



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE FUENTES Y NIVELES DE
NITROGENO EN EL CULTIVO
in vitro de *Gladiolus sp.*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
ALFONSO AVELINO TIBURCIO

ASESOR: MC. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación de fuentes y niveles de nitrógeno en el cultivo in vitro de Gladiolus sp."

que presenta el pasante: Alfonso Avelino Tiburcio
con número de cuenta: 8227030-6 para obtener el título de :
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de mayo de 2002

PRESIDENTE	<u>Ing. Gustavo Ramirez Ballesteros</u>	
VOCAL	<u>M.C. Ofelia Magdalena Grajales Muñoz</u>	
SECRETARIO	<u>M.C. Francisco Cruz Pizarro</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. Gloria Solares Díaz</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Consuelo Paniagua Cruz</u>	

DEDICATORIAS

A mis queridos padres Alfonso y María de Jesús, por haberme dado la vida, por haberme enseñado el camino de la verdad, el respeto y la honradez, pero principalmente a ti mamá que siempre me has apoyado desinteresadamente, por tu infinito amor de madre con el que has sabido forjar al hombre que soy.

A mi amada esposa Lucy, con quien comparto mis logros y mis fracasos, quien a sabido comprender mis virtudes y mis defectos, quien ha estado conmigo en las buenas y en las malas, sin cuya ayuda, comprensión y sacrificio no habría sido posible lograr esta meta, quien es y seguirá siendo la mujer que yo amo.

A mi pequeño hijo, Yael Alfonso, por quien sigo y seguiré luchando y superándome, para quien deseo ser un ejemplo de perseverancia, a quien a pesar del tiempo siempre será mi pequeño.

A mi hermano Raymundo, a su esposa y a sus hijos, quienes siempre me han apoyado, quienes me han dado ánimos y consejos para seguir adelante, quienes siempre han estado en lugar y en el tiempo justo cuando los he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi infinita gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha dado la oportunidad de terminar una carrera dentro de sus aulas, que me ha dado la educación que no todos pueden tener y que ha depositado en mi toda su confianza para que hoy ejerza mi profesión con orgullo y dignidad.

A los Maestros Francisco Cruz Pizarro y Roberto Guerrero Algama, que gracias a sus consejos y observaciones oportunas, he podido realizar este trabajo.

A mis amigos y compañeros, que de alguna forma han contribuido conmigo para lograr esta meta.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VII
I INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	5
Hipótesis.....	6
II REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	7
2.1 Generalidades del gladiolo.....	7
2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica.....	9
2.2 Propagación del gladiolo.....	10
2.2.1 Calidad de la flor de corte.....	14
2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	17
2.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gladiolus</i>	19
2.3.1.1 Medio de cultivo.....	25

2.4	Importancia del nitrógeno en el cultivo <i>in vitro</i>	27
2.4.1	Requerimiento de nitrógeno.....	28
2.4.2	Absorción de nutrimentos.....	38
2.4.2.1	Variación de absorción de solutos con respecto a su concentración.....	41
2.4.2.2	Transporte pasivo y activo.....	43
2.5	Absorción y transporte del nitrógeno en la planta.....	44
2.5.1	Absorción y asimilación de nitrato.....	46
2.5.2	Absorción y asimilación de amonio.....	49
2.6	Fuentes de nitrógeno.....	52
2.7	Otras fuentes de nutrición mineral.....	53
2.7.1	Calcio.....	53
2.7.2	Potasio.....	54
III	MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1	Ubicación del experimento.....	57

3.2	Material vegetal.....	57
3.3	Medio de cultivo.....	57
3.4	Condiciones ambientales.....	59
3.5	Brotación y proliferación de los explantes.....	59
3.6	Variables de estudio.....	59
3.7	Diseño experimental y análisis estadístico.....	61
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
1.	Número de brotes y número de cormillos neoformados.....	67
2.	Número de hojas	70
3.	Longitud de hojas.....	73
4.	Formación y longitud de raíces.....	76
5.	Diámetro de cormillos neoformados	79
V	CONCLUSIONES	82
	BIBLIOGRAFÍA	84
	ANEXO	97

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO

1. Clasificación de gladiolo desarrollados por la Asamblea Norteamericana de Gladiolos.....	13
2. Clasificación de flor de corte utilizada en florida por los floricultores comerciales de gladiolos.	15
3. Clasificación del tamaño de la flor en gladiolos según la Asamblea Norteamericana de Gladiolos.	15
4. Clasificación del color de la flor en gladiolos según la Asamblea Norteamericana de Gladiolos.....	16
5. Medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000).....	58
6. Tratamientos con las tres fuentes de nitrógeno empleadas y sus diferentes niveles en mM.....	61
7. Comparación de medias para la variable número de brotes (V1) y cormillos neoformados (V2) a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolos	70
8. Comparación de promedios para la variable número de hojas (v3) a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo.....	73
9. Comparación de promedios para la variable longitud de hojas (v4) a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo.....	76

10. Comparación de promedios para la variable número de raíces brotadas (v5) y longitud de raíces (v6) a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo.....	78
11. Comparación de promedios para la variable diámetro de cormillos (v4) a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo.....	81
12. Análisis de varianza para la variable cormillos brotados.....	97
13. Análisis de varianza para la variable cormillos neoformados.....	97
14. Análisis de varianza para la variable número de hojas.....	98
15. Análisis de varianza para la variable longitud de hojas.....	98
16. Análisis de varianza para la variable número de raíces.....	99
17. Análisis de varianza para la variable longitud de raíces.....	99
18. Análisis de varianza para la variable diámetro de cormillos.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA

1. Corno de gladiolo	12
2. Nuevos cormos y cormillos.....	12
3. Forma correcta de plantación de cormillos.....	13
4. Influencia de la concentración de iones en la proximidad de las células vegetales sobre la velocidad y captación de iones.....	42
5. Número promedio de brotes por cormillo y cormillos neoformados en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo.....	69
6. Número promedio de hojas formadas a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo	72
7. Número promedio de longitud de hojas formadas a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo.....	75
8. Promedio de número de raíces formadas a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo	78
9. Promedio de longitud de raíces formadas a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo	79
10. Promedio de diámetro de los cormillos neoformados a partir del explante en el cultivo <i>in vitro</i> de gladiolo.....	80

I INTRODUCCIÓN

El gladiolo (*Gladiolus sp*) es una especie perteneciente a la familia de las Iridáceas, este grupo consiste de alrededor de 200 especies (Lewis, *et al.*, 1972). Sus cormos perennes son principalmente nativos de Sudáfrica, aunque algunas fueron encontradas en estado silvestre en el oeste y centro de Europa, al suroeste del Mediterráneo, Asia central y centro de África (Buch, 1972. Lewis *et al.*, 1972. Willfret, 1980).

El cultivo *in vitro* ha permitido la propagación de numerosas especies vegetales para la formación de brotes provenientes de yemas axilares y brotes adventicios, estos últimos originados del tejido de callo que prolifera en la base del explante, y que posteriormente puedan enraizar.

Los factores que influyen en el desarrollo de tejidos que se cultivan *in vitro* son de gran importancia, pues la capacidad organogénica de los explantes depende de estos. Tal es el caso de la calidad de los explantes, el medio de cultivo, y el medio ambiente. Se enumeran: factores físicos (luz, temperatura, humedad, cámara de cultivo etc.), factores químicos (sales inorgánicas en el medio de cultivo), y factores biológicos (hormonas del desarrollo vegetal, elementos orgánicos, etc.)

Dentro de estos factores, la organogénesis vegetal puede ser afectada por el medio de cultivo empleado, particularmente en la formulación, fuentes de carbohidratos y

hormonas del desarrollo vegetal. Concentraciones de algunas o todas las sales en el medio pueden influenciar en la formación de brotes (Van der Linde *et al.*, 1988; Van der Linde y Schipper, 1992).

Para el éxito en el cultivo de tejidos es necesario tener un óptimo medio de cultivo, en general el que más se utiliza en la propagación *in vitro*, es el MS (Murashige y Skoog, 1962) donde se emplea una alta concentración de nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) en relación con el nitrato (NO_3^-) en una proporción de 1:2, a una concentración total de 60 mol m^{-3} de nitrógeno. Sin embargo, no existen estudios en la mayoría de las especies que demuestren las bases fisiológicas para el empleo de estas concentraciones.

Las plantas absorben nitrógeno en cuatro formas diferentes: como nitrato, en forma de amonio, como compuesto orgánico (aminoácido) y como urea. El nitrato es la forma más abundante de nitrógeno utilizable y la fuente más importante. El amonio es relativamente abundante, principalmente donde ocurre fijación, sin embargo, es tóxico en su forma NH_4^+ , y su absorción en grandes cantidades puede imponer un esfuerzo severo al metabolismo de los carbohidratos (Salisbury y Ross 1994). Una vez absorbido el nitrato por la planta, es reducido a amonio y este es seguidamente incorporado a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos (Azcom y Talon, 1996). El nitrato participa en la fotorrespiración, la degradación de proteínas, actúa como inductor de síntesis de proteínas, entre otras. En las células vegetales el amonio se genera no solo en la reducción del nitrato sino también en la fotorrespiración, el catabolismo de las proteínas o la fijación del nitrógeno molecular (Azcom-Bieto y Talon, 1996).

Las plántulas y plantas muy jóvenes tienden a absorber amonio en forma diferente, en tanto que las maduras absorben nitrato, esto puede estar relacionado con la mayor abundancia de carbohidratos y poder reductor en la planta madura con activa fotosíntesis (Bidwell, 1979) . Como el nitrógeno está presente en muchos compuestos esenciales, no es sorprendente que el crecimiento sea lento sino se añade, y las plantas muestran síntomas de deficiencia que consisten en clorosis general (Salisbury y Ross, 1994).. Las fuentes y concentraciones de nitrógeno son de los factores más relevantes puesto que es el nutrimento que los tejidos demandan en mayor proporción.

Este factor se manifiesta en diversos desordenes o alteraciones morfológicas y fisiológicas, relacionado a su vez con la asimilación de formas reducidas de nitrógeno y una reducción en el contenido de clorofila, que impide el desarrollo normal de los explantes y órganos neoformados (Ziv, 1991). También las plántulas de diversas especies cultivadas *in vitro* muestran algunas modificaciones en sus procesos fisiológicos, bioquímicos, anatómicos y morfológicos relacionados con factores microambientales y asimilación de algunos nutrientes que se presentan en el contenedor de cultivo *in vitro*.

