y 1.386 veces más que las obtenidas en las plantas control en la clorofila *a*, *b* y total, respectivamente. En el día 10 las cantidades de clorofilas aumentaron aún más en forma considerable, esto es, 1.906, 1.541 y 1.761 veces más que las de las plantas control en la clorofila *a*, *b* y total, respectivamente.

Las concentraciones de clorofila *a* de los días 5, 10 y de la planta control fueron significativamente mayores en relación con las de clorofila *a* del día 0, pero entre estos días y la planta control las diferencias no fueron significativas. La clorofila *b* de los días 5 y 10 fueron significativamente mayores con respecto a las obtenidas en el día 0 y en la planta control. No se presentaron diferencias significativas en la clorofila *b* de los días 5 y 10 y entre la clorofila *b* del día 0 y la planta control.

Por otro lado, las concentraciones de clorofila total en los días 5 y 10 fueron significativamente mayores con respecto a la planta control y a las plantas del día 0, pero no entre éstos. La clorofila total de la planta control fue significativamente mayor que la del día 0. Por lo tanto, la clorofila total del día 0 fue significativamente menor que el resto de las plantas en las distintas condiciones experimentales.

En tanto, las proporciones que guardaron las cantidad de clorofila *a* con respecto a la cantidad de clorofila *b* fueron también incrementándose con el transcurso del tiempo en cultivo *in vivo*, aunque también las proporciones de éstas fueron menores a las observadas en plantas de ambientes naturales.

Para *Epiphyllum crenatum* las concentraciones de las clorofilas *a*, *b* y total fueron semejantes a lo largo de los días en cultivo y en relación con la planta control. Aunque en general, las concentraciones obtenidas de las clorofilas *a*, *b* y total en los días 0, 5 y 10 fueron menores a las concentraciones obtenidas en las plantas control, se observó un

ligero incremento a través de los días. En el día 0 las cantidades de clorofilas *a*, *b* y total representaron sólo 82.603 %, 92.127 % y 87.027 %, respectivamente, de las cantidades totales de las clorofilas en las plantas control.

En el día 5, la cantidad de clorofila *a* aumentó ligeramente hasta un 88.866 % de la cantidad obtenida de la planta control. Sin embargo, las cantidades de clorofilas *b* y total disminuyeron hasta 54.570 % y 68.117 %, respectivamente, de la cantidad obtenida en las plantas control.

En el día 10 la concentración de clorofila *a* disminuyó constituyendo sólo el 77.835 % con respecto de la concentración en la planta control. En cambio, las concentraciones de las clorofilas *b* y total aumentaron representando el 79.186 % y 78.490 %, respectivamente, Comparadas con la concentración de las plantas control.

No obstante, las diferencias entre los días de las concentraciones de clorofilas no fueron estadísticamente significativas.

La proporción de la clorofila *a* con respecto a la clorofila *b*, en el día 0 fue baja. En el día 5 aumentó hasta un valor que correspondió a los comúnmente observados en las plantas de ambientes naturales, ya que la cantidad de clorofila *b* disminuyó, pero en el día 10, la proporción disminuyó debido a que la concentración de clorofila *a* decreció (Tabla 6).

Chamaecereus silvestrii fue la especie para la cual el cambio de atmósfera resultó benéfico en términos del aumento de las cantidades de clorofilas y, al parecer, presentó menos reajustes en las proporciones de clorofilas *a/b*. En cambio, para *Rhipsalidopsis rosea* el cambio de atmósfera disminuyó las cantidades de clorofilas en general y mostró una adaptación paulatina a la nueva atmósfera. Mientras que, en *Epiphyllum crenatum*, se presentó un ajuste específico, primero, en relación con la concentración de la clorofila *b* en el día 5 y, posteriormente, con la clorofila *a*, así como con la clorofila *b* en el día 10.

7. DISCUSIÓN.

La generación de brotes axilares se logró en las tres especies de cactáceas a través del sistema de propagación *in vitro*. La diferencia en el número de brotes axilares generados en cada especie de cactácea posiblemente se debió a la cantidad de aréolas por área -característica de cada especie- presente en el tallo de las plantas. En *C. silvestrii* existe una proporción mayor de aréolas en los explantes cultivados *in vitro* en comparación con *R. rosea* y, más aún, con *E. crenatum*. Asimismo, todas las aréolas de los explantes de *C. silvestrii* reaccionaron simultáneamente al tratamiento hormonal 10 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA; a diferencia de Vyskot y Jára, que en 1984 obtuvieron en primera instancia un cierto número de brotes que, sólo después de diez semanas sobre medio de cultivo con fitohormonas, generaron nuevos brotes en prácticamente todas las aréolas de su explante. En *R. rosea* sólo las aréolas compuesta y subapicales reaccionaron al tratamiento hormonal 5 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA. Y por último, en *E. crenatum* sólo en el explante manejado se presentó una aréola, misma que reaccionó al tratamiento hormonal 1 mg/L de KIN con 0.1 mg/L de ANA.

En *C. silvestrii* no fue conveniente el hecho de haber obtenido hasta 40 brotes por explante, pues la calidad de éstos estuvo altamente correlacionada con el número de brotes (Clayton *et al.*, 1990), los cuales se presentaron con tendencia a la vitrificación -es decir, a ser brotes anormales-, con un peso fresco inferior y morfología elongada en relación con los brotes normales obtenidos bajo estas mismas condiciones de cultivo, pero con menos de cuarenta. Ault y Blackmon (1987) comentaron acerca de la competencia en la proliferación de brotes, la cual fue observada a través de cinco subcultivos consecutivos sin disminución. Posiblemente en el presente trabajo hubo competencia en los cultivos en donde se obtuvo gran número de brotes, razón por la que su morfología se alteró.

La producción de raíz y callo en *R. rosea* que se presentó en los primeros tratamientos hormonales (esto es, 0, 0.5 y 1 mg/L de KIN y sus respectivas combinaciones con de ANA) se debió principalmente a que en el medio de cultivo la cantidad de ANA predominó e influyó en los explantes. Es decir, ANA ejerció (junto con la cantidad de KIN inherente al explante y la presente en el medio de cultivo como tratamiento hormonal) un efecto sobre la diferenciación celular, promoviendo la diferenciación de raíces; además provocó una rediferenciación celular formando una masa de células indiferenciadas -callos- (Rojas y Ramírez, 1991). Hubstenberger *et al.* (1992) arguyen que algunas especies de cactus parecen tener la capacidad de producir exceso de auxinas *in vitro*. Este exceso de auxinas frecuentemente estimulan la producción de callo. La formación de callo no se dio tan marcadamente en *C. silvestrii*, con los diferentes tratamientos hormonales, posiblemente debido al tamaño del explante, ya que en explantes de mayor dimensión la cantidad de hormonas endógenas fue mayor (Vidalie, 1986).

En el caso particular de *R. rosea*, posiblemente los callos obtenidos se podrían mantener sanos y verdes, libres de oxidación y con un crecimiento continuo agregando al medio de cultivo, como requisito indispensable, 2,4-D (2.5-10 mg/L), 10-20 % de endospermo de coco (Steinhart, 1962; Stuppy y Nagl, 1992) y 1 mg/L de KIN; ya que los dos primeros son inductores específicos de callo (Minocha y Mehra, 1974). El agua de coco contiene especialmente las citocininas zeatina y zeatina riboside, las cuales en muchos casos no pueden ser reemplazadas por ciertas combinaciones de fitohormonas (Stuppy y Nagl, 1992). Sin embargo, para las especies aquí tratadas es necesario definir las concentraciones adecuadas para mantener el crecimiento de los callos. De la misma forma en que lo observó Steinhart (1962), en los tratamientos hormonales en donde se presentó la formación de callo, las células que se llegaron a morir, se incorporaron al agar. Johnson y Emimo (1979) también obtuvieron callos que se perdieron por ser friables en extremo. Steinhart (1962) propone que la oxidación que se suscitó en los callos y en algunos explantes probablemente se debió a las polifenoloxidasas. Asimismo, la oxidación de los tejidos se encuentra en relación con la tirosina, ya que

ésta aceleró enormemente la oxidación. Además de la tirosina, ciertas sustancias también promueven la oxidación; entre éstas se incluyen la caseína hidrolizada, mezclas de aminoácidos, el ácido indolacético (AIA), el ANA, el glutamato y altos niveles de azúcar, específicamente sacarosa (Steinhart, 1962).

En los callos obtenidos *in vitro* de *R. rosea* y *C. silvestrii* hubo una ausencia completa de mucilago, el cual fue abundante en los brotes y plántulas generadas *in vivo*, lo cual también fue observado por Minocha y Mehra (1974) en su investigación. Sin embargo, la producción de callo en *C. silvestrii* y *R. rosea* representó un menor potencial de proliferación de brotes (Clayton *et al.*, en 1990 obtuvieron resultados semejantes).

Durante el período de estrés hídrico, muchos cactus son capaces de producir raíces adventicias del tejido vascular suministrado por la aréola (Mauseth y Halperin, 1975). En relación con el inicio de raíz generado en las aréolas de los brotes axilares producidos *in vitro* en *E. crenatum*, las concentraciones de sales, de sacarosa y de agar en medio de cultivo ejercen una influencia sobre las plantas (específicamente en los brotes y explantes) que produce un déficit hídrico, propiciando así las condiciones para estrés hídrico. El potencial hídrico del medio de cultivo juega un papel muy importante en el desarrollo del sistema, pues de éste dependerá la disponibilidad de los componentes para el tejido y por consiguiente determinará si se presenta un grado de estrés en el mismo, los cambios en la consistencia del medio de cultivo puede controlar la diferenciación o influir en la propogación de las plantas. La planta en condiciones de cultivo *in vitro* está sujeta a una disminución del potencial hídrico, dado por el incremento en el potencial osmótico del medio de cultivo (Maldonado, 1994).

Los brotes que se generaron en la parte apical de los explantes extraídos de *R. rosea*, en aquellas combinaciones hormonales en donde la producción de brotes no se presentó definida (esto es, en 0, 0.5 y 1 mg/L de KIN con sus respectivas concentraciones hormonales de ANA, ver Tabla 1), posiblemente se debieron a que hubo un efecto acumulado de la hormona KIN exógena (del medio del cultivo) y endógena. Además, los explantes que generaron brotes, pertenecían a la parte apical

de los cladodios, siendo esta zona rica en hormonas o, tal vez, el cladodio, del cual se extrajo el explante para el cultivo *in vitro* posiblemente en condiciones *in vivo* en el momento en el que se obtuvo el explante; la planta estaba preparando la formación de brotes de acuerdo con el ambiente en donde se desarrolló. Fue evidente también, en *C. silvestrii*, que en ausencia de KIN el número de brotes axilares fue significativamente reducido (ver Tabla 3) por lo que se considera que los explantes contenían reservas suficientes de citocininas para la generación de brotes (Escobar *et al.*, 1986) o posiblemente sólo se debió al efecto "herida" propuesto por Mauseth y Halperin en 1975.