El cultivar Gladiolo (*Gladiolus s.p.*), es una planta de gran valor ornamental por su belleza, y de suma importancia en el ámbito comercial, pues en los últimos años se han desarrollado hibridaciones registrando miles de cultivares nuevos. Sin embargo, hay varios de ellos que han persistido por muchos años como flor de corte, debido a su gran demanda por la calidad de sus flores requeridas en el mercado, por lo que su cultivo

extensivo ha llevado a mejorar las técnicas de propagación y mejoramiento. Su propagación mediante la técnica de cultivo *in vitro* se describe en este trabajo, así mismo, se evalúa la respuesta relacionada con requerimientos nutrimentales en el medio de cultivo de cinco proporciones de NH_4^+ : NO_3^- , en la formación de brotes y raíces para estudiar los cambios morfológicos durante su organogénesis *in vitro*.

OBJETIVOS

1. Evaluar diferentes proporciones de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en el cultivo *in vitro* de brotes de *Gladiolus sp.*
2. Determinar el crecimiento de los brotes de *Gladiolus sp.* de acuerdo a las diferentes proporciones de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ propuestas.
3. Determinar la mejor proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ para el mejor desarrollo de los brotes de *Gladiolus sp. in vitro.*

HIPÓTESIS

El nitrógeno es un elemento nutritivo que tiene una actuación directa en la formación de compuestos orgánicos, por tanto, al incrementar su concentración en el medio de cultivo *in vitro* se obtendrá mejor crecimiento del explante y se incrementará el número de brotes a partir de éste.

Al ser el amonio (NH_4^+) la forma asimilada más directa de N por la planta, si se incrementa su concentración puede causar toxicidad al explante, por tanto, al aumentar la de NO_3^- con relación al NH_4^+ se tendrá mayor calidad de brotes.

II REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Generalidades del Gladiolo

El nombre gladiolo proviene del Latín *Gladius*: espada y fue sugerido por Pliny, quien lo describió por la forma parecida a espadas de sus hojas (Salunkhe et al., 1990).

Larson (1988), menciona que la comprensión del desarrollo del gladiolo es complicada, pues muy pocas flores se parecen al ancestro complejo del *Gladiolus*. Lewis et al. (1972), indica que estas especies se identificaron hace mas de 2000 años en el Asia Menor y las llamaron "lirios de maíz". Sin embargo, Buch (1972); Willfret (1980), aseguraron que este genero se origino en el Mediterráneo y en el sur de África, incluyendo alrededor de 180 especies con mas de 10,000 cultivares. Muchas otras especies son usadas como flores de jardín.

Desde hace aproximadamente 500 años son cultivadas las especies europeas, y hasta 1730 las principales especies de jardín derivaban de *Gladiolus communis*, *G. segetum*, *G. byzantynus* (Larson, 1988). A partir de especies compatibles como *cummunis*, *carneus*, y *cardinalis*, se crearon muchos híbridos naturales (Buch, 1972). Se conoce que la cruce que origino el gladiolo actual se hizo en 1837 por H. Bedinghaus de Bélgica, quien polinizo *G. natalensis* (psittasinus) con *G. oppositiflorus*, dando como resultado los híbridos *Gandavenesis*

A partir de 1870, se empezaron a utilizar los gladiolos en Norteamérica como flor de corte. Luther Burbank desarrollo los primeros cultivares resistentes a las condiciones atmosféricas del nuevo continente. Pero la industria de los gladiolos tuvo su auge solo hasta el año de 1950 y su demanda ha ido reduciéndose constantemente (Wilfret, 1980). A pesar de esto, muchas cruza e híbridos, han dado gran belleza a los jardines y los arreglos florales.

Estas flores tienen muchas variaciones en color, con atractivos colores oscuros y carmesí, rosa, salmón, rojo, escarlata, púrpura, crema y combinaciones de estos, incluso pigmentados en el centro de los pétalos.

Zip y Lilien-Kipnis (1990) señalaron que el gladiolo es un cultivo de alto valor ornamental, es cultivado en gran parte del mundo por sus flores para corte y por sus cormos. Desde la mitad de los años 1970, se ha venido declinando severamente la producción de puntas de gladiolo, no por su falta de demanda en el mercado, sino por los altos costos de producción provocados por las enfermedades virales y otras.

El incremento en la demanda de flores de calidad, las técnicas de cultivo de meristemas *in vitro* (Logan y Zettler, 1985), y micropropagación (Zip y Lilien-Kipnis, 1990) pueden mantener un continuo cultivo libre de enfermedades y alta nutrición de las ahora novedosas variedades. La formación de cormos *in vitro* por medio de los brotes micropropagados puede simplificar los pasos en la micropropagación.

2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica

El género *Gladiolus* pertenece a la familia *Iridaceae*, es una planta herbácea considerada como geophyta (Ziv y Lilien-Kipnis, 1990). Lewis *et al.*, (1972), menciona que este género está representado por 180 especies. Existen más de 10,000 cultivares de los cuales 20 son comerciales para producción de flor (Ziv y Lilien-Kipnis, 1990). Dos especies son endémicas de Madagascar y 15 se encuentran en países alrededor del Mediterráneo. Uno de los híbridos más modernos es *G. grandiflorus*, con cuando menos 11 especies, representados por diferentes colores o variedades botánicas (Wilfret, 1980). El gladiolo es una planta que se desarrolla de botones axilares en un cormo con un tallo succulento que actúa como soporte (Wilfret, 1980; Ziv y Lilien-Kipnis, 1990). Sus hojas se superponen en la base pudiendo ser de 1 a 12, su inflorescencia es una espiga originada como eje terminal, llegando a formar hasta 30 florecillas o más, con partes florales de tres en tres. Cada florecilla está encerrada en dos valvas verdes con espátas y su pistilo consiste en un estigma de tres lóbulos, con un estilo simple no ramificado con ovario ínfero. En la cápsula se albergan de 50 a 100 óvulos, los cuales maduran 30 días después de la fertilización. Florecillas bilaterales o radiales (Wilfret, 1980).

Las flores pueden ser de cualquier color, exceptuando el azul, sin embargo, algunos tonos violetas se asemejan casi al azul. Las florecillas pueden ser redondas, triangulares, aplanadas, con capuchón o como orquídeas, con pétalos sencillos, rizados, filamentosos, recurvados, puntiagudos o profundamente arrugados, florecillas que varían

de 2 cm. de diámetro a muy espaciadas, en tallos delgados, sencillos o con muchas ramas, hasta gigantes de 2 metros con florecillas de 18cm. de diámetro (Wilfret, 1980).

Los cormillos nuevos se forman anualmente por la protuberancia de la base de los internudos de la inflorescencia, antes o durante la floración, esto es encerrado por las hojas, que en la maduración comienzan a secarse en forma de escamas de papel, convirtiéndose a su vez en el cormo. Se desarrollan dos tipos de hojas de los brotes activos localizados en los nudos superiores del cormo: hojas encapsuladas y hojas verdaderas, frecuentemente amontonadas de 10 a 12 hojas, respectivamente. La raíz primaria localizada en la base del cormo forma el primer sistema de raíces adventicias. Las raíces secundarias se desarrollan durante la floración, en el cormo que se está desarrollando nuevamente (Ziv y Lillien- kipnis., 1990).

Numerosos estolones son ramificados, orientando los cormillos hacia las puntas, desarrollados del nódulo basal del cormo hija durante la floración. Un solo cormo es capaz de producir de 50 – 200 cormillos dependiendo del cultivar y condiciones de cultivo (Griesbach, 1972).

2.2 Propagación del gladiolo

Los cultivares de gladiolo son propagados por cormos y cormillos (figura 1). Las semillas solo se utilizan para la producción de nuevas variedades (Ziv y Lillien-Kipnis,

1990). Los gladiolos se propagan a partir de cormillos que crecen en racimos entre los cormos madre e hija (figura 2), estos cormillos se clasifican en: diámetro grande mayor o igual a 1.0 cm. de diámetro; mediano, de 0.6 a 1.0 cm. de diámetro; y pequeño, menor de 0.6 cm. de diámetro (cuadro 1). Sin embargo, la mayoría de los floricultores utilizan solo cormillos grandes para la reproducción de plantas madre, estos deben seleccionarse cuidadosamente y estar libres de posibles infecciones o desarrollo de plagas, además se les debe tratar con una solución de agua caliente para erradicar hongos (Forsberg, 1961; Millholand y Aycock, 1965), a esta solución se le han adicionado fungicidas para complementar la acción del agua caliente (Magie, 1971; Magie y Poe, 1972). Los cormillos permanecen inmersos durante 30 minutos, estos son preparados con benomil ($0.1 \text{ Kg } 100 \text{ L}^{-1}$ de agua) adicionando captan ó tiram ($0.18 \text{ Kg. } 100 \text{ L}^{-1}$) a $53\text{-}55^{\circ}\text{C}$. Estos cormillos previamente debieron estar enterrados durante los meses cálidos y almacenados de 24° a 32°C por 8 semanas. Los cormillos se cubren con agua templada con el fin de ablandar las cubiertas. Los cormillos que floten se descartan. Después de ser tratados se secan con aire, se colocan en capas delgadas en charolas esterilizadas y se almacenan a temperatura de 2° a 4°C hasta que se plantan. Por la latencia que tienen los cormillos, necesitan de aproximadamente cuatro meses. La hinchazón de las yemas radiculares indica la oportunidad de plantar los cormillos. Se recomienda remojar los cormillos dos días antes de la plantación con el fin de asegurar una brotación uniforme (Wilfret, 1980). La plantación depende del tamaño del cormo y el tipo de suelo en que se haga, por lo general se debe enterrar a una profundidad de dos a cuatro veces su tamaño y con la punta del cormo hacia arriba (figura 3).



Fig. 1. Cormo de gladiolo

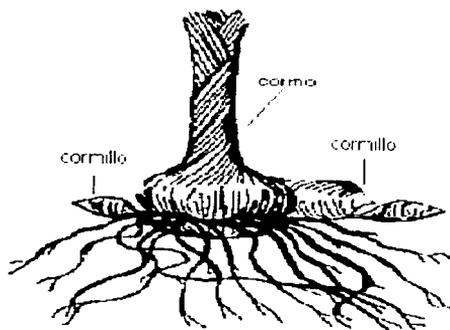
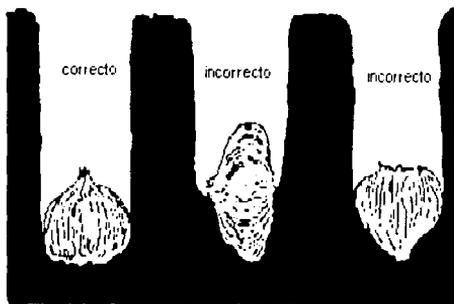


Fig. 2. nuevos cormos y cormillos



fuelle: Greving, 1992.

Fig. 3. forma correcta de plantación de cormillos .