El tallo dimórfico es característico de *R. rosea*. Kimmach (1951) menciona que los filocladodios angulosos son simplemente formas maduras. En este trabajo se hicieron observaciones al respecto. Se considera que los brotes (cladodios) de morfología angulosa son formas de estrés. En esta investigación los tallos angulosos se presentaron en la mayoría de los tratamientos hormonales mientras que los aplanados sólo se presentaron en una de las combinaciones hormonales; los brotes angulosos fueron evidentemente resistentes al cambio de atmósfera *in vitro* hacia la ambiental, dado que no se deshidrataron visiblemente como ocurrió con los brotes aplanados; la proporción de cladodios aplanados fue mayor que la de los angulosos en las plantas cultivadas *in vivo* y, además, la longitud de los cladodios aplanados de las plantas cultivadas *in vivo* invariablemente fue similar a la longitud de los cladodios angulosos (la longitud de los cladodios aplanados y angulosos de las plantas cultivadas bajo condiciones *in vivo* fue de 3.900 ± 0.225 y 3.144 ± 0.193 cm, respectivamente; los datos fueron obtenidos de nueve ramas), a diferencia de los cladodios obtenidos *in vitro* pues los primeros fueron de menor longitud que los segundos (Tabla 1).

Kimmach (1951) menciona que los cladodios angulosos aparecen, en la base de la planta, después de que se enraizó un cladodio, o en los tallos en los que recientemente se suscitó la floración (la cual en esta especie tiene lugar después de un periodo de sequía e hibernación, con noches a 10°C); los cladodios angulosos son rápidamente

reemplazados por cladodios normales de dos costillas (aplanados). En el presente trabajo, bajo condiciones de cultivo *in vitro* los brotes secundarios fueron invariablemente angulosos, no obstante la morfología del primer brote. En congruencia con los que ocasionan las sales, la sacarosa y el agar en el medio de cultivo este hecho se justificaría. Si una planta (tejido, órgano o células) en condiciones *in vitro* es mantenida en un medio diferente al óptimo, sufre cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos como resultado de alteraciones en las tasas fotosintética y de respiración, además de efectos en el potencial hídrico (Maldonado, 1994).

Por otro lado, seis de las plantas generadas *in vitro* de *R. rosea*, en la combinación hormonal 5 mg/L de KIN y 0.1 mg/L de ANA, se transplantaron a tierra, colocándose en los mismos anaqueles en donde se tenían los cultivos *in vitro*, sólo que a un PAR de 80 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después de mantenerlas en estas condiciones por seis meses, los cladodios que se generaron presentaron las mismas características que los obtenidos *in vitro*, esto es: fueron todos angulosos, con longitudes de sólo 1.2 cm en promedio, presentaron un verde oscuro, se observaron los entrenudos sumamente cortos y el número de cladodios fue muy reducido (sólo cuatro brotes se desarrollaron en las plantas durante todo este tiempo). Esta fue la razón por la cual se decidió cambiar tres de las macetas al ambiente de luz solar indirecta cerca de una puerta de vidrio (ambiente de ventana) dentro del laboratorio; el resto se quedó en el primer ambiente. Después de seis meses más las plantas del ambiente de ventana generaron cladodios aplanados, con el tono verde característico de la planta cultivada *in vivo*; la longitud de los cladodios aumentó hasta 1.8 cm en promedio y el número de cladodios aumentó considerablemente ya que de una aréola compuesta salieron cuatro cladodios; además, las aréolas subapicales, de modo poco común, generaron hasta tres cladodios cada una, también de morfología aplanada. En contraparte, las plantas que se mantuvieron en las condiciones de laboratorio generaron cladodios angulosos, por lo que mostraron una morfología idéntica al matorral *in vitro* obtenido en las combinaciones hormonales 10 mg/L de KIN con 0.1, 0.5 y 1 mg/L de ANA.

Estos hechos demostraron claramente que las condiciones de cultivo *in vitro* y, al menos, las condiciones de luz artificial y, probablemente, la temperatura fueron factores que provocaron el estrés a las plantas obtenidas *de novo*. De las condiciones de cultivo *in vitro*, la concentración de CO₂ y la irradiación han sido evaluadas y presentan un efecto en las características morfológicas así como en la fotosíntesis de plántulas de nogal (Sallonon *et al.*, 1995).

En *E. crenatum* también se observó un tallo anguloso (con cuatro costillas) y entrenudos cortos cuando se enraizó un esqueje. Además, se presentó un sólo brote anguloso en un explante durante el cultivo *in vitro*, éste no presentó raíces aéreas en sus aréolas como en los demás cultivos, posiblemente porque reaccionó de modo diferente al estrés.

Entre las investigaciones realizadas empleando cultivo *in vitro* con cactáceas, algunas han manifestado el hecho de que el tamaño del explante está relacionado con la longitud de los brotes obtenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Mauseth y Halperin, 1975; Minocha y Mehra, 1974, y Dabekaussen *et al.*, 1991). En todos los casos la morfología de los brotes fue típica pero de menor longitud. Esto sugirió que el otro tejido del explante, aunque no es necesario para la iniciación de los brotes puede contribuir a su crecimiento y desarrollo posteriores. Explantes más grandes produjeron un crecimiento más rápido de los brotes y la producción de los mismos se vio también incrementada considerablemente, además se incrementó el peso fresco y seco de los brotes producidos (Mauseth y Halperin, 1975). Mauseth y Halperin (1975) sugirieron que el tejido del explante contenía o sintetizó un factor (desconocido para ellos) que, aunque innecesario para la inducción de los brotes puede incrementar notablemente su tasa de crecimiento. Posiblemente ese factor sea la cantidad de asimilados contenidos en el explante. La translocación de los asimilados se promueve aparentemente inducida por la acción estimulante de la hormona KIN de otras partes de la planta (de modo específico, del explante) hacia la región meristemática promoviendo la formación de brotes (Salisbury y Ross citados por Boyle, 1992). De esta forma, mientras la

cantidad de asimilados sea mayor, podrá sostener el crecimiento y desarrollo de los brotes inducidos, en primera instancia; en seguida, posiblemente el explante tome del medio de cultivo lo necesario para proveer asimilados para continuar el crecimiento de los brotes inducidos y a partir de ellos producir el crecimiento de modo más rápido o lento de los brotes axilares obtenidos, así como la longitud que puedan alcanzar.

Los brotes generados *in vitro* fueron de longitud evidentemente inferior en relación con los que se presentan en condiciones *in vivo*. Durante la primera etapa de expansión, los brotes dependen de asimilados importados de otros órganos de la planta; se convierten en exportadores de asimilados aproximadamente después de que hayan alcanzado la mitad del área máxima (Milthorpe y Moorby citados por Boyle, 1992). Un patrón similar de importación/exportación de asimilados puede ser esperado durante el crecimiento de los brotes axilares en las plantas ensayadas.

En el caso de *R. rosea* y quizás en *E. crenatum*, los brotes o cladodios nuevos (secundarios o terciarios) se generaron en forma rápida (en comparación con las plantas *in vivo*), la translocación de los asimilados se dirigió prioritariamente a donde la demanda era mayor (cladodios secundarios o terciarios), no permitiendo que se emplearan en el crecimiento acumulado de los cladodios preexistentes.

Sanderson *et al.* (1986) mencionan que, generalmente, los tratamientos con reguladores de crecimiento reducen el peso seco de las plantas, por lo cual se piensa que esto tiene relación con la importación y exportación de asimilados e indirectamente con la posible disminución de la longitud de los brotes.

Boyle (1994) observó la disminución de la producción de cladodios secundarios y terciarios arguyendo que obtuvo cladodios inmaduros. Al parecer, de acuerdo con lo observado, en el presente trabajo, el número de cladodios, secundarios y quizás terciarios, generados *in vitro* (en vista de que se obtuvieron cladodios terciarios en 10 mg/L de KIN, principalmente, ya que en cultivos que tenían varios meses también se

presentaron), sugirió que los cladodios secundarios fueron maduros y sostuvieron el crecimiento de los terceros, siendo posiblemente la producción de asimilados bajo condiciones *in vitro* suficiente para sostener la ramificación de la planta. Si estas observaciones fuesen ciertas, se desmentiría el hecho de que en el cultivo *in vitro* frecuentemente se presenta una disminución o pérdida total de la actividad fotosintética como lo proponen Dabekaussen y colaboradores (1991) además, se requeriría de un ensayo posterior para verificar este hecho.

Seeni y Gnanam (1980) señalaron que tanto el fotosistema I y II junto con la fosforilación de los cloroplastos aislados del cultivo de células de *C. silvestrii* presentan un desarrollo y funcionamiento normal de la maquinaria fotosintética. Asimismo, la operación de las vías autotróficas y no autotróficas en el mencionado cultivo, la vía autotrófica empezó a ser menos pronunciada con el transcurso del tiempo en cultivo. A partir de éstos resultados junto con los obtenidos en este trabajo (ver *Resultados* de la evaluación de CAM) se puede afirmar que las plantas en condiciones de cultivo *in vitro* realizan la fotosíntesis para soportar el desarrollo de las mismas y más aún si se siembran explantes de tamaño considerable.

En este trabajo se observó que los brotes de tamaño pequeño enraizados -separados del explante- tardaron más en crecer y desarrollarse sólo cuando se lograban). Además, la gran mayoría de los brotes pequeños, al momento de enraizarlos (produjeron raíz pequeña y casi sin ramificaciones) su desarrollo cesó. Sin embargo, Vyskot y Jára (1984) enraizaron brotes obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de 5-10 mm de longitud.

Lo anterior -junto con la cantidad de asimilados (sacarosa y almidón)- posiblemente sea el fundamento de por qué los brotes obtenidos de *R. rosea* y *E. crenatum* generaron un sistema radicular desarrollado cuando se presentó el explante y probablemente también sea la explicación de la obtención de brotes sumamente delgados y hasta

flácidos en *R. rosea* cuando éstos se enraizaron sin su explante, además de tener un sistema radicular escaso.

Por otro lado, el tamaño pequeño de las plantas en relación con aquellas en su ambiente natural también, posiblemente, se debió a su crecimiento en un volumen limitado dentro del frasco de cultivo, como lo proponen Cheng y Edwards (1991).

La dominancia apical que se presentó en los explantes de *R. rosea* no interfirió con la producción de brotes; en cambio, al parecer fue necesaria (específicamente la aréola apical) para la obtención de brotes aplanados pues en aréolas subapicales y laterales se obtuvieron, como constante, brotes angulosos.

Por otro lado, en *C. silvestrii* y *E. crenatum*, cuando se presentó la dominancia apical en el explante, los brotes axilares aparecieron pero se diferenciaron, se oxidaron (en *C. silvestrii*) o simplemente no se presentaron (en *E. crenatum*), siendo la proporción de brotes reducida en presencia del meristemo apical. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por el equipo de trabajo de Escobar en 1986 y Vyskot y Jára en 1984.

La producción de brotes vitrificados posiblemente se debió a la cantidad de agua que se introdujo al explante o al brote, puesto que el potencial hídrico del medio de cultivo y la disponibilidad del agua son los factores principales de la vitrificación (Leshem *et al.*, 1988). El aspecto de los brotes vitrificados fue debido a que en las células hipertrofiadas se suscitó la difusión potenciada de agua hacia el interior de las mismas (Leshem *et al.*, 1988). El efecto de la entrada de agua en exceso a los brotes y explantes se debió a que las hormonas de crecimiento vegetal actúan sobre la permeabilidad de la membrana (Tran Thanh Van, 1981) permitiendo el paso de agua. Leshem *et al.* (1988) concluyen que las citocininas son la causa de la vitrificación en el melón. Dabekaussen *et al.* (1991) mencionan que el número de cactos anormales fue reducido significativamente cuando se agregó manitol al medio de cultivo pues el potencial osmótico del medio disminuyó. Leshem *et al.* (1988) mencionan que se ha

contrarrestado la vitrificación elevando la concentración de agar hasta 1.1 % en el medio de cultivo; no obstante la producción de brotes disminuye. Por otro lado, Hubstenbeger *et al.* (1992) reportan que incubando los cultivos a una temperatura de 29°C con luz ininterrumpida fluorescente e incandescente en exceso a $150 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el problema de vitrificación de brotes es eliminado virtualmente.