Cuadro 1. Clasificación de cormos de gladiolo desarrollados por la Asamblea Norteamericana de Gladiolos.

Descripción		Tamaño (diámetro en cm.)
Grande		
Gigante	Patrón para plantas de	Mayores a 5.1
No. 1	Producción de flor.	Mayores de 3.8 hasta 5.1
Mediano		
No. 2	Patrón para plantas de	Mayores de 3.2 hasta 3.8
No. 3	Producción de flor.	Mayores de 2.5 hasta 3.2
Pequeño		
No. 4	Patrón para plantas de	Mayores de 1.9 hasta 2.5
No. 5	De producción de planta.	Mayores de 1.3 hasta 1.9
No. 6		Mayores de 1.0 hasta 1.3

(Fuente: Wilfret, 1980)

2.2.1 Calidad de la Flor de Corte.

La longitud de la espiga, el número, talla, forma y color de la flor, peso y longitud de la cabeza de la flor, son algunos criterios usados para la determinación de la calidad de los gladiolos de corte. Fuera de estas consideraciones, la longitud o talla de las espigas es más comúnmente buscada para gladiolos grandes.

Otras consideraciones que se toman en cuenta para la calidad de poscosecha son:

1.- Las flores deben ser uniformemente espaciadas a lo largo del tallo, en proporción a la longitud del tallo. La inflorescencia debe tener balance entre el desarrollo y la maduración de los brotes al momento de la venta.

2.- Las flores deben tener turgencia, libre de lesiones y deben presentar su cara en una sola dirección. Al abrir las flores deben ser uniformes.

3.- Los brotes florales deben ser fuertes, rectos, y la longitud acorde al cultivar.

4.- La forma y talla de la flor debe ser representativa del cultivar. Deben abrir despacio.

Wilfret (1970), menciona que las espigas se seleccionan en cuatro clases en base a la calidad general, longitud de la espiga y número de florecillas (Cuadro 2). Al clasificarse se agrupan de diez en diez y se amarran con ligas. Posteriormente se mantienen almacenadas verticalmente a bajas temperaturas (4 - 6° C.) hasta su empaque.

Las espigas se mantienen en preservador floral para evitar desecación antes y después de la selección. Se ha aplicado sacarosa de 7 a 10 días antes del almacenamiento dando como resultado una mayor abertura de la flor (Mayak *et al.*, 1973; Bravdo *et al.*, 1974; Kofranek y Halevy, 1976).

Cuadro 2. Clasificación de flor de corte utilizada en florida por los floricultores comerciales de gladiolos.

Clase	Longitud de la espiga cm.	Número de florecillas (mínimo)
Superior	Mayor a 107	16
Especial	De 96 a 107	14
Estándar	De 81 a 96	12
Corriente	Menor de 81	10

Fuente: Wilfret (1980).

Cuadro 3. Clasificación del tamaño de la flor en *Gladiolus* según la Asamblea Norteamericana de Gladiolos (The North American Gladiolus Council).

Clase ^a	Designación	Tamaño de la florecilla cm.
100	Miniatura	Menor de 6.4
200	Pequeño	De 6.4 a 8.9
300	Decorativo	De 8.9 a 11.4
400	Estándar o Grande	De 11.4 a 14.0
500	Gigante	Mayor de 14.0

Fuente: Wilfret (1980)

Cuadro 4. Clasificación del color de la flor en *Gladiolus* según la Asamblea Norteamericana de Gladiolos (The North American Gladiolus Council).

Color ^a	Pálido	Ligero	Medio	Fuerte	Otro
Blanco	00				
Verde		02	04		
Amarillo	10 ^c	12	14	16	
Naranja	20	22	24	26	
Salmón	30	32	34	36	
Rosado	40	42	44	46	
Rojo	50	52	54	56	58 Rojo negro
Rosa	60	62	64	66	68 Rosa negro
Lavanda	70	72	74	76	78 púrpura
Violeta	80	82	84	86	
Ahumados		92	94	96	
Tostado	90				98 Café

Fuente: Wilfret (1980)

Los cultivares de gladiolo se clasifican por tres dígitos (cuadro 3 y 4), estos están clasificados en 5 categorías que indican su talla.

^aEl primer dígito indica el tamaño de la florecilla en las cinco clases.

^bLos dos últimos dígitos indican el color de la florecilla y el tono. Un último dígito impar indica una marca*.

^cIncluye el color crema.

*Conspicua o manchón.

2.3 Cultivo *in vitro*

Al hablar de cultivo, nos referimos a cultivar en un medio donde las plantas puedan subsistir y desarrollarse, ya sea en macetas, jardines, invernaderos, o en el campo. Según Pierik (1990), en 1904, Hännig desarrollo un método de cultivo de plantas al que llamo cultivo de embriones, cultivó *in vitro* algunos miembros de las Crucíferas, de los cuales obtuvo plántulas viables. Nobécourt, Gautheret y White, en 1939, consiguieron el primer cultivo de tejidos en callo. Pero solo hasta después de la Segunda Guerra Mundial se comenzó a desarrollar con mayor auge y rapidez, y se han publicado numerosos artículos con resultados importantes para la agricultura, silvicultura y horticultura (Pierik, 1990).

El cultivo *in vitro*, se definió como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores, caracterizadas porque ocurren a micro-escala en una superficie relativamente pequeña. Mediante el cultivo *in vitro* se optimizan las condiciones ambientales, los factores físicos, nutricionales y hormonales, excluyendo microorganismos de tipo infeccioso tales como hongos, bacterias y virus, así como plagas de insectos, nemátodos y vertebrados (Pierik, 1990). Por estas razones, el cultivo *in vitro* se ha considerado que juega un papel muy importante en la producción de plantas a gran escala y en menos tiempo que las plantas cultivadas *in vivo*.

Durante los últimos 20 años algunos reportes han descrito la micropropagación de Gladiolos. Además, el trasplante de vegetales a campo cultivadas por tejidos, tiende a ser un buen método que esta mejorando al reducir el tiempo de cultivo, y obteniendo mayor aceptación en la comercialización de plantas de Gladiolos bajo propagación *in vitro* (Dantu y Bhojwanni, 1995)

La aplicación del cultivo *in vitro* en especies en peligro, además, es una técnica que puede ser adoptada bajo diferentes circunstancias (Malda y Backhaus, 1999). La regeneración de plantas *in vitro* es un método genético conservativo de propagación que tiene que ser usado extensivamente con especies raras y en peligro de extinción (Fillipini *et al.*, 1994)

Algunos autores han sugerido la posibilidad de ampliar las bases genéticas de especies que inducen variación somoclonal *in vitro* como un método de generación de nuevo vigor dentro de poblaciones naturales de especies en peligro (Bramwell, 1990; Fillipini *et al.*, 1994).

Los requerimientos en ambiente húmedo, sustrato rico en nitrógeno, y una aplicación externa en las fuentes de auxinas podrían ser fácilmente adaptados bajo condiciones de invernadero (Malda y Backhaus, 1999), estos tipos de prácticas podrían ayudar a obtener mejores y vigorosas plantas al recuperar o introducir programas de propagación.

En el cultivo de las plantas *in vitro*, donde precisamente las condiciones de cultivo pueden ser controladas, esta empezando cada vez mas a diseminarse con una gran importancia en la micropropagación comercial de un gran rango de plantas, en la regeneración y propagación de nuevos materiales producidos por métodos de cultivos de tejidos (Lumsden *et al.*, 1990).

2.3.1 Cultivo *in vitro* de *Gladiolus*

Sin duda, los cultivos ornamentales son el grupo de plantas por excelencia, donde la micropropagación ha tenido un tremendo impacto, histórica, científica y económicamente. Probablemente sea por el alto valor comercial que adquiere el producto al final de su proceso productivo. Incluso, dentro de este grupo, las plantas con bajo valor son propagadas con este método, pero con menos frecuencia (Capellades *et al.*, 1991)

En años recientes se ha considerado interesante el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos para la rápida propagación de reservas sanas de cormos y nuevos cultivares (Hussey, 1977).

La técnica de cultivo de tejidos ha sido aplicada a la propagación de bulbos y cormos en varias especies, donde se incluyen numerosos miembros de la familia de las Iridáceas (Hughes, 1981). La propagación de gladiolos mediante el cultivo *in vitro* se ha venido dando a través de varios órganos y tejidos en diferentes medios de cultivo, los

cuales, tienden a ser una forma para sustituir la regeneración de plantas (Amirato, 1990).

Wilfret (1980) utilizó el medio de cultivo MS adicionado con ácido naftalenacético y kinetina (ANA 26.9, 53.8 μM ., Kin 2.3 μM .) donde utilizó inflorescencia de tallo, obtuvo morfogénesis de callo, raíz y hojas en *Gladiolus*. Consiguió callos, raíces y hojas al emplear únicamente puntas de hojas para propagación en un medio MS con hormonas del desarrollo vegetal.

Hussey (1977) y Sutton (1978), utilizaron brotes de cormos en medio de cultivo MS, de donde obtuvieron como resultado la formación de hojas axilares al emplear meristemos para su propagación, la respuesta a la morfogénesis fueron cornillos y desarrollo de plantas. Utilizaron cormos axilares extirpados de cormos de tres cultivares híbridos de gladiolos y fueron cultivados en medio nutritivo conteniendo varios niveles de bencilaminopurine (BA) para evitar la dormancia y para promover el crecimiento de brotes y la inhibición de desarrollo de raíces.

Ziv (1979) propagó *in vitro* plantulas de *Gladiolus* cv "Eurovisión" en un medio de cultivo bajo en minerales y sacarosa, con alta intensidad de luz, desarrollando raíces funcionales, y posteriormente fueron transplantadas en condiciones no asépticas, continuando su crecimiento sin mantener dormancia. De todos los explantes cultivados, los segmentos de los tallos y flores jóvenes mostraron máxima proliferación,

pero con un potencial limitado para la regeneración. Sin embargo, la producción de explantes por cormelo que se obtuvo, lo consideró como un incremento significativo comparado con la producción en vivo de una planta por cormelo.

Algunos brotes adventicios han sido inducidos en explantes con inflorescencia de tallo, y los brotes axilares y adventicios pueden ser inducidos en pequeños brotes axilares o puntas de hojas de explantes. La corta dormancia de los cormos desarrolla un buen número de brotes en el borde superior medio del cormo (Sutter, 1986).