En las especies de cactáceas manejadas, fue posible contrarrestar la vitrificación de los brotes axilares producidos así como la producción de callo evitando el contacto directo de éstos y las aréolas con el medio de cultivo.

Ault y Blackmon (1987) también obtuvieron en sus cultivos brotes normales y anormales. Los segundos -mencionan- crecieron rápidamente, fueron blandos e invariablemente produjeron callo. Éstos no fueron útiles para propósitos de propagación. A diferencia de esto, en este trabajo se obtuvieron brotes normales y anormales en *C. silvestrii* que, sin embargo, fueron de tamaño pequeño (menor a los obtenidos con los otros tratamientos), elongados y de color verde oscuro; asimismo, éstos produjeron brotes normales aunque, generalmente, su producción tardó hasta siete meses (por lo que podrían utilizarse para propósitos de propagación a largo plazo).

Por otro lado, una característica de los cactus anormales y de los que se lograron diferenciar de callo en *C. silvestrii* fue el color verde ligeramente menos intenso, posiblemente causado por la producción de etioplastos en lugar de cloroplastos (Dabekaussen *et al.*, 1991) potenciados también, probablemente, por la irradiación en la cual se desarrollaron los cactus ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en relación con las condiciones normales de irradiación que debe de ser de al menos $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Nobel y Hartsock, 1986). Asimismo, la morfología de los cactus se vio influenciada por la irradiación (Dabekaussen *et al.* en 1991 obtuvieron resultados similares).

Durante el cultivo *in vitro* se han observado cambios "epigenéticos" importantes: endoduplicación cromosomal resultando células tetraploides y aneuploides (Fay y Gratton, 1992; Tran Thanh Van, 1981); fragmentación nuclear dando como resultado células multinucleadas y mitosis normal y anormal (Tran Thanh Van, 1981). Estos cambios afectaron el fenotipo de las plantas. Es posible que esta sea la causa de la formación o producción de algunos brotes anormales en los cultivos *in vitro* de nuestra especie de cactácea.

Una característica importante de las plantas generadas *in vitro*, principalmente en *E. crenatum*, fue el hecho de que mostraron la forma típica del cladodio maduro. Las plantas crecidas de semillas en un campo irrigado, mantienen su forma cilíndrica juvenil por un período largo y crecen muy lentamente (Escobar *et al.*, 1986) mientras que las plantas micropropagadas tienen una apariencia comparable en tamaño y madurez a las plantas de varios años de edad crecidas a partir de semillas; por ejemplo *Mammillaria wrightii* floreció en invernadero durante el verano que siguió al restablecimiento, mientras las plantas crecidas de semillas de esta misma especie requirieron de tres a cinco años para alcanzar la madurez (Clayton *et al.*, 1990). La madurez fisiológica de las plantas de cactáceas obtenidas de cultivos *in vitro* en este experimento, también, se ve reflejada en el metabolismo ácido de Crasuláceas (ver figuras 3, 4 y 5) probablemente potenciando en éstas el desarrollo reproductivo, ya que se ha observado que en *Mesembryanthemum crystallinum* se requiere la inducción de las enzimas de CAM antes de que inicie el ciclo reproductivo de la planta (Cheng y Edwards, 1991).

Una ventaja importante para *R. rosea* fue que la producción *in vitro* de cladodios por explante resultó mayor (cinco cladodios por explante) en relación con las condiciones *in vivo* (hasta tres cladodios por cladodio), ya que potenciar la ramificación en este cacto puede ser un método efectivo para la floración. Boyle (1992) mencionó que el número de brotes florales por planta puede ser considerado una función de tres componentes: a) porcentaje de *n* cladodios que son cladodios apicales, b) porcentaje de cladodios

apicales floreciendo y c) número de brotes florales por cladodio apical floreciendo. Los dos últimos componentes dependen de la madurez de los cladodios apicales y de las condiciones ambientales para la inducción floral. El primer componente depende del grado de ramificación. De las plantas que presentan más ramas podría esperarse que produjeran más cladodios apicales y, consecuentemente, más flores que las que presentasen menos ramas.

En este trabajo los explantes de *C. silvestrii* no reaccionaron de modo igual en las diferentes estaciones en las cuales se tomaron plantas para obtener explantes y cultivarlos *in vitro*. De igual forma, para *R. rosea* la temporada en la cual se formaron más rápido los brotes *in vitro* fue en los primeros meses del año, además de que fue la temporada en la que se obtuvo una menor contaminación en los explantes en las tres especies de cactáceas. Tran Thanh Van (1981) hace referencia al pasado de la planta madre y en el caso del explante hace mención del "estado celular inherente", el cual es posible modular por pretratamiento de la planta madre y modificando su fisiología, bioquímica y características genéticas, asimismo, en el transcurso del cultivo *in vitro* el "estado celular inherente" sufre cambios. Entonces, un ambiente bien controlado de la planta madre puede proporcionar resultados más reproducibles aunque algunos ritmos endógenos no pueden ser reducidos. Tal aseveración concuerda con las observaciones realizadas en estas especies de cactáceas.

De modo contrario a lo esperado, la vía metabólica CAM se presentó en las plantas generadas de los cultivos *in vitro* en las tres especies de cactáceas (Figuras 3, 4 y 5, A y E). Por esta razón, se decidió realizar la evaluación de CAM en estas plantas en la etapa de aclimatación, para monitorear el comportamiento fisiológico que presentasen como respuesta al cambio de las condiciones ambientales. Los perfiles de las variables que evidenciaron CAM (acidez titulable y el intercambio de CO₂) en las tres especies de cactáceas después de 5 y 10 días del cambio a suelo, presentaron patrones de la vía CAM y una tendencia a adoptar el comportamiento fisiológico de las plantas control a lo

largo de los días (Figuras 3, 4 y 5, letras B, F, C y G) y evidenciaron también un reajuste en las propiedades fisiológicas evaluadas en las tres especies estudiadas.

La disminución de la acidez titulable que se presentó al finalizar el período de oscuridad en las tres especies de cactáceas (Figuras 3, 4 y 5) ya se había advertido con anterioridad en otras especies CAM en condiciones de crecimiento de día corto (Kluge *et al.*, 1987; Winter, 1985). El período aplicado de 16 horas de oscuridad fue posiblemente largo para las especies de cactáceas examinadas, principalmente, para mantener la síntesis del malato en un nivel alto por el período de oscuridad completo. Un efecto similar observó el equipo de trabajo de Kluge (1987) en callos, plántulas regeneradas de los mismos callos y en la planta control de *K. blossfeldiana* lo cual se considera como un fenómeno poco frecuente para CAM.

El malato recién sintetizado y probablemente el procedente de la vacuola se descarboxila para dar lugar a CO_2 por un lado y esqueletos de carbono por otro; éstos últimos podrían generar más CO_2 . El CO_2 producido podría ser refijado y formar de nuevo malato (ver Figura 2, I). Sin embargo, si esto ocurriese, la cantidad de acidez titulable no disminuiría como ocurrió en los experimentos realizados en este trabajo (ver Figuras 3, 4 y 5).

Kluge y colaboradores (1987) observaron un decremento de la acidez cuatro horas antes del período de oscuridad y -a diferencia del comportamiento que se obtuvo en nuestros experimentos- advirtieron una variación en el intercambio de CO_2 , esto es, de presentarse una fijación neta de CO_2 , ésta disminuyó y al final del período de oscuridad ocurrió la producción neta de CO_2 . En los resultados de la figuras Nos. 3, 4 y 5, se evidencia la fijación de CO_2 en las tres especies de cactáceas hasta la última hora del período de oscuridad. Por consiguiente, los resultados sugieren que la fijación del CO_2 en la última etapa del período de oscuridad probablemente se llevó a cabo por una vía diferente a la C_4 y C_3 (ya que RuBP es controlada por la luz, ver *Antecedentes*). La

acumulación de ácido cítrico por la noche puede ser una vía que explique la fijación del CO_2 en las especies de cactáceas evaluadas.

Seeni y Gnanam (1980) al realizar experimentos con $^{14}\text{CO}_2$ en cultivos en suspensión de células de *C. silvestrii* bajo régimen de día corto, obtuvieron la mayoría de las marcas del ^{14}C en el malato y la incorporación relativa en éste disminuyó con el tiempo en oscuridad, incrementándose las marcas en los ácidos cítrico, isocítrico, glutámico y fracciones de azúcares. Un flujo continuo de carbono del malato al citrato vía piruvato y posteriormente a glutamato, combinado con la oxidación rápida de los carbohidratos formados *de novo* vía glucólisis podría explicar el *pool* relativamente pequeño de malato en la oscuridad y sobre todo al finalizar el mismo (Seeni y Gnanam, 1980).

La ventaja de la fijación de CO_2 vía ácido cítrico en comparación con la fijación del CO_2 vía ácido málico es inherente al rompimiento del ácido cítrico durante el día. Cada mol de malato es descarboxilado en el citosol durante el período de luz a un mol de piruvato y un mol de CO_2 . La descarboxilación de citrato a malato vía el ciclo del citrato en la mitocondria y, subsecuentemente, al nivel del piruvato, produce 3 moles de CO_2 . Alternativamente, el citrato puede ser roto por completo en la mitocondria a 6 moles de CO_2 . Entonces, la acumulación del citrato durante la noche, con la subsecuente removilización durante el período de luz, puede conducir a una concentración de CO_2 interna más alta durante el día que con la acumulación de ácido málico. Además la acumulación de ácido cítrico durante la noche propicia una reducción neta de equivalentes reducidos y ATP, resultando una ganancia de energía de cerca de 7 moles de ATP por mol de citrato acumulado en las vacuolas (Haag-Kerwer *et al.*, 1992).

El tamaño pequeño de las vacuolas ha sido el argumento referido por los investigadores del CAM en las células en suspensión y células de callos y, es también responsable de la carencia de las oscilaciones diurnas y la falta de acumulación del malato característicos en las células de plantas CAM (Kluge *et al.*, 1987; Seeni y

Gnanam, 1980). Es pertinente apuntar que el tamaño de las vacuolas de las células vegetales está en función de la edad (Avers, 1983).

Por lo anterior, parece factible que la fijación de CO_2 en el ácido cítrico se presente en las plantas examinadas en el presente experimento dado que las plantas obtenidas de cultivos *in vitro* fueron evidentemente de dimensiones menores con respecto a las plantas cultivadas *in vivo* (ver resultados de cultivo *in vitro*) y, por consiguiente, sus estructuras celulares también lo fueron. Es decir, dado el estrés en el que se encontraban sometidas las plantas, de acuerdo con la gran concentración de prolina encontrada, posiblemente el tamaño en las vacuolas de las células de las tres especies de cactáceas evaluadas no fue lo suficientemente grande para almacenar el ácido málico requerido para satisfacer las funciones fisiológicas vitales de las mismas plantas con la posterior descarboxilación del mismo ácido.

Por otro lado, las condiciones experimentales en relación con la iluminación y la temperatura influyeron en la acumulación de la acidez titulable y, por lo tanto, en la fijación de CO_2 durante el período de oscuridad en las tres especies de cactáceas evaluadas (y, seguramente, en sus respectivas plantas control).