Bajaj, *et al.* (1983) estudiaron algunos de los factores que afectan la propagación *in vitro* de *Gladiolus*, donde obtuvieron la formación de callos a partir de segmentos de inflorescencia, flores con tallo, y segmentos de hoja de dos cultivares de *Gladiolus grandiflorus*. La mejor proliferación de callos derivaron de los segmentos de flores con tallo. Los callos fueron periódicamente revisados y mantenidos en un medio nutritivo en el que la concentración de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) se bajo de 2 mg l⁻¹ a 1 mg l⁻¹ y adicionando varias combinaciones y concentraciones de AIA (ácido indole-3-acético 2 mg l⁻¹), K (kinetina 0.5 mg l⁻¹), ANA (ácido naftaleno acético 10 mg l⁻¹), se obtuvo mejor respuesta en el tratamiento ANA/KIN (10/0.5 mg l⁻¹). Mencionaron que es necesario cultivar segmentos de cormelos para obtener mas de un brote por cormelo. De este modo concluyen que debido al refinamiento en la técnica y la manipulación del medio de cultivo, el número de plantas regeneradas de varios segmentos de un cormelo pueden incrementarse.

Ziv (1989), cultivó gladiolos *in vitro*, sustituyó daminozide, ancymidol, paclobutrazol y uniconazol por un agar solidificado para su propagación. Los cultivos proliferaron dentro de los tubos de vidrio en un masivo agregado de brotes sin hojas, y más tarde formaron cormillos. Los cormillos no tuvieron dormancia, y fueron transplantados en macetas dentro de un invernadero para el desarrollo de las plantas.

Dantu y Bhojwani, (1995) obtuvieron brotes de gladiolos del cultivar "Friendship", a partir de cormos axilares, mostrando alargamiento en el medio MS modificado (Dantu y Bhojwani, 1992). Se observó que el mejor crecimiento de los brotes fue en presencia de luz, y adición de reguladores del crecimiento (BA), a una máxima concentración de citocininas. El 96 % de los brotes formaron cormillos, llegando a obtener hasta 16 brotes por cultivo y 10.5 cm. de longitud en promedio de las hojas. En medio basal el enraizamiento empezó con una semana de cultivo y terminó a la cuarta semana cuando todos los brotes formaron raíces con un promedio de 1.9 raíces por brote, y 4 cm. de largo. El número de raíces por brote fue directamente relacionado, mientras que la longitud de las raíces fue inversamente relacionada a la concentración de las auxinas β -glucuronidasa (GUS) expresando plasmidios. Los callos fueron seleccionados en medio de cultivo conteniendo alta solución de fosphinothricin (PPT) y transferidos a un medio de regeneración para recobrar plantas transgénicas

Kamo. (1995) recobró más de 100 plantas transgénicas de *Gladiolus* después de practicar un bombardeo de suspensión regeneradora de células y callos. Para la transformación callos de *Gladiolus* y suspensión de células, fueron co-bombardeadas

con phosphinotricin acetyltransferasa (PAT) y β -glucuronidasa (GUS) los callos se seleccionaron y se colocaron en medio nutritivo (MS) conteniendo phosphinothricin (PPT) para regenerar el medio y recuperar plantas transgénicas. Establecieron de una eficiente transformación de protocolo de *Gladiolus* a poder permitir la introducción de transgenes que confieren resistencia a patógenos virales y a hongos que inhiben la producción de *Gladiolus*.

Sen y Sen (1995), realizaron estudios de multiplicación *in vitro* de 4 cultivares de gladiolos con el fin de observar la frecuencia de multiplicación *in vitro* por medio de dos procesos simples con brotes de nódulo y apicales, los cuales mostraron respuesta dentro de los 15-20 días de cultivo en medio MS con 1 mg l^{-1} de BA (6-benzilaminopurina) y 3% de sacarosa. Los brotes del nódulo mostraron moderada hinchazón en la base seguidas por un alargamiento simple de los brotes después de 30 días en el medio cultivo. Bajo condiciones similares la porción basal de los brotes apicales bastante hinchados, también seguidos por la inducción de abundantes brotes iniciales. Estos brotes a su vez fueron nuevamente transferidos a condiciones similares de medio de cultivo por 90 días de crecimiento y en presencia de luz mostraron alargamiento y mejor regeneración de brotes de la base. Con esto obtuvieron que los dos procesos en este cultivo son convenientes y no son caros para la producción comercial de *Gladiolus*

Remotti y Löffler (1995) describieron un método para la iniciación de callos capaz de regenerar el crecimiento de cormelos *in vivo* de gladiolos (*Gladiolus x grandiflorus*) a partir de cormelos del híbrido "Peter Pears". Estos fueron cultivados *in vitro* en un medio

de cultivo MS modificado con reguladores del crecimiento y complementado con varias auxinas. En estos estudios la formación de callos fue fácilmente logrado en explantes de gladiolo obtenidos de cormelos crecidos en vivo, y después se cultivaron en medio de cultivo *in vitro* con reguladores del crecimiento. La inducción de callos mostró ser regenerable, siendo esto estimulado por la adición de suplementos a un medio de cultivo, entre los que se encontraban adeninas, vitaminas, citocininas, algunos aminoácidos y adicionando diferentes fuentes de nitrógeno. La adición de estos complementos fue un hallazgo que estimuló la producción de callos. Concluyen que la regeneración de callos de un número de genotipos de gladiolos pueden ser inducidos y mantenidos en medio de cultivo MS modificado.

Kumar *et al.* (1999). Propagaron *Gladiolus hybridus* exitosamente. Establecieron cultivos usando cormillos o segmentos de cormillos e inflorescencias recortadas en el medio de cultivo MS. La respuesta dependió de los suplementos al medio de cultivo; fueron observadas formaciones de callos e inducción de brotes. La diferencia entre brotes y callos pudo ser obtenida en el medio MS conteniendo $1.0 \mu\text{M}$ de BA y $10.0 \mu\text{M}$ de ANA. Lo mismo pudo ser conseguido desprendiendo un choque de calor (HS; 50°C , 1h) al cultivo de callos mantenidos en el medio basal. En estos dos cultivares, altas concentraciones de sacarosa (0.232, 0.290, o 0.348 M) también favoreció el crecimiento y proliferación del cultivo de brotes en planta con crecimiento en medio de cultivo regulador-libre a 20°C , en comparación a los cultivos mantenidos a 25°C . El choque de calor incremento la proliferación de brotes en los cultivos mantenidos en el medio basal, pero indujo prolífico enraizamiento en el cultivo de los brotes, dentro de los 5 días

expuestos a alto choque de calor y alta concentración de sacarosa (óptima 0.232 M). Mientras el número de raíces se incrementó a altas concentraciones de sacarosa en el medio. Generalmente, las plantas enraizadas en alta concentración de sacarosa (0.232 M) en el medio, en comparación con el medio con concentración normal de sacarosa, mostraron mejor supervivencia.

2.3.1.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo se define como una mezcla compleja de sales minerales (macro y micronutrientes), compuestos orgánicos, reguladores del crecimiento, y a los cuales se les puede agregar productos naturales complejos (Boccon, 1984; y Hartmann *et al.*, 1990).

El medio de cultivo está compuesto por un 95% de agua destilada de buena calidad, o por agua purificada por ósmosis inversa. Se le agrega agar (derivado de un alga marina) que es un polisacárido de elevada masa molecular, y se utiliza como agente gelificante. El azúcar es muy importante para el desarrollo de los explantes *in vitro*, esta se sintetiza y se transporta de forma natural por la planta, y en general se requieren de altas concentraciones de azúcar para aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los minerales constituyen sustancias nutritivas importantes, la mezcla de macro y micro-sales depende mucho de las plantas con las que se trabaja. El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) es muy utilizado debido a que la mayoría de las plantas reaccionan de forma positiva con el. Otro medio utilizado es el WPM (woody plant medium, para plantas leñosas) desarrollado por Lloyd y Mccown (1980)

Cruz-Pizarro (2000) menciona que en la actualidad existen una gran diversidad de medios de cultivo, de entre los cuales señala que son 16 los medios de mayor uso, variando en la fuente y concentración de los nutrientes.

En la preparación de un medio de cultivo, los ingredientes varían según el tipo de planta y el estado de propagación en que se está trabajando. Así, generalmente se tienen ciertas medidas estándar para la mayoría de plantas, aunque la fórmula exacta necesitaría ser establecida mediante un testigo (Hartmann *et al.*, 1990). A este respecto se deduce que para el desarrollo de una planta *in vitro* se deben tomar una serie de factores complejos, como son: la constitución genética de la planta; nutrientes (agua, macro y micro-elementos, y azúcares); factores físicos (luz, temperatura, pH); algunas sustancias orgánicas (reguladores, vitaminas, etc.) (Pierik, 1990; Hartman *et al.*, 1990).

El medio de cultivo puede estar hecho únicamente con productos químicos o adquirir medios de cultivo comerciales. Ensayos empíricos podrían ser necesarios para pruebas que avalen la combinación de ingredientes cuando se prueben en un nuevo tipo de planta. Estos ingredientes pueden ser agrupados dentro de las categorías de: a) sales

inorgánicas; b) compuestos orgánicos; c) ingredientes naturales complejos; d) complementos inertes, (Hartman et al., 1990).

Para el desarrollo de explantes *in vitro* en su morfogénesis y formación de callo, pueden ser soportados en medio de agar o en medio líquido WH, MS o LS. En el cultivo *in vitro* de *Gladiolus* se ha utilizado más comúnmente el medio de Murashige – Skoog (MS) y el medio de Linsmaier – Skoog (LS). Estos medios han sido utilizados en un rango extenso de especies y tipos, particularmente en plantas de tipo herbáceos (Hartman et al., 1990).

El desarrollo de brotes durante la organogénesis pueden ser afectados por el medio de cultivo de tejidos, particularmente por la concentración de nutrientes, fuentes de carbohidratos y reguladores del crecimiento. Concentraciones en algunas o todas las sales en el medio, pueden influenciar grandemente en la formación de brotes. Al incrementar la concentración de sales en el medio MS, decreció el porcentaje de regeneración de bulbos en *Iris X hollandica* (Van der Linde, 1988) pero se incremento el numero de brotes en la regeneración de explantes (Van der Linde y Shipper, 1992).

2.4 Importancia del nitrógeno en el cultivo *in vitro*

Si tomamos una base de peso seco de una planta, el nitrógeno es el cuarto elemento nutriente más abundante en las plantas (Hopkins, 1995). Es el principal

constituyente de proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, clorofila, y una gran variedad de constituyentes primarios y secundarios (Lal y Lal, 1990; Kite, 1990; Hopkins, 1995). La falta de nitrógeno en la planta ocasiona síntomas como: las hojas más viejas o de la parte inferior son más afectadas y se hallan más o menos secas o quemadas; la planta tiene color verde oscuro o claro; en la planta de color claro, las hojas están amarillas, y cuando se secan, de color café claro; los tallos son cortos y delgados. Por lo general, los síntomas de deficiencia dependen de la función o funciones que realiza el elemento y si el elemento se transfiere o no con facilidad de las hojas viejas a las jóvenes (Salisbury y Ross, 1994).

2.4.1 Requerimientos de nitrógeno

Pierik (1990), menciona que las necesidades totales de nitrógeno para la mayoría de las especies, varían entre 12 a 60 mmol l⁻¹, de donde al ión NH₄⁺ le corresponden de 6 a 20 mmol l⁻¹ y al NO₃⁻ de 6 a 40 mmol l⁻¹, con mejor respuesta al NO₃⁻, en el cultivo *in vitro*, los medios pueden superar el requerimiento de los explantes, por lo que la utilización de medios base a diferentes concentraciones es común, sobre todo en macronutrientes (¼, ½ y ¾) cuidando de no modificar la elevada relación NH₄⁺ /N total (Gambor y Shyluk, 1970; Margara, 1988; Cormier, 1991). Zienco *et al.* (1995) recomienda que sea modificada en 1/6 una proporción de NH₄⁺: NO₃⁻. Wang et al. (1994) menciona que con una alta concentración de nitrógeno en su forma NH₄⁺ se favorece la necrosis de tejidos.

Además, los factores nutritivos requieren de un suplemento de nitrógeno, siendo este un importante parámetro que influye en la producción de alcaloides (Berlín *et al.*, 1985). Según Aoki *et al.* (1997) el crecimiento y producción de alcaloides en los pelos radicales de *Atropa belladonna* están influenciados por la composición del medio de cultivo.

Lillo (1989), evaluó los efectos de los componentes del medio de cultivo para *Solanum tuberosum*, encontró que varias concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ estimularon el desarrollo de brotes obteniéndose mejor respuesta cuando la concentración de NO_3^- fue aproximadamente dos veces la concentración de NH_4^+ (2:1) o más alta. La formulación del medio MS fue modificada empleando 30 mM de sacarosa, 21 mM de NO_3^- , 8mM de NH_4^+ , 4.6 μM de zeatina, y 0.6 μM de IAA. Y en el segundo medio se utilizaron los mismos componentes, modificando los reguladores el crecimiento con 4.4 μM de BA y 0.3 μM de ácido giberélico (GA_3). No se encontró diferencia en la regeneración entre los dos medios estudiados y el primer medio fue usado para la formación de callos.

La formación de brotes se indujo a 0, 8 y 21 mM de amonio, pero el mas eficiente se obtuvo a 8 mM. Las concentraciones de nitrato de aproximadamente dos veces o mas la concentración de amonio fueron convenientes para la formación de brotes.

Williams (1991), analizó los factores que determinan la asimilación nutrimental *in vitro*, mencionando que puede ser afectada por la composición del medio, el tejido

vegetal y las condiciones ambientales donde se desarrolla el cultivo. Encontró que la proporción de iones en el tejido fue similar para las plantas *in vitro* como para las plantas *in vivo*, exceptuando los bajos contenidos de calcio encontrados *in vitro*. Además, señaló que la asimilación de nutrientes no es proporcional a su concentración, sobre todo a altos niveles de suplemento nutrimental.

Abu-Qaoud *et al.* (1991), trabajando con dos cultivares de pera (*Pyrus communis*) en cultivo *in vitro*, evaluaron como influyó la forma y proporción de nitrógeno (NH_4^+ : NO_3^-) detectaron en la formación de brotes una elevada concentración de nitrógeno total y de nitrato reductasa, emplearon inicialmente cuatro diferentes medios nutritivos para la aportación de sales minerales: MS al 100% y 50% de su concentración, Quorin y Lepoivre (LP, 1977), Nitsch y Nitsch (NN, 1969), y White (WH, 1943), a este último se le agregó una fuente de nitrógeno reducido del cual carece (10 mM de NH_4NO_3). Se encontró que para ambos cultivares, el mayor desarrollo de brotes ocurrió en el medio MS al 50% y en el medio NN; además de obtener el mínimo desarrollo en un medio donde la concentración de nitrógeno fue baja, (medio WH con solo 2.48 mM de nitrógeno como NO_3^-), pero la adición de NH_4NO_3 al medio WH incrementó significativamente el porcentaje de brotes. Basándose en esto se evaluaron diferentes proporciones de NO_3^- : NH_4^+ (1:0, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 7:1), en una concentración total de nitrógeno de 27.5 mM, de donde se determinó que las proporciones 2:1, 3:1, y 4:1 tuvieron la máxima regeneración. Sin embargo, en las proporciones más altas 5:1 y 7:1 se observó una reducción en el desarrollo de brotes, indicando que cuando en el medio no se incluyó NH_4^+ no se obtuvo desarrollo de los brotes.

Leblay *et al.* (1991), utilizaron el medio MS al 50% de su concentración para obtener brotes adventicios, de donde emplearon las proporciones NH_4/NO_3 (1:2 y 1:3) con cuatro concentraciones de NH_4^+ (5, 7.5, 10, y 12.5 mM), encontraron una mayor regeneración para la proporción 1:3 de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ y las concentraciones de NH_4^+ de 7.5 y 10 mM promovieron una mayor regeneración. Estos autores afirmaron que uno de los mecanismos fisiológicos asociados al amonio fue el de promover la penetración de algunos aniones a expensas del catión, mientras que el nitrato parece haber actuado en forma inversa. De tal forma que el balance entre las dos formas de nitrógeno puede regular la absorción diferencial de otros iones, particularmente al cultivo de hojas.

Kalpana *et al.* (1997), analizaron el efecto de diferentes niveles de NH_4NO_3 usado como macronutriente en el medio de cultivo MS, donde fue investigada la regeneración de callo de *Eleusine coracana*. Los callos fueron transferidos en dos medios de regeneración. El primero contenía 0, 20 (concentración normal en medio MS), 40, 60, 80, 100, 120 mM de NH_4NO_3 juntos y en combinación con 1.0 mg/l de ANA, y el segundo en un medio sin reguladores del crecimiento pero con diferentes niveles NH_4NO_3 , (0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 mM). El NH_4NO_3 fue esencial para la proliferación de callos y regeneración de plantas. Observaron que el medio de cultivo contenía de dos a seis veces mas alto el nivel de NH_4NO_3 que lo normal y que el medio de cultivo podría también soportar la regeneración de plantas en ausencia de reguladores del crecimiento, teniendo el máximo número de plantas regeneradas en un medio con 80 mM. de NH_4NO_3 , cuatro veces mas de lo normal en el medio MS. En presencia de ANA, la optima

concentración de NH_4NO_3 para la regeneración de plantas fue encontrada en los 20 y 40 mM, además que formaron múltiples brotes y raíces. Los resultados indican que adicionando altas concentraciones de NH_4NO_3 se pueden sustituir los requerimientos de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo para la regeneración de plantas. Pero altos niveles de NH_4NO_3 (100, 120 mM) en la presencia de reguladores del crecimiento pueden inhibir la regeneración de plantas en la proliferación de callos.

Gavidia y Pérez-Bermúdez (1997), estudiaron el efecto de la concentración de macronutrientes y fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y productividad en el cultivo de brotes de *Digitalis obscura* cardenolides. Investigaron la influencia de NH_4^+ y NO_3^- en el cultivo de brotes, los resultados demostraron que al emplear el NO_3^- como única fuente de nitrógeno no fue suficiente para estimular el crecimiento y una pequeña cantidad de NH_4^+ fue esencial para una buena proliferación y desarrollo. Con una concentración 2:1 de NO_3^- : NH_4^+ similar al medio BM, dejó una drástica reducción en los índices de crecimiento y proliferación. Además, a través del medio BM-2 con un incremento en la concentración de NO_3^- (4:1) favoreció significativamente el desarrollo de brotes. Muy pobres respuestas se obtuvieron en otros medios de cultivo en los cuales se aumentaron las proporciones de NH_4^+ , afectaron negativamente el desarrollo y crecimiento del cultivo. En algunas especies se ha empleado el nitrato o el amonio exitosamente como única fuente de nitrógeno (Gamborg y Shyluk, 1970; Wetherell y Dougall, 1976; Chaleff, 1983; Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987).

Cao y Tibbitts (1998), realizaron dos experimentos separados, en donde investigaron el crecimiento y composición mineral de plantas de papa (*Solanum tuberosum*). A una variada concentración en la solución de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), cada experimento fue evaluado con cinco concentraciones de nitrógeno total a 0.5, 2, 4, 8, y 12 mM, los cuales se mantuvieron en un sistema sin recircular los nutrientes y en medio ambiente controlado. Las plantas con NO_3^- fueron cosechadas a los 42 días, y las plantas con NH_4^+ a los 35 días. Después de trasplantadas del cultivo de tejidos y haber medido su crecimiento, tomaron el área de las hojas, número de tubérculos, y peso seco de diferentes partes. Al emplear NO_3^- , el mejor crecimiento de las plantas fue a 2, 4, y 8 mM de N total, mientras que con el NH_4^+ , el crecimiento fue mejor solo a 2 y 4 mM de N. A 12 mM de N las plantas exhibieron toxicidad con amonio, pero tuvieron un crecimiento normal con NO_3^- . Los datos indicaron que los intervalos óptimos en la concentración de nitrógeno en ambas soluciones y cultivos son mas amplios y altos con NO_3^- que con concentraciones de NH_4^+ . De este modo, un cuidadoso control en las concentraciones de NH_4^+ es necesario para minimizar la toxicidad por amonio en las plantas de papa.

Bon *et al.* (1998), analizaron como influyeron cinco diferentes medios de cultivo en la micropropagación de explantes de *Acacia mangium* y *Paraserianthes falcataria*. Los medios utilizados fueron: B5 (Gamborg *et al.* (1968), a $\frac{1}{4}$ de su concentración), Knop (Knop (1865), a $\frac{1}{2}$ de la concentración "MS"), QP (a $\frac{2}{3}$ de su concentración), y SH (Shenk y Hildebrandt (1972), a $\frac{2}{3}$ de su concentración) complementados con varios reguladores del crecimiento. La mayor brotación fue para *A. mangium* con los medios B5 y SH, y para *P. falcaria* con el medio MS. Señalaron que la morfogénesis fue influenciada

significativamente por la diferencia en macronutrientes utilizados. La alta concentración de iones tienen también un marcado efecto en el porcentaje de enraizamiento después de las 4 a las 8 semanas, y la baja concentración de aniones y cationes, puede ocasionar una respuesta baja.