Para muchas plantas CAM una diferencia de temperatura entre el día y la noche de 10 a 20 °C, después de una temperatura relativamente alta durante el día, es considerada como óptima para la acumulación de ácido málico y la asimilación de CO_2 durante la noche (Haag-Kerwer *et al.*, 1992). Esto puede deberse a que diferentes temperaturas óptimas están involucradas para las diferentes enzimas que participan en los procesos antes mencionados. Los niveles de luz altos promueven la descarboxilación del ácido málico y, por potenciación de la fotosíntesis, incrementa la acumulación de sacarosa y el almacén de almidón que sirven como una fuente de esqueletos de carbono para la acumulación nocturna del ácido málico. Las temperaturas altas, además, pueden incrementar el eflujo del ácido málico hacia afuera de la vacuola. Finalmente, es posible que la luz y la temperatura afecten al ciclo del CAM cambiando la apertura estomática

por la influencia directa sobre la conductancia foliar para el incremento de la toma de CO₂ (Haag-Kerwer *et al.*, 1992).

El equipo de trabajo de Haag-Kerwer (1992) encontró una interacción importante entre la intensidad luminica y la temperatura aplicados a la planta CAM *Clusia minor*. Observaron que las plantas respondieron característicamente a las condiciones conjuntas de luz y temperatura a las cuales fueron expuestas. Con una diferencia de temperatura día/noche de 10°C, las plantas crecidas en PAR altos (260-300 $\mu\text{moles quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mostraron una toma neta sustancial de CO₂ durante la noche. En tanto, las plantas crecidas en un PAR bajo (30-50 $\mu\text{moles quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) necesitan al menos una diferencia de temperatura día/noche de 15°C para inducir un patrón de intercambio de CO₂ característico del CAM. Además, siempre observaron un intercambio de gas tipo C₃ para las temperaturas constantes en el día y en la noche, en las plantas crecidas bajo un PAR superior a 25°C.

Considerando las temperaturas del día y la noche y los PAR empleados en nuestros experimentos, la energía obtenida a partir de la descarboxilación del citrato puede ser particularmente relevante para las especies que se analizaron -cultivadas en PAR bajo. Haag-Kerwer y colaboradores (1992) mencionan que en las plantas CAM que crecen bajo condiciones de iluminación restringida se ven limitadas en la cantidad adquirida de CO₂ y no muestran una refijación de malato durante la noche a partir del CO₂ respirado. Por lo que, la acumulación del ácido cítrico durante la noche puede reducir la pérdida concomitante del carbono debida a la respiración mitocondrial nocturna.

En nuestro caso, también en las plantas control de las tres especies de cactáceas valoradas fue posible que el CO₂ se fijara al citrato debido a las condiciones de iluminación baja (80 $\mu\text{moles quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en las cuales se llevó a cabo la evaluación de CAM.

Los resultados obtenidos de la acidez titulable y de la fijación de CO₂ no cumplieron la proporción 2:1 en las tres especies de cactáceas evaluadas en ningún día, en ninguna hora del período de oscuridad y tampoco en las plantas control. En general, la acidez titulable fue comparativamente mayor en relación con el CO₂ fijado por la plantas. Por consiguiente, los resultados sugieren que el CO₂ producido por respiración es reasimilado por las plantas bajo las condiciones ambientales del experimento en las cuales se estimaron los parámetros. Sin embargo, el CO₂ reasimilado no fue fijado en malato. Asimismo, el reciclado del CO₂ no conduce a una ganancia neta de CO₂ a menos que la Acetil-CoA sea derivada del rompimiento de los ácidos grasos (Haag-Kerwer *et al.*, 1992), por lo tanto, la relevancia de la acumulación del ácido cítrico se hace de nuevo presente para las plantas estudiadas en este trabajo.

El comportamiento de la acumulación y fijación de acidez titulable y CO₂ para *Rhipsalidopsis rosea* y *Epiphyllum crenatum* estuvo bajo la influencia de su hábitat epífita natural. La ocupación de hábitats epífitos trae como consecuencia una reducción de la actividad del CAM (Medina *et al.*, 1989; Nobel y Hartsock, 1990). Por otro lado, tiene consecuencias fisiológicas tales como una reducción de la cantidad potencial de radiación diaria que reciben los tejidos fotosintéticos. Por ello, es probable que se observen adaptaciones del aparato fotosintético a bajas intensidades de luz (produciendo más clorofila para la captación efectiva de la baja radiación lumínica). La magnitud de la fijación nocturna de CO₂ y la acidez titulable se reduce en forma proporcional a la cantidad de radiación total disponible durante el día (Medina *et al.*, 1989). Asimismo, los cactus epífitos presentan niveles de saturación del aparato fotosintético a PAR relativamente bajos (Nobel y Hartsock, 1986).

La disminución que se observó del CAM en las dos especies epífitas en respuesta al cambio de atmósfera de *in vitro* a *in vivo* y la potenciación del CAM en la especie geofítica se debió posiblemente a que las dos primeras, están morfológicamente menos protegidas contra la evaporación (Medina *et al.*, 1989) que la segunda, además de la variación en el contenido de clorofila que se presentó en las especies epífitas y la

especie geofítica. Es decir, la capa cerosa de las plantas epífitas generalmente es delgada en comparación con las plantas que se encuentran expuestas a una radiación lumínica superior. En cultivo *in vitro*, las plántulas tienden a carecer de cutícula gruesa en comparación con la planta *in vivo* y las raíces son frecuentemente anormales, estos factores en combinación hacen que las plantas estén sujetas a un estrés hídrico severo cuando se sacan por primera vez del cultivo estéril. Esto hace necesario condiciones en las cuales exista más humedad que la que pudiera requerir normalmente (Fray y Gratton, 1992).

También, una característica relevante de las plantas obtenidas por medio de cultivos *in vitro* es que la capa cerosa prácticamente no se desarrolla, debido principalmente a las condiciones de iluminación. Por consiguiente, *R. rosea* y *E. crenatum* perdieron demasiada agua por el cambio de atmósfera. Este hecho se verificó por los niveles de prolina observados en las especies analizadas en este trabajo. En las especies epífitas los niveles de prolina fueron significativamente superiores a los niveles de la especie geofítica (ver figuras 6, 7 y 8).

Muchos organismos de diferentes reinos -y probablemente en todas las bacterias y plantas- hacen uso de diferentes mecanismos específicos cuando se encuentran sujetas a alguna clase de estrés que incrementa el déficit hídrico. Esto es, se acumulan y sintetizan compuestos conocidos como solutos compatibles (son compuestos orgánicos que pueden tolerarse en el citoplasma sin causar desnaturalización enzimática; Salisbury y Ross, 1994) de peso molecular bajo, como: prolina, glicina-betaina, polioles y aminas cuaternarias. Se supone que estos osmorreguladores putativos pueden mitigar los efectos del estrés osmótico, a lo que se le conoce como ajuste osmótico u osmorregulación (Thomas *et al.*, 1992). Por lo que es común que en las plantas aparezcan incrementos de 10 a 100 veces de la cantidad del osmorregulador prolina en condiciones de estrés (Salisbury y Ross, 1994), se han registrado para algunas especies vegetales, niveles mayores a 200 veces del presente en plantas no estresadas, mientras que en otras especies, las acumulaciones son muy

bajas, llegando a 5 μ moles de prolina por gramo de peso fresco en las hojas de algodón en estrés osmótico. El papel de la prolina es actuar como un regulador osmótico, un protector de la desnaturalización de las enzimas, un reservorio de nitrógeno, una fuente de carbono y un estabilizador del mecanismo de la síntesis de proteínas (Maldonado, 1994; Handa *et al.*, 1986).

La acumulación de prolina depende del potencial hídrico de las células, de la pérdida inicial del turgor pero, específicamente, del potencial osmótico de las células. Esto sugiere un papel positivo de la acumulación de la prolina en la adaptación de las células al cambio externo del potencial hídrico (Handa *et al.*, 1986). Asimismo, el incremento de prolina depende de la longitud del tiempo de exposición en el cual se presente el estrés y la edad de la planta (Thomas *et al.*, 1992). La importancia del ajuste osmótico es mantener el crecimiento bajo diferentes circunstancias de estrés (Handa *et al.*, 1986). El nivel de prolina en las plantas es representativo del grado de adaptación y no del daño, puesto que las plantas son capaces de revertir a un patrón normal de crecimiento cuando se elimina el estrés (Handa *et al.*, 1986).

En hojas de *Mesembryanthemum nodiflorum*, por ejemplo, el contenido de prolina incrementa en pocas horas después de que el estrés ha empezado y puede incrementarse hasta 10 veces en uno o dos días. Después de que el estrés cesa, el contenido de prolina declina rápidamente (Treichel, 1986).

Las células de diferentes tejidos son cruciales para la cadena de respuesta por estrés hídrico: el estrés es percibido por la raíz, diferentes células en el córtex de la raíz y/o el cilindro central reaccionan y son responsables de la generación de señales de las cuales depende la organización de los tejidos. La percepción del estrés posibilita la traducción de varias señales y éstas pueden estar integradas para obtener una respuesta en la planta completa (Adams *et al.*, 1992).

Los cambios en los niveles de prolina a lo largo de las horas del período de oscuridad en las tres especies de cactáceas (figuras 6, 7 y 8) se deben posiblemente a que existieron diferentes momentos en la noche en donde el estrés hídrico se acentuó y por consiguiente fue necesario un ajuste osmótico entre el ambiente externo y el causando la acumulación de prolina interno (dentro de las plantas). Este hecho ocurrió porque, posiblemente el ajuste osmótico comenzó casi inmediatamente después de la exposición o acentuación del estrés, además de que el mecanismo que permite el ajuste osmótico y, por lo tanto, el incremento del potencial de turgor puede ser iniciado en forma casi inmediata tras la exposición a un potencial hídrico bajo (Handa *et al.*, 1986). Asimismo, el ajuste necesario, probablemente se presentó con prontitud (o en un período de tiempo corto) debido al tamaño reducido que mostraron las plantas obtenidas de los cultivos *in vitro*.

El ajuste que se llevó a cabo en términos de mayor producción de prolina en ciertos puntos específicos del período de oscuridad posiblemente se debió a que en estos instantes se abrieron los estomas de las plantas para la toma de CO₂ provocando una pérdida de agua adicional, la cual probablemente se escapó por el hecho de que las plantas no presentaron una capa cerosa adecuada para evitar la evaporación de la misma. Sin embargo, esta afirmación sólo resultó evidente para *C. silvestrii* en todos los días de análisis, en *E. crenatum* sólo en los días 5 y 10 y en *R. rosea* no fue posible correlacionar estas dos variables excepto en el día 10. Por otro lado, la síntesis de ácidos orgánicos significa un incremento en solutos que implicaría, finalmente, un incremento de la presión osmótica que propiciaría un equilibrio entre el medio interno con el externo de las plantas por lo que el ajuste osmótico, mediado por la acumulación de prolina, no sería necesario y de aquí la explicación de las concentraciones de ésta obtenidas en este experimento.

En tanto, se realizaron impresiones de estomas colocando una gota de pegamento transparente a un portaobjetos colocado encima de ésta fragmentos de tallos -de la región basal de los tallos como constante- de las plantas de cada especie, permitiendo

secar el pegamento. Estos resultados no se presentaron porque las impresiones de los estomas que se obtuvieron no fueron adecuadas para el microscópio óptico. Se sugiere, por lo tanto, emplear un método diferente para la observación exacta y nítida de los estomas de las especies evaluadas. Sin embargo, fue posible advertir que la mayoría (si no es que todos) los estomas de *C. silvestrii* y *E. crenatum* estuvieron entreabiertos (ya que no estuvieron completamente abiertos) en la mitad del período de oscuridad y una minoría al final del período de oscuridad. No fue posible observar una imagen nítida (o al menos suficientemente visible) de los estomas de *R. Rosea*.

Por otro lado, es viable que después del periodo de luz, la temperatura provocarse un aumento en la evaporación del agua en las plantas y en su sustrato causando el ajuste osmótico y, por lo tanto, el aumento en los niveles de prolina durante el inicio del período de oscuridad como se obtuvo en el día 0 y 10 en *C. silvestrii* y en el día 0 en *E. crenatum*. Con el transcurso de la noche, la temperatura descendió originando una evaporación mínima de agua, lo que propició que los niveles de prolina descendieran al final del período de oscuridad, en *R. rosea* en el día 10, en *C. silvestrii* en los tres días evaluados y en *E. crenatum* en los días 0 y 5 (ver figuras 6, 7 y 8).

Por otro lado, el déficit hídrico produce efectos severos en el crecimiento vegetal, encontrándose cambios en la longitud del tallo, longitud radical, número de flores, número de hojas, espacio entrenudos, producción de materia seca, velocidad de alargamiento celular, cambios en la actividad enzimática, actividad de ARN y ADN, síntesis de proteínas, entre otros -aunque se manifieste de diferente manera- como respuesta a un mínimo grado de estrés (Maldonado, 1994). Lo anterior explicaría la morfología que presentaron *R. rosea* y *E. crematum* y confirmaría, a su vez, que el estrés hídrico es la causa del tallo dimórfico característico de *R. rosea* y del que presentó *E. crematum*. Estos efectos del déficit hídrico se deben a que se alteran las estructuras de las macromoléculas a causa de la deshidratación y la acumulación de metabolitos da como resultado una disminución del crecimiento vegetal.

El déficit hídrico afecta disminuyendo la tasa fotosintética (equivalente a la producción de biomasa) a causa del cierre estomático y de los efectos en los procesos del cloroplasto. En general, la producción de biomasa parece ser directamente proporcional al abastecimiento y uso de agua. Otro efecto del déficit hídrico es la reducción de los reguladores de crecimiento, tales como la citocinina en la exudación radicular y el incremento del ácido abscísico en las hojas, afectando la síntesis de proteínas y el cierre estomático, respectivamente.

La regulación de la concentración de prolina aún no se entiende del todo. Se cree, por otro lado, que los cambios que se llevan a cabo en la turgencia de las células vegetales activan y controlan el grado de síntesis de los solutos compatibles (Salisbury y Ross, 1994). Por otro lado, la regulación de la síntesis de prolina es probablemente controlada por la activación de P-5-C reductasa (ver figura 9). La actividad de P-5-C reductasa, cuando se induce el estrés en *Mesembryanthemum nodiflorum*, indica una síntesis *de novo* de la enzima. La vía de biosíntesis de prolina (figura 9) empieza con el ácido glutámico y consiste en dos reacciones y una ciclización (Treichel, 1986).

El glutamato es convertido por la glutamato-kinasa y la deshidrogenasa a glutamato semialdehído, el cual espontáneamente es convertido a pirrolina-5-carboxilato. Ésta a su vez es convertida a prolina por la pirrolina-5-carboxilato reductasa. En plantas superiores, la principal vía biosintética de prolina ha sido localizada en el cloroplasto, aunque también se ha encontrado una vía citoplasmática en algunas especies.

La acumulación de prolina a causa del estrés puede ser explicada por una disminución en la oxidación hacia el ácido glutámico. Probablemente este mecanismo contribuye en la acumulación de prolina, específicamente si se lleva a cabo la inhibición por retroalimentación de la biosíntesis. Las enzimas que oxidan a la prolina son prolina deshidrogenasa (paso 5 de la figura 9) y P-5-C deshidrogenasa (paso 6 de la figura 9). En tanto, P-5-C ocupa una posición central en la biosíntesis y degradación de prolina,

Discusión.

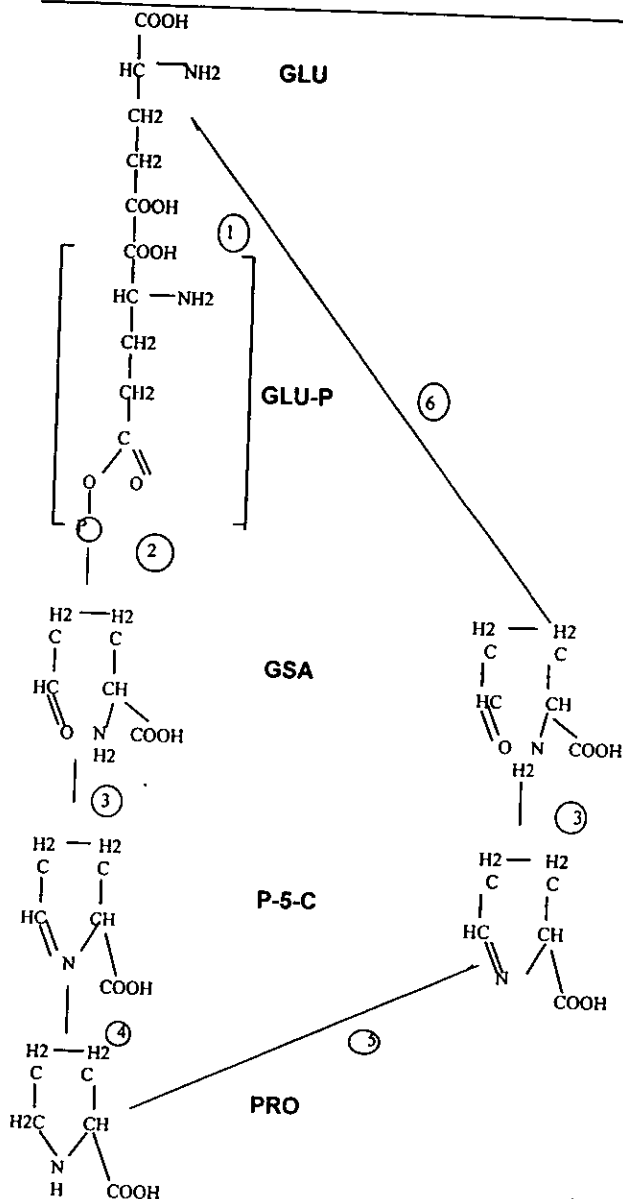


Figura 9. Via de la síntesis de prolina y la degradación a ácido glutámico

- 1 gamma-glutamikinasa = ATP : L-glutamato-5-fosfotransferasa
- 2 gamma-glutamil-fosfato reductasa = L-glutamil-5-fosfato : NAD(P)⁺ oxidoreductasa.
- 3 ciclización no enzimática
- 4 P-C reductasa = L-prolina : NAD(P)⁺ 5-oxidoreductasa
- 5 prolina oxidasa = L-prolina : O₂ oxidoreductasa, EC 1, 4, 3,-[prolina deshidrogenasa = L-prolina : NAD(P)⁺ 5-oxidoreductasa]
- 6 P-C deshidrogenasa = pirilino-5-carboxilato : NAD(P)⁺ oxidoreductasa (tomado de Treichel, 1986).

en el metabolismo de ornitina y arginina (ciclo de la urea), así como en los aminoácidos N-acetil (y finalmente del ácido glutámico; Treichel, 1986).

Con respecto a la degradación de prolina, se piensa que ésta se realiza en la mitocondria. Existen evidencias de que la concentración de la prolina está regulada por el cierre de las relaciones metabólicas entre la prolina y el ácido glutámico, por su propia síntesis y por la tasa de oxidación, pues ésta es inhibida por los carbohidratos en varias plantas superiores (Maldonado, 1994). El proceso de oxidación está relacionado con la acción de la enzima prolina-oxidasas que puede disminuir la acumulación de prolina y con la pirrolin-deshidrogenasa activa que puede oxidar la prolina para llegar a formar ácido glutámico otra vez. Estas enzimas se encuentran en la mitocondria y son importantes en la aceleración de los mecanismos por los que la planta acumula prolina bajo condiciones de estrés (Maldonado, 1994).

Después de que el ajuste osmótico ocurrió en cada una de las plantas de las tres especies de cactáceas -como respuesta al estrés hídrico al cual se expusieron debido al cambio de atmósfera- éstas se recuperaron, recobraron el turgor perdido e iniciaron su crecimiento (ésto último indica que el ajuste osmótico ocurrió, Handa *et al.*, 1986). Este crecimiento fue advertido, en el presente trabajo, por los niveles de proteína soluble evaluados en las plantas obtenidas en cultivo *in vitro* a lo largo de los días de cultivo *in vivo* y, para comparación, en plantas en cultivo *in vitro* y en la planta control.

En *Rhipsalidopsis rosea* se observó una producción incrementada de proteínas solubles (Tabla 5), por lo que se piensa que el ajuste osmótico se verifica de modo rápido permitiendo el desarrollo de las plantas en la etapa de aclimatación. El nivel reducido de proteína soluble de la planta control posiblemente se debió a que la fracción tomada del tejido para realizar la medición fue de una porción relativamente pequeña y poco significativa en relación con el tejido total del cladodio, ésto en comparación con los cladodios completos que se ocuparon para la evaluación de proteínas solubles en las plantas de origen *in vitro*, debido al tamaño reducido de las

plantas que se obtuvieron *in vitro* (como ya se mencionó con anterioridad) en relación con el tamaño de las plantas en condiciones de cultivo *in vivo*.

En *E. crenatum* se presentó un comportamiento semejante al de *R. rosea* con respecto a la cantidad de proteínas solubles obtenidas a lo largo de los días de aclimatación en suelo (Tabla 5). Asimismo, la cantidad de proteínas solubles obtenida en la planta control fue inferior posiblemente debido a la misma razón que se mencionó en *R. rosea*.

En *E. crenatum* se verificó el mayor crecimiento vegetal, expresado como cantidad de proteína soluble por gramo de tejido fresco, después del cambio de ambiente (*in vitro* hacia *in vivo*) en relación con las otras dos especies de cactáceas. Por ello es posible afirmar, de acuerdo con los parámetros analizados hasta el momento, que *E. crenatum* cultivada en condiciones *in vitro* pierde una cantidad de agua mayor al inicio de la toma de CO₂ al iniciar la noche (ver figura 8, A), provocando como consecuencia un mayor grado de estrés, evidenciado por los altos niveles de prolina obtenidos en esta condición de cultivo (Figura 8). En tanto, omitiendo el estrés hídrico, tuvo lugar el crecimiento o desarrollo general de las plantas y de aquí los niveles de proteínas solubles que se presentaron en los días 5 y 10 (Tabla 5). En cambio, según los resultados, las plantas de *R. rosea* en la atmósfera *in vitro* perdieron menos agua al momento de la toma de CO₂ (durante el periodo de oscuridad) y en la aclimatación a suelo; perdieron más agua por el mismo efecto de toma de CO₂ durante la noche, lo cual se evidenció por los niveles de prolina (comparar Figuras 6, 7 y 8).

En los resultados se advirtió que *Chamaecereus silvestrii* presentó los niveles más bajos de proteínas solubles en relación con las otras dos especies de cactáceas (Tabla No. 5) y no se presentó un aumento en dichos niveles, por lo que el crecimiento se vió interrumpido en respuesta al cambio de atmósfera *in vitro* hacia *in vivo*. Posiblemente, debido a estos niveles bajos de proteínas solubles, las plantas reaccionaron aumentando la síntesis de ácidos titulables y, por lo tanto, la fijación de CO₂ -ya que

esta especie presentó los niveles más altos de acidez titulable. Esto significa que el ácido málico descarboxilado sirve en las plantas, principalmente, para sintetizar azúcares, proteínas y mARN (Seeni y Gnanam, 1980).