Cruz-Pizarro (2000), estudió los niveles de sacarosa y la relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en el cultivo *in vitro* de brotes de vid (*Vitis vinifera*) "Málaga Roja" en el que determinó la proporción de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ para la obtención de brotes de calidad, en un medio base WPM (Lloy y McCown, 1980) con un testigo a 5 mol m^{-3} como nitrato y 2.5 mol m^{-3} como amonio, modificando la fuente y concentración de nitrógeno en varios niveles de KNO_3 . Encontró que en la proporción 6:1 con una concentración total de 17.5 mol m^{-3} , el número de brotes, longitud de brote, número de hojas, número y longitud de raíces, de manera general tuvieron una mejor respuesta. También se comprobó una disminución rápida en la concentración del amonio en los primeros 14 días del subcultivo, debido a la brotación de las yemas y al desarrollo del callo. Con relación al nitrato, disminuyó a partir de los 21 días y hasta los 42 días logrando la mayor longitud de brote y mayor emisión de raíz.

Elkonin y Pakhomova (2000), estudiaron la influencia del nitrógeno y el fósforo en inducción a embriones de callo de sorgo. Fragmentos de jóvenes panículas y embriones inmaduros de diferentes cultivos de granos de sorgo, fueron cultivados en medio MS y en medio N6 complementado con L-asparagina (6.7mM), L-prolina (17.4 mM), modificado a diferentes concentraciones de NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} . Nueve variantes en el medio de cultivo con diferentes combinaciones de tres niveles de NO_3^- (39.9, 72.4, 131.6 mM) y tres

niveles de NH_4^+ (20.6, 62.5 125.0 mM) con o sin asparagina y/o prolina. Las panículas derivadas fueron usadas en experimentos con diferentes fuentes de nitrógeno, la influencia de los niveles de PO_4^{3-} fueron estudiados en embriones y panículas derivados del cultivo. Un incremento en los niveles de NO_3^- y NH_4^+ en el medio de cultivo, con aminoácidos, significativamente incremento la inducción y crecimiento de callos embriogénicos. Otro medio empleado (M2) el cual contenía 62.5 mM de NH_4^+ y 72.4 mM de NO_3^- , excedió a el otro medio de cultivo, siendo previamente efectiva en la obtención de embriones de callo de sorgo. El nivel de NO_3^- y la proporción $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en el medio de cultivo M2 complementado con L-asparagina y L-prolina fueron establecidas para ser los factores críticos en la formación de embriones de callo en sorgo con aproximadamente el doble de concentración de iones de NO_3^- . Altos niveles de NH_4^+ con bajos niveles de NO_3^- resultaron poco viables en la formación de embriones de callo compactos en algunos genotipos.

Luciani *et al.* (2001), estudiaron el efecto de diferentes proporciones de NO_3^- : NH_4^+ en el cultivo *in vitro* de *Allium sp.* Empleando reguladores del crecimiento en distintos medios de cultivo para obtener un optimo protocolo de propagación en el desarrollo de brotes de ajo. Utilizaron tres medios: MS (Murashige and Skoog, 1962), BDS (Dustan and Short medium, 1977), y BLS (modificación de BDS, preparado por adición de 1 g l⁻¹ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ para obtener una proporción de 35 mM de NO_3^- :8 mM de NH_4^+). Concluyeron que en medio de cultivo BDS y BLS solo hubo diferencias en la proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. La diferencia en los índices de multiplicación se debieron probablemente al incremento en el nivel de nitrato del medio de cultivo BLM. Este trabajo

muestra que los índices de multiplicación *in vitro* para los clones de ajo podrían ser mejorados por el uso de altos niveles de nitrógeno, aportado como NO_3^- .

Taylor y Staden (2001), evaluaron el efecto de la concentración de nitrógeno y sacarosa en el crecimiento de *Eucomis autumnalis* (Mill) *in vitro*, utilizaron un medio MS modificado con diferentes concentraciones de nitrógeno y sacarosa. Los tratamientos altos en nitrógeno contenían el doble del volumen de reservas 1 y 2 (1.68 g l⁻¹; 119.94 mM de nitrógeno). Los bajos tratamientos contenían la mitad del volumen de reservas 1 y 2 (0.84 g l⁻¹; 29.99 mM de nitrógeno), y el volumen normal de reserva 1 y 2 (0.84 g l⁻¹; 60 mM de nitrógeno). Obtuvieron como resultado que al bajar la cantidad de nitrógeno suministrado al medio al inicio, se redujo significativamente el número de brotes, pero tiene poco efecto en el promedio de peso fresco y seco. Altas concentraciones de nitrógeno también redujeron el número de brotes, pero a mucho menor grado, y dejó un significativo incremento en el promedio de peso fresco y seco. Concluyeron que los tejidos y los órganos asimilan nitrógeno y muestran más rápido crecimiento al contener iones de amonio y nitrato a niveles controlados en el medio de cultivo.

Bensaddek *et al.* (2001), estudiaron el efecto del NO_3^- y el NH_4^+ sobre el crecimiento y acumulación de alcaloides en la raíz de *Atropa belladonna*. Utilizaron tres niveles de NO_3^- (15.8, 39.5, 98.75 mM) y tres niveles de NH_4^+ (8.2, 20.5, y 51.25 mM) utilizando como fuentes sulfato de amonio y nitrato de potasio, y tomaron como referencia un medio líquido MS (39.5 mM de NO_3^- y 20.5 mM de NH_4^+). Un aumento en la concentración de NH_4^+ causó un descenso en la formación de pelos radicales, mientras que el NO_3^- tuvo un marcado efecto en el contenido de alcaloides. La producción de

alcaloides obtenida con 15.8 mM de NO_3^- y 20.5 mM de NH_4^+ fue de 1.2-1.4 veces mas alto que lo obtenido cuando las raices crecieron en un medio estándar MS (39.5mM de NO_3^- y 20.5 mM de NH_4^+) el NO_3^- y el NH_4^+ también tuvieron un fuerte influencia en la proporción de socopolamine/hyoscyamine. Estas investigaciones mostraron que la más alta producción de peso seco se obtuvo con la misma concentración de NO_3^- que en el medio MS (39.5 mM de NO_3^-) y con reducidos niveles de NH_4^+ (8.2 mM de amonio), en donde la proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ fue aproximadamente de 4.81:1. El NH_4^+ es muy difuso y fácilmente acumulado en los tejidos volviéndose muy toxico si no es inmediatamente metabolizado (Richter, 1993). Cuando la concentración de NH_4^+ en el medio es mínima, mas del NH_4^+ acumulado es metabolizado por las células, mientras que en el caso donde la concentración de NH_4^+ es alta, solo una pequeña parte puede ser metabolizada y el exceso tiene un efecto inhibitorio en el metabolismo de las células. Otra consecuencia de acumulación de NH_4^+ podría tener un efecto directo o indirectamente represivo en la asimilación de NO_3^- (Crawford, 1995)

Con respecto a una absoluta cantidad de nitrógeno, tiene que ser reportado como una proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ que puede jugar un determinante rol en la morfogénesis, y este optimo valor tiene que ser ajustado dependiendo de la especie, tipo de explante o estado de cultivo(David et al., 1982; Flinn y Webb, 1986; Niedz, 1994).

2.4.2 Absorción de nutrimentos

El movimiento de solutos, que es esencial para la vida de las plantas, ocurre de célula a célula y de un organelo celular a otro, por lo que los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas se absorben de la solución del suelo en forma de iones, en un proceso llamado "extracción de solutos" (Salisbury y Ross 1994)

Bidwell (1979) menciona que los solutos se pueden movilizar por difusión a través de canales que presentan barreras físicas, o ser arrastrados por el flujo del solvente. Pero la tasa de difusión o de flujo se ve afectada por las propiedades de la barrera. Si pertenece a un sistema viviente, como membrana o citoplasma, los solutos la pueden atravesar por difusión pasiva o por transporte activo.

Sustancias no electrolíticas tienden a difundir a través de membranas a una tasa mas o menos proporcional a su solubilidad en lípidos o solventes grasos, e inversamente proporcional a su tamaño molecular. Las moléculas deben atravesar espacios huecos. Las paredes celulares parecen ser permeables a la mayoría de los solutos, mientras que la permeabilidad de las membranas es mucho menor, por lo que es la sustancia viva la que afecta y controla el transporte de solutos al interior y hacia afuera de las células (Bidwell, 1979)

Salisbury y Ross (1994) mencionan que por medio del sistema radical, los vegetales resuelven el problema de la absorción de agua y elementos minerales del suelo. En muchas plantas las raíces representan del 20 al 50% de su peso total, sin embargo, cuando se encuentran estresadas o con insuficiencia de agua o nitrógeno mineral, se puede encontrar hasta el 90% de su biomasa vegetal total en la raíz. La forma de cilindro y los filamentos de las raíces tiene gran importancia para la absorción de agua y solutos. Además, los pelos radicales contribuyen a la absorción de agua y iones. En ausencia de suelo pero en condiciones adecuadas de humedad y aeración, algunas plantas forman un sistema de pelos radicales extenso. Las sales minerales son absorbidas y transportadas a partir de estos pelos radicales. Al igual que la ruta del movimiento del agua en las regiones juveniles de raíces, el movimiento de los solutos se relaciona con rutas apoplásticas y simplásticas. Se ha pensado que la ruta del apoplasto abarca desde los pelos radicales hasta la endodermis en cuya banda de Caspary, impermeable al agua, forzaba la entrada de las sustancias a las células endodérmicas, a través de sus membranas plasmáticas.

Al ser absorbido un ion por la célula epidérmica, se mueve al xilema vía simplasto atravesando la epidermis y enseguida una endodermis y al final al periciclo. Independientemente de la ruta, los iones que se transportan hacia la parte aérea entran a las células muertas de conducción al xilema (elementos de vaso y traqueidas).

Salisbury y Ross, (1994) mencionan cuatro importantes principios de la absorción de solutos, estos dan origen a la teoría de que las proteínas de transporte denominadas transportadores, controlan la absorción.

Todas las células pueden absorber ciertos solutos esenciales con tal rapidez, por largos periodos, volviéndose las concentraciones de estos solutos mucho mayores dentro de las células que en la solución exterior. Esta absorción lleva el nombre de **acumulación** y al grado en que la concentración del interior es mayor que la exterior se le denomina **razón de acumulación**. En conclusión, las células vegetales utilizan energía para la acumulación, siendo el ATP el compuesto rico en energía. Algunas células del floema acumulan sacarosa en los haces vasculares, y luego los translocan a otros sitios, siendo esencial este transporte para que las células fotosintéticas puedan abastecer a otras partes del vegetal.

La absorción de solutos es **específica y selectiva**, estos se absorben y acumulan en forma selectiva. Esta selectividad también es válida para compuestos orgánicos como aminoácidos y azúcares, presentándose en todas partes del vegetal. De esto se deduce que portadores de proteínas presentes en las membranas ayudan a introducir solutos a las células, que reconocen de manera selectiva determinados iones o moléculas y pueden ser activadas o desactivadas por ellos.