Por otro lado, resultó evidente que en *C. silvestrii* se presentó un estrés hídrico sumamente inferior -de acuerdo con los niveles de prolina obtenidos- en relación con las otras especies (comparar Figuras 6, 7 y 8). Si la prolina se ocupase, después de que el estrés hídrico cesara, como una fuente de aminoácidos como lo propone Maldonado (1994), las plantas de *C. silvestrii* no tendrían una fuente considerable para sintetizarlos, lo que se vería reflejado, posiblemente, en la cantidad de proteínas solubles en la especie. También, es posible que la misma alta cantidad de prolina que se presentó como respuesta al estrés hídrico interviniera en los niveles de proteínas solubles en las otras dos especies de cactáceas cuando fue evaluado el parámetro.

Además, de acuerdo con los niveles de prolina obtenidos en *C. silvestrii*, es posible afirmar que la especie se encontraba mínimamente estresada, lo que se evidenció por el ajuste osmótico, expresado por los relativamente niveles altos de prolina que se observaron al inicio de la toma de CO₂; al principio del periodo de oscuridad y al finalizar éste los niveles de prolina fueron muy semejantes a los niveles encontrados en la planta control (Figura 7), por lo que las condiciones manejadas en el cultivo *in vitro*, fueron apropiadas para esta especie de cactácea. Además de que la síntesis de ácidos titulables se verificó rápido en las plantas de esta especie (Figura 4) ayudando a que el potencial osmótico estuviera en equilibrio con el medio externo sin ser necesaria la producción de prolina para el ajuste osmótico pertinente.

Por lo anterior se puede deducir que las plantas de *C. silvestrii* se encontraron en equilibrio fisiológico en ambas condiciones de cultivo y el cambio de atmósfera sólo benefició y posibilitó la potenciación de la fotosíntesis. Este hecho se ve reflejado al comparar las proporciones de clorofila en las plantas de esta y de las demás especies de cactáceas.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 6 se puede afirmar que se presentó un cambio en la organización de los complejos Fotosistema II, citocromo *b/f*, Fotosistema I, ATPsintetasa, LHC2 y LHC1 de las membranas de los tilacoides (Anderson y Andersson, 1982) y una posterior síntesis de los compuestos que forman dichos complejos, específicamente de las clorofilas, en las tres especies de cactáceas. La reorganización de los complejos de las membranas de los tilacoides se debió a que los fosfolípidos de la membrana de los tilacoides son muy fluidos, por lo que se hace posible que la composición y estructura de sus membranas se modifique, lo cual implica una adaptación a las condiciones de luz existentes en el medio. La síntesis de nuevos componentes se evidenció por los niveles altos de clorofila observados en el día 10 de aclimatación a suelo (Tabla 6). Estos cambios dinámicos en la composición y organización de la membrana de los tilacoides se verifican, además, para la optimización y protección de la maquinaria fotosintética también como respuesta adaptativa a los cambios en las condiciones de luz.

Las membranas de los tilacoides son capaces de organizar sus componentes de membrana existentes rápidamente en respuesta a varios cambios súbitos ambientales perjudiciales (Anderson y Andersson, 1988). Lo anterior explicaría las proporciones entre los dos tipos de clorofila evaluados en este trabajo que se obtuvieron en las tres especies de cactáceas a lo largo de los días de aclimatación a suelo. Las proporciones de clorofila *a/b* son un índice sensible del apilamiento de las membranas internas de los cloroplastos (los tilacoides), es la proporción relativa de campos apilados contra los no apilados: mientras la proporción de clorofila *a/b* sea menor, el apilamiento de los tilacoides será mayor y mientras la proporción sea mayor, el apilamiento de los tilacoides será menor (Anderson y Aro, 1994). Asimismo, y ya que las proporciones de clorofilas *a/b* están correlacionadas con el grado de apilamiento de los tilacoides, la susceptibilidad de las hojas de plantas superiores a la fotoinhibición está también linealmente relacionada con el grado de apilamiento de los tilacoides: mientras el apilamiento de los tilacoides es menor, los efectos de la fotoinhibición son mayores y

mientras mayor es el apilamiento de los tilacoides menor son los efectos de la fotoinhibición (*op. cit.*).

Los resultados de la tabla 6 evidencian el cambio de las concentraciones y, de esta forma, de las proporciones de de clorofila *a/b* y cómo se fue dando un ajuste paulatino de éstas a lo largo de los días, de acuerdo con las condiciones ambientales de luz imperantes en las plantas de las tres especies de cactáceas. Los resultados de las proporciones de clorofila *a/b* nos indican, de igual forma, que las plantas de las tres especies de cactáceas en condiciones de cultivo *in vitro* presentaron tilacoides ligeramente más apilados. Este grado de apilamiento cambió con las diferentes condiciones de luz del cultivo *in vivo*.

La asimetría lateral en la distribución de los complejos asegura gran versatilidad en el funcionamiento de las membranas fotosintéticas, como un importante factor para las plantas que pueden existir en una gran variedad de condiciones ambientales (Anderson y Andersson, 1988).

Las condiciones de baja irradiación lumínica (PAR de $80 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) manejadas en los cultivos *in vitro* del presente trabajo provocaron que existiese en las tres especies de cactáceas una mayor cantidad de clorofila alrededor del centro de reacción fotosintético (fotosistema II) para hacer eficiente la cosecha de luz (captación de fotones de la luz). Cuando se cambiaron las plantas de ambiente (aclimatación a suelo), la luz incidió directamente en las plantas (ya no tenían la barrera de vidrio) y ello resultó contraproducente ya que se presentó una declinación considerable de las concentraciones de clorofila *a* y *b* en el día 5 de *R. rosea* y un descenso sólo en la clorofila *b* en las plantas de *E. crenatum* en el mismo día (Tabla 6) dado que se presentó un rompimiento de las proteínas del mismo centro de reacción en donde se encuentran las clorofilas (lo cual es propuesto por Anderson y Andersson, 1988).

El fotosistema II se encarga de regular la cosecha de la luz tanto en plantas de sol como de plantas de sombra (Anderson y Andersson, 1988; Anderson y Aro, 1994). Este fotosistema tiene un centro de reacción clorofílico (P680) y alrededor de este centro se encuentra el complejo de captura de energía solar (LHC2; Anderson y Andersson, 1982), conformado por cerca de la mitad de las moléculas de clorofila *a* y la mayoría de la clorofila *b* y xantofilas (la otra mitad de moléculas de clorofila *a* y el resto de clorofila *b* se encuentran en el LCH1 del fotosistema I; Anderson y Andersson, 1988).

La regulación del fotosistema II está dada en función de las cantidades relativas de los centros de reacción del fotosistema II con respecto al del fotosistema I, así como en el tamaño y organización de la antena cosechadora de luz, es decir, el complejo LCH2 que es el número de moléculas de pigmento que ayudan en el centro de reacción del fotosistema II. El LHC2 está compuesto por dos partes principales. Existe un *pool* interno de LHC2 unido fuertemente al centro del fotosistema II. Éste es complementado por un *pool* periférico. Ambos *pools* tienen la misma composición de clorofilas. Se ha encontrado que sólo el *pool* periférico de LHC2 es el que varía el tamaño de la antena del fotosistema II en respuesta al cambio de las condiciones de luz (Anderson y Andersson, 1988).

Cuando las plantas están expuestas a bajas intensidades lumínicas (por ejemplo las plantas de "sombra") existe más cantidad de clorofila alrededor del centro de reacción fotosintética para una captura exitosa de la luz. Si estas plantas son expuestas a intensidades de luz altas (por ejemplo las intensidades en las que se encuentran las plantas de "sol") se observa una marcada declinación en la eficiencia del fotosistema II, la llamada fotoinhibición, ya que la cantidad de clorofila determina la tasa de absorción de luz por el fotosistema II y la tasa de la energía de la luz atrapada por el P680. Por este fenómeno, las plantas han desarrollado varios mecanismos para minimizar la fotoinhibición y reparar el daño hecho al fotosistema II: reducir el tamaño de la cantidad de la antena de clorofila del fotosistema II de la planta. Esto explicaría el reajuste de las cantidades de clorofila en *R. rosea* y *E. crenatum* (Tabla 6), especies epífitas, dado

principalmente porque su aparato fotosintético está adaptado a bajas intensidades de luz por lo que sintetizan mayor cantidad de clorofila para cosechar la mayor cantidad de luz posible.

En *E. crenatum* sólo se presentó una disminución en la concentración de la clorofila *b* en respuesta al cambio de ambiente (sin embargo, la cantidad de clorofila *a* aumentó, ver Tabla 6, día 5). Este evento se puede explicar por el hecho de que seguramente fue removido y eliminado el LHC2 periférico dado que en él se encuentra la mayor concentración de clorofila *b* (Anderson y Andersson, 1988). Sin embargo, la necesidad de cosechar más luz provocó que las plantas de la especie sintetizaran más pigmentos para tal efecto, lo anterior podría explicar las concentraciones que se obtuvieron en el día 10 del periodo de aclimatación en suelo (Tabla 6). Es decir, se presentó un estrés por el cambio drástico en las condiciones de luz. Las plantas de la especie *E. crenatum* disminuyeron la cantidad de pigmentos cosechadores pero una vez adaptadas a las nuevas condiciones de luz, sintetizaron de nuevo pigmentos que de acuerdo con los resultados debieron ser los que constituyen el LHC2. Este restablecimiento de los elementos concentradores de energía lumínica podría estar en función de las tasas de fotosíntesis que se presentan en las plantas de la especie. El incremento del contenido de clorofila parece corresponder con la atenuación y dispersión de la luz dentro de los tejidos de las plantas (Cui *et al.*, 1991), ya que se presenta una concentración de clorofila, así como una congregación de cloroplastos cerca de la superficie adaxial. Debido a que la proporción de clorofila *a/b* es un indicador del tamaño relativo del complejo cosechador de luz (Cui *et al.*, 1991), los resultados de la Tabla 6 indican que las antenas cosechadoras eran grandes.

En *R. rosea* se observó una disminución muy marcada en la concentración de clorofila (Tabla 6), por lo que es muy probable que se hubiera presentado una fotoinhibición significativa en las plantas (día 5 de Tabla 6). Posteriormente, el aparato fotosintético se restableció ya que las concentraciones de clorofila del día 10 aumentaron (Tabla 6).

En las plantas de *C. silvestrii*, de acuerdo con los resultados, no se presentó fotoinhibición. Al contrario, el cambio de ambiente propició un síntesis cada vez mayor de pigmentos. Estos resultados se debieron seguramente a las características morfológicas de la epidermis de las plantas de cada especie de cactácea, ya que *C. silvestrii* es una especie geofítica y tanto *R. rosea* como *E. crenatum* son epífitas. *R. rosea* es la especie más sensible a la fotoinhibición, le sigue *E. crenatum* y en último término *C. silvestrii*.

Se ha comprobado, en un gran número de experimentos, que las condiciones hídricas son determinantes para el establecimiento de suelo en las plantas obtenidas a partir de cultivos *in vitro*. Los resultados de este trabajo y observaciones realizadas con otras especies de plantas obtenidas también de cultivos *in vitro* demuestran que, posiblemente, la fotoinhibición sea de mayor relevancia. Cuando se transfieren violetas africanas obtenidas de cultivos *in vitro* a suelo -en las cuales las condiciones de agua no son limitantes- varias mueren, dado que se cambian repentinamente de las condiciones de luz en las cuales se originaron (luz de lámparas artificiales en PAR de $40 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a otras condiciones de luz (luz natural de sol indirecta). Por lo que, posiblemente, se requerirá controlar en las plantas, también, la cantidad de luz cuando se realice el cambio de condiciones de cultivo.

La vía metabólica CAM se presentó en las plantas cultivadas *in vitro*, permaneció y se potenció en respuesta al cambio hacia su aclimatación a suelo. Las condiciones de cultivo *in vitro* resultaron de estresantes a muy estresantes para las dos especies de epífitas, pero no para la especie geofítica. Después del cambio de ambiente, los niveles de prolina disminuyeron en las especies epífitas, sin embargo desde el principio del período de oscuridad hasta la mitad del mismo permanecieron altos los niveles de prolina (y por lo tanto de estrés); hacia el final del período de oscuridad disminuyeron considerablemente. En cambio, *C. silvestrii* no se vió afectada por las condiciones de cultivo *in vitro*, ni por el cambio a suelo debido a las características de su epidermis. Este cambio de ambiente también influyó en el funcionamiento y eficiencia de la

fotosíntesis en las plantas de las tres especies de cactáceas, aunque de modo negativo en las dos especies de cactáceas epífitas y en la especie geofítica de modo positivo: en *R. rosea* se presentó el fenómeno de la fotoinhibición y en *E. crenatum* se observó solamente un reajuste en la cantidad de la antena de clorofila y no se presentó el fenómeno de fotoinhibición. Para las plantas de *C. silvestrii* el cambio de ambiente posibilitó aumentar la tasa de fotosíntesis. La influencia de la fotosíntesis en respuesta al cambio ambiental se refleja también en los niveles de acidez titulable que en *C. silvestrii* y *E. crenatum* fueron progresivamente aumentando a lo largo del período de aclimatación en suelo. En cambio, en *R. rosea* se observó un ligero estancamiento en los niveles de acidez titulable que posteriormente se elevó como respuesta al restablecimiento de los niveles de clorofila. Estos niveles de acidez titulable, por otro lado, influyeron en el desarrollo de las plantas de las tres especies de cactáceas en general, lo cual se manifiesta en los niveles también progresivamente mayores de proteínas solubles.

8. CONCLUSIONES.

- Fue posible determinar las concentraciones de las combinaciones hormonales para la generación de brotes axilares en *Rhipsalidopsis rosea*, *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum* en sistemas de cultivo *in vitro*, potencialmente pueden ser propagadas en una escala comercial vía cultivo *in vitro*.
- Es posible minimizar la formación de callo y de brotes vitrificados evitando el contacto de las aréolas y de los brotes axilares producidos con el medio de cultivo.
- La morfología angulosa de los cladodios de *R. rosea* son formas de estrés a diferencia de los cladodios de morfología aplanada. Lo cual explicaría la existencia del tallo dimórfico de la especie.
- La cantidad de asimilados que contiene el explante en las tres especies de cactáceas resultó ser determinante para la obtención rápida de brotes durante el cultivo *in vitro*, principalmente para que éstos alcanzaran longitudes mayores a aquellos brotes obtenidos de explantes con menor cantidad de asimilados y para el ulterior desarrollo normal del sistema radicular así como de la planta (tallo). La cantidad de asimilados está en función del tamaño del explante: mientras más grande sea el explante, mayor cantidad de asimilados contendrá. El uso de explantes de dimensiones mayores para los cultivos *in vitro* de cactáceas, en general, difiere del uso de explantes de dimensiones menores empleados para otros tipos de plantas distintos a la familia de las cactáceas.
- Las plantas obtenidas en cultivo *in vitro* operaron en la vía autotrófica a pesar de que se le suministró una fuente de carbono externa, por lo que la idea de que las plantas cultivadas en estas condiciones presentan una disminución o pérdida total de la actividad fotosintética se descarta en nuestro caso. La potenciación de la fotosíntesis

está en función de las condiciones ambientales a las cuales se expongan los cultivos y principalmente de la especie a que pertenece la planta. Bajo las condiciones de cultivo del experimento se observó una considerable tasa fotosintética en las especies de cactáceas manejadas en este trabajo.

- Aquellos explantes que presentaron la respuesta esperada -en relación con la producción de brotes axilares e índices reducidos de contaminación- en las tres especies de cactáceas fueron obtenidos de las plantas *madre* en los primeros cinco meses del año, después de este tiempo, la obtención de brotes axilares se vio disminuida y la frecuencia de contaminación en los cultivos aumentó en relación con el transcurso del tiempo: explantes obtenidos en los tres últimos meses del año, presentaron mayor índice de contaminación y mayor retraso en la generación de brotes axilares en las tres especies de cactáceas.
- Se verificó la actividad metabólica CAM en las plantas generadas en condiciones de cultivo *in vitro* y permaneció a lo largo de los días en suelo, determinado bajo las condiciones ambientales de los experimentos (*in vivo* e *in vitro*).
- La disminución de la acidez titulable que se presentó al finalizar el periodo de oscuridad en las tres especies de cactáceas, no obstante la continua fijación de CO₂, sugirió que ésta (fijación) ocurrió por la vía del ácido cítrico. Esta vía de fijación se potenció por el tamaño reducido de las vacuolas de las plantas generadas en los cultivos *in vitro* y por las condiciones de temperatura del día con respecto a la noche, junto con la intensidad luminica del experimento (80 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-2}$).
- En las tres especies de cactáceas evaluadas se presentó reciclado de CO₂ bajo las condiciones ambientales del experimento en las cuales se estimó el parámetro ya que la proporción 2:1 de la acidez titulable hacia la fijación de CO₂ no se cumplió.

- El ajuste osmótico en las plantas de las especies *R. rosea* y *E. crenatum* se dió de un modo rápidamente permitiendo el desarrollo de las plantas en la etapa de aclimatación. Este rápido ajuste se presentó debido al tamaño reducido de los tallos de las plantas de cactáceas.
- El cultivo bajo las condiciones *in vitro* resultó estresante para *R. rosea* y *E. crenatum* lo que provocó un desarrollo anormal de éstas y no fue así para *C. silvestrii*. Dado este estado de estrés, las plantas de las mencionadas especies de cactáceas no pudieron desarrollarse y alcanzar las longitudes de *C. silvestrii*. Una vez que el estrés hídrico cesó, el desarrollo de las plantas de las dos especies mencionadas se disparó. Para las plantas de la especie *C. silvestrii* las condiciones manejadas en el cultivo *in vitro* no fueron estresantes, por el contrario, resultaron ser las adecuadas.
- La fotoinhibición que se presentó en las plantas de cactáceas en respuesta al cambio de condiciones de cultivo *in vitro* a la aclimatación a suelo fue importante, más aún que las propias condiciones hídricas del medio en donde las plantas se aclimataron. Por lo que el principal parámetro a controlar y modular en cualquier planta obtenida de cultivos *in vitro* será la cantidad y calidad de luz.
- Los cambios en los parámetros fisiológicos evaluados variaron de acuerdo con las características estructurales y hábitos de las plantas de cada especie de cactácea; éstos últimos están muy relacionados con el ambiente en el que se desarrollan cada especie.
- Por medio de la presente investigación se demostró que las plantas de las especies de cactáceas estudiadas, cultivadas bajo condiciones de cultivo *in vitro*, evidenciaron los parámetros propios del metabolismo ácido de Crasuláceas. Esta investigación pretende ser una contribución pionera que no tiene antecedente en México, así como se pretende es la primera en donde se trabajó con plantas (completas) de la familia de las cactáceas.

Conclusiones.

- Conocer el funcionamiento fisiológico de plantas de especies de cactáceas obtenidas de cultivos *in vitro*, a través de la evaluación del metabolismo ácido de Crasuláceas, proporciona valiosos elementos para el manejo de su cultivo -de forma precisa-, máxime si se desea cultivar alguna especie para propósitos comerciales (como las tres estudiadas en el presente trabajo).
- Se encontraron factores inadvertidos que reclaman un estudio más profundo que contribuirían a describir mejor el funcionamiento vegetal, por lo tanto, en este trabajo da pie a otras investigaciones porque aún es muy vasto lo que se debe conocer sobre el CAM.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, P., Thomas, C.J., Vernon, M.D., Bohnert, J.H., y Jensen, G. 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant cell physiol.* 33(8):1215-1223.
- Altesor, A., Ezcurra, E., y Silva, C. 1992. Changes in the photosynthetic metabolism during the early ontogeny of four cactus species. *Acta Oecologica.* 13(6):777-785.
- Anderson, M.J. y Andersson, B. 1982. The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization. *Trends Biochem. Sci.* 7:288-292.
- Anderson, M.J. y Andersson, B. 1988. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 13: 215-223.
- Anderson, M.J. y Aro E. M. 1994. Grana stacking and protection of Photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: An hypothesis. *Photosynthesis research.* 41:315-326.
- Arnon, D. Y. 1949. Copper enzymes in isolation chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24(1):1-15.
- Ault, J. R. y Blackmon, W. J. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience.* 22(1):126-127.
- Avers, J.C. 1983. *Biología celular.* 2a. de. Grupo Editorial Iberoamérica. México.
- Bailey, H. 1977. *Manual of cultured plants.* Volúmenes I-II. MacMillan. Nueva York.
- Bermejo Guevara Silvia Patricia. 1993. *Ecofisiología de plántulas de Epiphyllum phyllanthus en la isla de Barro Colorado, República de Panamá.* Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM. 88 p.
- Böttcher, K., Zoglauer, K. y Göring, H. 1988. Induction and revision of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 72:560-564.
- Boyle, T. H. 1990. Flowering of *Rhipsalidopsis rosea* in response to temperature and photoperiod. *HortScience.* 25(2):217-219.
- Boyle, T.H., Marcotrigiano, M. y Hamlin, S.M. 1994. Regulating vegetative growth and flowering with gibberellic acid in intact plants and cultured phylloclades of "crimson giant" easter cactus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(1):36-42.
- Boyle, T.H. 1992. Modification of plant architecture in "crimson giant" easter cactus with benzyladenine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(4):584-589.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bravo, H.H. y Sánchez, M. H. 1985. Notas sobre las cactáceas de Mesoamérica. *Cactus y Suculentas de México*. 30(1):12-24.
- Britton, N.L. y Rose, J.N. 1963. The Cactaceae. Descriptions and illustrations fo plants of the cactus family. I-IV volúmenes. Dover Publications, INC., New York.
- Brulfert, J., Mricha, A., Sossountzow, L., y Queiroz, O. 1987. CAM induction by photoperiodism in green callus cultures from a CAM plant. *Plant, cell and environment*. 10(6):443-449.
- Brulfert, J., Guerrier, D., y Queiroz, O. 1973. Photoperiodism and enzyme activity: balance between inhibition and induction of the Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol*. 51:220-222.
- Cheng, H.S., y Edwards, E.G. 1991. Influence of long photoperiods on plant development and expression of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant cell and environment*. 14:271-278.
- Clayton, P.W., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C., y Butler-Nance, S.A. 1990. Micropropagación of member of the Cactaceae subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 115(2):337-343.
- Cockburn, W., Goh, J.C., y Avadhani, N.P. 1985. Photosynthetic carbon assimilation in a shootless orchid, *Chiloschista usneoides* (DON) LDL. A variant on Crassulacean acid metabolism. *Plant physiol*. 77:83-86.
- Cui, M., Vogelmann, T.C. y Smith, W.K. 1991. Chlorophyll and light gradients in sun and shade leaves of *Spinacia oleracea*. *Plant, Cell and Environment*. 14:493-500.
- Cushman, J.C., Michalowski, C.B. y Bohnert, H.J. 1990. Developmental control of Crassulacean acid metabolism inductibility by salt stress in the common ice plant. *Plant Physiol*. 94:1137-1142.
- Dabekaussen, M. A. A., Pierika, R. L. M., Van der Laken, J. D., y Spaans, H. 1991. Factors affeting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Scientia Horticulturae*. 46:283-294.
- Dai, Z., Ku, B.S.M., Zhang, D. y Edwards, E.G. 1994. Effects of growth regulators on the induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta*. 192(3):287-294.
- Doi, M., Oda, H., y Asahira T. 1989. *In vitro* atmosphere of cultured C₃ and CAM plant in relation to day lengths. *Environ. Control Biol*. 27(1):9-14.