Los solutos absorbidos **salen con lentitud**, cuando los iones o las moléculas son absorbidos en el citoplasma o las vacuolas de las células, no salen con facilidad, casi siempre este movimiento es lento, esta salida lenta indica que la absorción, en especial en raíces con bajo contenido de sales, es básicamente un movimiento unidireccional de entrada (Salisbury y Ross 1994). En condiciones normales de temperatura y aireación se tiene una rápida entrada inicial de iones, solo presenta la difusión hacia el interior de

las paredes celulares, más que un movimiento real a través de la membrana plasmática. Luego la rapidez de absorción se hace en esencia constante.

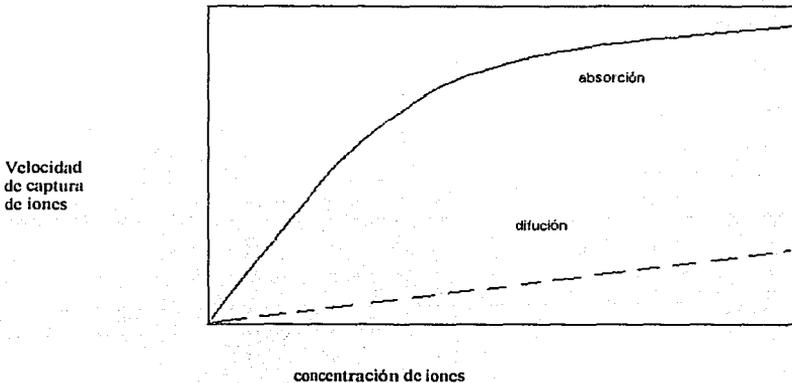
2.4.2.1 Variación de absorción de solutos con respecto a su concentración

Existen estudios que relacionan las velocidades de absorción con las concentraciones externas, en tal caso Nye y Tinker (1977) concluyen que en vegetales silvestres, para nutrimentos que se consumen en abundancia (nitrato, amonio, fosfato y potasio), la difusión es el factor limitante hacia la superficie radical, por lo que las propiedades de absorción de las raíces solo tienen importancia limitada para la nutrición vegetal. No obstante, en vegetales cultivados y bien fertilizados con nitrógeno, fósforo y potasio y otros solutos esenciales y para células que no son de la raíz, con frecuencia están limitadas en la absorción a través de la membrana. Epstein (1972), investigó la absorción de iones específicos, y concibió la idea de que las proteínas de las membranas pueden actuar como enzimas. Esto quiere decir que las membranas contienen numerosas proteínas que reconocen de manera específica determinados solutos, se combinan con ellos y aceleran su introducción, estas proteínas han sido denominados por Epstein como **portadores**.

Son dos los mecanismos que existen para explicar la absorción de solutos. El primero, una **difusión** simple en un solo sentido a través de la membrana provocaría que la velocidad de absorción fuera directamente proporcional a la concentración externa del soluto. Fig. 4.

Si la difusión libre fuese la responsable de esta captura, la velocidad sería baja y esencialmente proporcional a la concentración, pero las velocidades reales son mucho mayores y evidencian una cinética de saturación.

Figura 4. Influencia de la concentración de iones en la proximidad de las células vegetales sobre la velocidad de captación de iones.



Fuente: Salisbury y Ross (1994)

En cambio, para los solutos que las células deben acumular (orgánicos e inorgánicos), en realidad, la velocidad de **absorción** es mucho mayor. La velocidad de absorción (o captación) se incrementa con rapidez a medida que aumenta la concentración del soluto en intervalos de baja concentración, por lo general similares a

los que existen en el suelo (0.1 mM.) pero a concentraciones mayores la velocidad de absorción empieza a estabilizarse (Salisbury y Ross, 1994)

2.4.2.2. Transporte pasivo y activo

Se ha visto que más de los solutos absorbidos por las células se acumulan en concentraciones superiores en el interior que en el exterior, pero pocos de estos que son absorbidos con rapidez por las células nunca alcanzan concentraciones superiores en el interior en contraste con las concentraciones que alcanzan en el exterior. En cambio, para cualquier soluto sin carga (gases y azúcares) la diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana es el único factor que determina el gradiente de potencial químico, pero para solutos con carga, existe otro factor implicado, llamado gradiente de electropotencial (o potencial eléctrico). Este gradiente tiene que ver con la atracción o repulsión de iones que resulta de una diferencia en la carga eléctrica de un lado a otro de la membrana.

Las absorciones **pasiva** y **activa** están definidas por la ecuación de Nernst, que toma en cuenta tanto en la concentración como en la carga eléctrica. La ecuación matemática de Nernst suma el gradiente químico de la concentración a través de la membrana al gradiente eléctrico.

2.5 Absorción y transporte del nitrógeno en la planta

En las plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, existen tres procesos para el acceso y transporte de nutrientes mencionados por Salisbury y Ross (1994): 1) Flujo de masas, donde el movimiento de los compuestos se basa en una fuerza que empuja o succiona, no siendo importante la energía cinética de las partículas, se da un gradiente a una concentración de mayor a menor. 2) Difusión, aquí es importante la energía de las partículas de mas actividad a menor, es muy lento a distancias macroscópicas, y funciona para distancias muy reducidas, siendo el movimiento lento de un punto a otro debido a actividades o movimientos de moléculas. Y 3) por ultimo, la osmosis, en la que existe una membrana de por medio, siendo importante la energía de la partícula, es como la difusión pero con membrana biológica permeable de por medio que regula la entrada y salida de sustancias, en donde las diferencias en potencial químico de solutos separados por membranas es uno de los factores esenciales para el movimiento de iones y esta puede suceder al atravesar la epidermis o cortex de las raíces.

Para la mayoría de las plantas cultivadas, las únicas fuentes importantes de nitrógeno son NO_3^- y NH_4^+ . Sin embargo, la mayor parte del nitrógeno es absorbido en forma de NO_3^- , y posteriormente reducido a NH_4^+ . El NH_4^+ se reduce a NO_3^- , pero también se genera en otros procesos metabólicos tales como la fotorrespiración, el catabolismo de las proteínas o la fijación del nitrógeno molecular. Este es asimilado primeramente en forma de glutamina y esta es utilizada para la síntesis de otros

aminoácidos o bien como metabolito transportador de nitrógeno a larga distancia, (Salisbury y Ross, 1994).

La asimilación del nitrógeno es vital en los procesos que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas. El nitrógeno inorgánico es asimilado dentro en amino ácido glutamina, glutamato, asparagina, y aspartato, que sirve como importante portador de nitrógeno en plantas. Las enzimas glutamina sintetasa (GS), Glutamato sintetasa(GOGAT), glutamato dehydrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AspAT), y asparagina sintetasa son los responsables de la biosíntesis de la transportación de nitrógeno en los aminoácidos, (Lam, et al., 1996)

Dougall (1982) realizó estudios sobre diferentes fuentes de nitrógeno y su utilización por las plantas, concluyó que el N del NH_4^+ es removido más rápidamente del medio y es predominantemente convertido en glutamina, por lo que solo una mínima parte del NO_3^- es utilizada en el periodo inicial del cultivo, además de una utilización preferente de aminoácidos sobre NH_4^+ y este a su vez sobre NO_3^- , en estos casos se demostró la utilización preferente de las formas más reducidas de nitrógeno. Una alta proporción del nitrógeno asimilado por los tejidos vegetales es utilizada para la síntesis de proteínas y aminoácidos junto a ácidos nucleicos, la asimilación de nitrógeno puede ser dividida en tres partes: la reducción de NO_3^- a NH_4^+ , la incorporación de NH_4^+ en compuestos orgánicos y la interconversión de compuestos nitrogenados orgánicos.

2.5.1 Absorción y asimilación de Nitrato

Según Tompkins *et al.* (1978); Agüera *et al.* (1990), las plantas que han permanecido cierto tiempo sin NO_3^- en el medio, muestran una escasa o nula absorción de dicho ión. Después de unas cuatro o cinco horas se inicia su absorción hasta que alcanza una velocidad máxima y constante. La capacidad de absorber NO_3^- se previene en presencia de inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas, lo que sugiere que el NO_3^- actúa como inductor de la síntesis de las proteínas que actúan en su transporte al interior celular.

Existen transportadores o permeasas del NO_3^- que se deducen también de la observación de que su velocidad de absorción en función de su concentración externa muestra una típica cinética de saturación. En algunas especies se han descrito dos sistemas de transporte, uno que opera a bajas concentraciones de NO_3^- en el medio (hasta 1 mM.), y que tiene una alta afinidad por el ión ($K_m < 0.1$ mM), y un segundo que solo es funcional a concentraciones más elevadas y que presenta una afinidad más baja. Para algunos autores la velocidad de absorción se ajusta mejor a una cinética lineal que una hiperbólica, lo que sugiere que, a dichas concentraciones, ocurre una difusión libre, probablemente a través de canales iónicos (Azcon-Bieto y Talon, 1996).

El transporte de NO_3^- al interior de la célula es de tipo activo ya que se reduce considerablemente cuando se inhibe la síntesis de ATP (Azcon-Bieto y Talon, 1996).

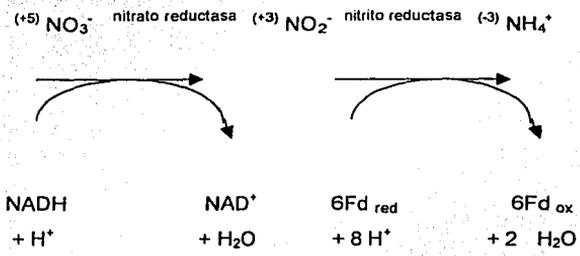
Ullrich y Novacky (1981), han propuesto que el NO_3^- es cotransportado con H^+ con una estequiometría de $2\text{H}^+ : 1 \text{NO}_3^-$. El gradiente electroquímico de H^+ requerido para sustentar dicho cotransporte es mantenido por el funcionamiento de ATPasas del plasmalema que, con la energía de hidrólisis del ATP, transportan unidireccionalmente dichos H^+ al exterior.

Grajales (2001) menciona que el nitrógeno bajo la forma de NO_3^- es absorbido mediante el proceso de transporte activo secundario facilitado, el cual consiste de la incorporación de NO_3^- en contra del gradiente de potencial electroquímico, aprovechando la energía liberada por el transporte activo primario facilitado del K^+ o del H^+ , cuya incorporación ocurre gracias a la ATPasa de Na y K, ó ATPasa de H^+ , respectivamente, con gasto de ATP que requieren proteínas transportadoras membranales de NO_3^- .

Salisbury y Ross, (1994), mencionan que las raíces de algunas especies pueden sintetizar todo el nitrógeno que necesitan a partir del nitrato, mientras que otras especies dependen de las partes aéreas para obtener nitrógeno orgánico. La mayor parte de la reducción de nitrato ocurre en el sitio (raíz o parte aérea) donde se presenta la mayor actividad de nitrato reductasa.