- Dougall, D.K. 1980. The use of tissue cultures in studies of metabolism. En: The biochemistry of plants. A comparative treatise. David D. Davies. Volume 2: Metabolism y respiration. Academic Press. London. pp. 627-642.
- Edwards, G. E., y Walker, D. A. 1983. C₃, C₄: Mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. University of California Press. Los Angeles. pp.445-495.
- Escobar, H. A., Villalobos, V. M., y Villegas, A. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. Plant cell, tissue and organ culture. 7:269-277.
- Fay, M.F. y Gratton, J. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropagation at kew. *Bradleya*. 10:33-48.
- Fisher, A. y Kluge, M. 1984. Studies on carbon flow in Crassulacean acid metabolism during the initial light period. *Planta*. 160:121-128.
- Galindo-Fentanes, E. 1988. Biotecnología: oportunidades y amenazas. *Ciencia y desarrollo*. 80. XIV:21-40.
- Gibson, M. 1982. The anatomy of succulence. En: Ting, P. y Gibbs, M. editores Crassulacean acid metabolism. Proceedings of the fifth annual Symposium in Botany. Waverly Press. Baltimore.
- Graf, B. A. 1970. Exotic plant Manual. Roehrs. Nueva Jersey. p. 585, 613-614 y 693.
- Guralnick, L. J., Ting, I. P., y Lord, E. M. 1986. Crassulacean acid metabolism in the Gesneriaceae. *Amer. J. Bot.* 73(3):336-345.
- Haag-Kerwer, A., Franco, C.A., y Luttge, U. 1992. The effect of temperature and lighth on gas exchange and acid accumulation in the C₃-CAM plant *Clusia minor* L. *Journal of experimental botany*. 43(248):345-352.
- Handa, S., Handa, K.A., Hasegawa, M.P., y Bressan, A.R. 1986. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant physiol.* 80:938-945.
- Hanson, D. A. Y Edelman, J. 1972. Photosynthesis by carrot tissue cultures. *Planta*. 102:11-25.
- Hubstenberger, F. J., Clayton, W. P. y Phillip, C.G. 1992. Micropropagation of cacti (Cacataceae). En: Biotechnotogy in agriculture and forestry. Vol. 20. High-Tech an Micropropagation IV. P.S. Bajaj de. Springer-Vexlang. Herdelberg, Berlin.
- Johnson, J. L., y Emimo E.R. 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus and suculent Journal (U.S.)*. 51:275-277.

Jonhson, J. L., y Emino E. R. 1979 (a). *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. HortScience. 14(5):605-606.

Keeley, J. E., y Keeley, S.C. 1989. Crassulacean acid metabolism (CAM) in high elevation tropical cactus. Plant, cell and environment. 12:331-336.

Kennedy, A.R., Barnes, E.J. y Laetsch, M.W. 1977. Photosynthesis in C₄ plant tissue cultures. Plant physiol. 59:600-603.

Kimnach, M. 1951. *Rhipsalidopsis rosea*. Cactus and Succulent society of America. XXIII(2):53-55.

Kluge, M., Bohlke, Ch., y Queiroz, O. 1981. Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Kalanchoë*: changes in intercellular CO₂ concentration during a normal CAM cycle and during cycles in continuous lighth or darkness. Planta. 152:87-92.

Kluge, M., Hell, R., Pfeffer, A., y Kramer, D. 1987. Structural and metabolic properties of green tissue cultures from a CAM plant, *Kalanchoë blossfeldiana* hybr. Montezuma. Plant, cell and environment. 10(6):451-462.

Kluge, M., Fischer, A. y Buchanan-Bolling, C.I. 1982. Metabolic control of CAM. En: Ting, P. y Gibbs, M. editores. Crassulacean acid metabolism. Proceedings of the fifth annual Symposium in Botany. Waverly Press. Baltimore.

Lagerheim, G.V. 1912. *Rhipsalidopsis rosea*. Svensk Botanisk Tidskrift. 6(3):717.

Lazarte, J.E., Gaiser, M.S., y Brown, O.R. 1982. *In vitro* propagation of *Epiphyllum chrysocardium*. Hort Science. 17(1):84.

Leshem, B., Shaley, D.P. y Izhar, S. 1988. Cytocinin as an inducer of vitrification in melon. Annals of Botany. 61:255-260.

Maldonado, V., M. A. 1994. Efecto del medio de cultivo *in vitro* sobre el potencial osmótico y la síntesis de prolina en papa (*Solanum spp.*) L. Tesis de Licenciatura. UNAM-Campus Iztacala, México.

Mandujano, P. M. 1988. Respuesta fotosintética (Metabolismo ácido de las Crasuláceas) en *Escontria chiotilla* (Weber) Rose en ambiente controlado. Tesis de Licenciatura. UNAM-ENEP Iztacala, México.

Mantell, S.H., Matthews, J.A., y Mckee, R.A. 1985. Principles of plant biotechnonology. An introduction to genetic engeneering in plants. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 269 p.

- Martin, M.J. 1966. Cactus and succulent for amateurs. *The cactus and succulent Journal of Great Britain*. 28(1):7.
- Mauseth, D. J., y Halperin, W. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 62(8):869-877.
- Mauseth, D. J. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)*. 51:186-187.
- McLaren, J., y Thomas, D.R. (1967). CO₂ fixation, organic acids and some enzymes in green and colourless tissue cultures of *Kalanchoë crenata*. *New Phytologist*. 66:683-695.
- Medina, E., Olivares, E., Díaz, M., y Van der Merwe, N. 1989. Metabolismo ácido de Crassuláceas en bosques húmedos tropicales. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. Vol. 27. U.S.A. p. 56-67.
- Minocha, S.C. y Mehra, N.P. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria profilera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61(2):168-173.
- Murashige, T., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15:473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- Nobel, P.S., y Hartsock, T. L. 1983. Relationships between photosynthetically active radiation, nocturnal acid accumulation, and CO₂ uptake for a Crassulacean acid metabolism plant, *Opuntia ficus indica*. *Plant Physiol.* 71:71-75.
- Nobel, P.S., y Hartsock, T. L. 1990. Diel patterns of CO₂ exchange for epiphytic cacti differing in succulence. *Physiologia plantarum*. 78:628-634.
- Nobel, P.S., y Hartsock, T. L. 1986. Leaf and stem CO₂ uptake in the three subfamilies of the Cactaceae. *Plant physiol.* 80:913-917.
- Osmond, C.B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29:379-414.
- Rojas, G. M. y Ramírez, H. 1991. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Ed. Limusa-Noriega. México. p. 27-41.
- Salisbury, F. B. y Ross, C.W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica. México. p. 267-270.

Sallonon, H., Dimon, B., Carrier, P. y Chagvardieff, P. 1995. Effects of CO₂ concentration and irradiance on growth and photosynthesis of *Juglans regia* plantlets grown *in vitro*. *Photosynthetica*. 31(2):241-249.

Sanderson, K. C., Ho, Y.-S., Martin, W. C., y Reed, R.B. 1986. Effect of photoperiod and growth of three *Cacataceae*. *HortScience*. 21(6):1381-1382.

Seeni, S., y Gnanam, A. 1980. Photosynthesis in cell suspension cultures of the CAM plant *Chamaecereus silvestrii* (*Cacataceae*). *Physiologia plantarum*. 49:465-472.

Shields, M. 1963. Desert flowers under glass. *Cactus and Succulent society of America*. XXXV(1):19-21.

Shields, M. 1962. Desert flowers under glass. *Cactus and Succulent society of America*. XXXIV(2):53-56.

Spegazzini. 1905. *Cereus silvestrii*. *Anales del Museo Nacional de Buenos Aires*. III(4):483.

Steinhart, C.E. 1962. Tissue culture of a cactus. *Science*. 137(3529):545-546.

Starling, R. J. y Dodds, J. H. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya*. 1:84-90.

Stuppy, W. y Nagl, W. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw (*Cactaceae*) via somatic embryogenesis. *Bradleya*. 10:85-88.

Thomas, J.C., De Armond, R. L., y Bohnert H.J. 1992. Influence of NaCl on growth, proline, and phosphoenlpyruvate carboxilase leves in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol*. 98(2): 626-631.

Ting, P. I. 1985. Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 36:595-622.

Ting, P. y Gibbs, M. editores 1982. Crassulacean acid metabolism. *Proceedings of the fifth annual Symposium in Botany*. Waverly Press. California.

Ting, P.I. y Rayder, L.. 1985. Regulation of C3 to CAM shifts. En: *Crassulacean acid metabolism. Proceedings of the fifth annual Symposium in Botany*. Ting, P. y Gibbs, M. editores. Waverly Press. California. p.193-209.

Trager, J.M. 1985. Cacti and succulents for amateur. *Cactus and succulent Journal (U.S.)*. 57(3):112.

Tran Thanh Van, M.K. 1981. Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 32:291-311.

Vidalie, H. 1986. Cultivo *in vitro*. Editorial Cientifica. México. pp. 168-169.

Treichel, S. 1986. The influence of NaCl on pyrroline-5-carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum nodiflorum* and other halophytes. *Physiol. Plant.* 67:173-181.

Vyskot, B., y Jára, Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science.* 59(3):449-452.

Wilkins, M. B., y Holowinsky, A. W. 1965. The occurrence of an endogenous circadian rhythm in a plant tissue culture. *Plant Physiology.* 40:907-909.

Winter, K., Schroppe-Meier, G., y Caldwell M.M. 1986. Respiratory CO₂ as carbon source for nocturnal acid synthesis at high temperatures in three species exhibiting Crassulacean acid metabolism. *Plant physiology.* 81: 390-394.

Winter, K. 1985. Crassulacean acid metabolism. En: *Photosynthetic mechanisms and environment.* Capítulo 8. Edited J. Barber y N.R. Baker. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), pp. 299-387.

10. Agradecimientos y dedicatoria.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Campus Iztacala.

A mi asesor de tesis: Gerardo Ortiz Montiel.

A mis sinodales: Biól. Antonia Trujillo Hernández, Biól. Rita Flores León, M. en C. Ernesto Aguirre León y Biól. Manuel Mandujano Piña.

Al Jardín Botánico del Campus Iztacala.

A la M. en C. Beatriz Pérez Armendaris, Biól. Sergio Rosales, M. en C. Josefina Vázquez y Biól. Elias Piedra.

A la Biól. Yolanda Origel.

A la Biól. Mónica Pérez y a la generosa familia Pérez Villafaña.

A la Biól. Norma González.

A mis compañeros.

Agradecimientos especiales para Edwin Alcántara, para mis padres Olga Gutiérrez y Bonifacio Garrido, mi hermana Olga Garrido y también al M. en C. Ernesto Aguirre León.

Este trabajo está dedicado a Edwin Alcántara.