Según Azcon-Bieto y Talon (1996), la reducción de NO_3^- a NH_4^+ se realiza en dos reacciones consecutivas. En la primera, el NO_3^- es reducido a NO_2^- por la enzima *nitrato reductasa* (NR). Esta reacción consume dos electrones suministrados por una molécula de piridinnucleótido reducido. En seguida, el NO_2^- es reducido a NH_4^+ por el

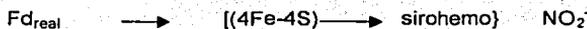
nitrito reductasa (NiR) reacción que requiere seis electrones donados por la ferredoxina (Fd) reducida:



La NR es una proteína de masa molecular entre 200 y 240 kDa constituida por dos subunidades idénticas. Cada subunidad contiene una molécula de FAF (flavin adenin-dinucleótido), un grupo hemo(citocromo b₅₅₇) y un átomo de molibdeno integrado en el denominado cofactor de molibdeno (MoCo). El MoCo es un complejo entre el átomo de molibdeno y una pterina fosforilada.

El FAD, el hemo y el MoCo actúan como transportadores de electrones entre el NADH y el NO₃⁻.

La NiR cataliza la reducción del NO₂⁻ a NH₄⁺ en una reacción de seis electrones suministrados por ferredoxina reducida. Esta enzima esta constituida por un solo polipéptido de masa molecular entre 61 y 63 kDa. Contiene un centro sulfoférrico (4Fe-4S). De acuerdo a los valores de potencial redox de dichos grupos , el flujo de electrones desde la ferredoxina reducida hasta el NO₂⁻ vía la NiR Puede transcurrir como sigue.



Vaughn y Campbell (1988) han demostrado que la NR se localiza principalmente en el citosol.

La NiR se localiza exclusivamente en los cloroplastos, y en tejidos no fotosintéticos como la raíz, se encuentra en los plastidios.

Tanto la absorción del NO_3^- como la reducción, están reguladas, directa o indirectamente, por factores como la luz, el propio NO_3^- y la presencia en el medio de formas reducidas de nitrógeno. El NO_3^- promueve la síntesis de novo de su sistema de transporte, activando así su rápida absorción. Por otra parte, la presencia de NH_4^+ en el medio suele originar un descenso de la velocidad de absorción del NO_3^- .

2.5.2 Absorción y asimilación de amonio

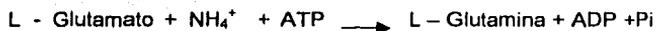
La absorción inicial de nitrógeno por los explantes es principalmente en forma de NH_4^+ (Cruz-Pizarro, 2000)

El NH_4^+ no se acumula en ningún sitio del vegetal, aun cuando este es absorbido directamente del suelo, o se produzca por reducción de NO_3^- o por fijación de nitrógeno dependiente de energía, de hecho, el NH_4^+ es muy tóxico (Salisbury y Ross, 1994). El

mismo autor menciona, que esto quizá se deba a que inhibe la formación de ATP en cloroplastos y mitocondrias al actuar como agente desacoplante.

En las plantas, todo el nitrógeno inorgánico primero es reducido a NH_4^+ y antes de esto es incorporado dentro de formas orgánicas (Crawford *et al.* 1993., Hoff *et al.* 1994). Entonces el NH_4^+ es asimilado en glutamina y glutamato, que sirve para translocar a nitrógeno orgánico desde sus fuentes. La mayoría de las enzimas involucradas son glutamina sintetasa (GS), glutamato sintetasa (GOGAT, glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa), y glutamato dehidrogenasa (GDH). Cada una de estas enzimas ocurre en múltiples formas de iso-enzimas codificadas por distintos genes. Estas iso-enzimas tienen el propósito de jugar roles en tres mayores procesos de asimilación de NH_4^+ : Asimilación primaria de nitrógeno, reasimilación de fotorrespiración de amonio, y reasimilación de reciclado de nitrógeno (Lam *et al.* 1996)

El NH_4^+ no solo se genera en la reducción del NO_3^- sino también en otros procesos metabólicos tales como la fotorrespiración, el catabolismo de las proteínas o la fijación del nitrógeno molecular. El NH_4^+ es asimilado inicialmente como glutamina. Lea y Mifflin (1974) (citados por Azcon-Bieto y Talon, 1996), encontraron que las plantas asimilaban el NH_4^+ mediante dos reacciones consecutivas. Primero, el NH_4^+ es incorporado en una molécula de glutamato formándose glutamina, dicha reacción, que consume una molécula de ATP, es catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS).



A continuación, la enzima glutamato sintetasa (Gogat: glutamina: 2-oxoglutarato amidotransferasa) cataliza la transferencia reductiva del grupo amido de la glutamina al C-2 de 2-oxoglutarato, produciéndose dos moléculas de glutamato:



Al conjunto de estas reacciones se les denomina vía GS-GOGAT o ciclo de la *glutamato sintetasa*.

La GS de las plantas superiores tiene una masa molecular de entre 320 y 360 kDa, y esta constituida por ocho subunidades de 38 a 45 kDa.

Se pensaba que el NH_4^+ era asimilado por las plantas mediante la aminación reductiva directa del 2-oxoglutarato, con la consiguiente formación de glutamato. Sin embargo, en 1974, Lea y Miflin (citados por Azcon-Bieto y Talon, 1996) encontraron que primero, el NH_4^+ es incorporado en una molécula de glutamato. A continuación, la enzima glutamato sintetasa cataliza la transferencia reductiva del grupo amido de la glutamina, produciéndose dos moléculas de glutamato (Azcon y Talon, 1996).

2.6 Fuentes de nitrógeno

Cruz-Pizarro (2000) menciona que las fuentes de nitrógeno más frecuentemente utilizadas en el medio de cultivo son: NH_4NO_3 , KNO_3 , y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Tomando la clasificación señalada por Dougall (1982), en la que toma como base las diferentes formas de nitrógeno adicionado al medio de cultivo: 1) el NO_3^- es la única fuente. 2) $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ como fuentes. 3) NH_4^+ como única fuente. 4) otras fuentes como urea, glutamina, ácido amino-butírico y aminoácidos con alanina, aspargina, glicina, metionina, prolina, valina, y ácido glutámico. Considerando que estos últimos pueden llegar a inhibir el crecimiento y la actividad de la nitrato-reductasa. A este respecto, Arnold *et al.* (1975); Ávila *et al.* (1998); Bergman *et al.* (1997) afirman que la fuente de nitrógeno tiene particular importancia debido a que influye en el crecimiento y morfogénesis en el cultivo *in vitro*, por lo que encontraron que a una baja relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ incrementa la materia seca del explante.

Bird *et al.* (1997), trabajaron con diferentes fuentes de nitrógeno y mostraron marcados efectos en el crecimiento de *H. decipiens*, ambos, ácido glutámico y amonio como fuentes de nitrógeno, aportaron la producción de nuevos brotes en una concentración de 1.7 mM. En cambio, ni urea ni nitrato fueron capaces de sostener la viabilidad a esta concentración. El mismo autor menciona que especies de *Halophila* crecen mejor con ácido glutámico como fuente de nitrógeno

2.7 Otras fuentes de nutrición mineral

Además de los elementos mayores, las plantas contienen una gran variedad de elementos en varias formas químicas. Particularmente el nitrógeno, azufre y calcio, están presentes como parte de la estructura orgánica. Otros minerales pueden estar presentes solo porque son absorbidos de forma no selectiva que tienden a acumularse como sustancias iónicas disueltas o almacenadas, tales como el selenio, estroncio, sodio y potasio (Bidwell, 1979)

Todos los elementos en su forma soluble, ya sean libres o unidos de manera estructural a compuestos esenciales, realizan otra función al contribuir a los potenciales osmóticos y, por consiguiente, ayudar a desarrollar la presión de turgencia que se necesita para mantener la forma y velocidad de crecimiento, así como para mantener determinados movimientos dependientes de la presión (Salisbury y Ross, 1994)

2.7.1 Calcio

En condiciones naturales, este elemento abunda en las plantas. Las soluciones nutritivas suministran suficiente calcio, pero recientemente se ha encontrado que las plantas se desarrollan de manera óptima con bajas concentraciones de calcio, siempre que se tengan algunos ajustes en el medio nutritivo. Las altas concentraciones de calcio, que tienden a precipitar muchas sustancias, pueden ser importantes al impedir los efectos tóxicos de otras sales que podrían estar presentes en exceso (Bidwell, 1979).

El calcio es importante en la síntesis de pectina de la lámina media de la pared celular. También está involucrado en el metabolismo o formación del núcleo y las mitocondrias. Es un elemento de extraordinaria importancia para la mayoría de las plantas por lo que una reducción severa determina el deterioro y muerte de estas. El calcio solo es útil en funciones catalíticas menores, involucrándose como activador de unas cuantas enzimas (Bidwell, 1979).

Las deficiencias de calcio afectan a las regiones meristemáticas del tallo las hojas y la raíz que, con facilidad mueren tempranamente; se detienen la mitosis, con lo que las hojas jóvenes presentan malformaciones, quedando con los extremos curvados hacia atrás, las raíces son pardas y cortas, las hojas muestran clorosis marginales hasta la necrosis (Martínez, 1995).

2.7.2 Potasio

Este elemento es requerido en abundancia por las plantas, a pesar de que al parecer no tiene una función estructural en las plantas, pero desempeña numerosos papeles catalíticos. El potasio se enlaza iónicamente con el piruvato quinasa, que es esencial en la respiración y metabolismo de carbohidratos (Bidwell, 1979)

La forma de absorción del potasio por la planta es la de catión monovalente (K^+). El incremento de acidez tiende a bajar la disponibilidad de estos cationes ya que los hidrogeniones interaccionan con la capacidad de intercambio catiónico y, además, los

protones compiten con el transporte de los iones metálicos por la raíz. La máxima disponibilidad se encuentra en el rango de 6.5 – 7.5 de pH; por encima, decae por competencia de los iones Ca^{++} (Martínez, 1995).

El requerimiento de grandes cantidades de potasio parece ser el que tenga una afinidad pequeña con las proteínas y se requiera en una gran concentración para mantener los complejos proteína- K^+ a concentraciones óptimas para la actividad enzimática. Claramente, el potasio tiene un importante papel como regulador osmótico. La deficiencia en potasio afecta a procesos como la respiración, la fotosíntesis, la síntesis de clorofila y el contenido en agua de las hojas. La máxima concentración se halla en las zonas meristemáticas y en la activación de enzimas involucradas en la formación de enlaces peptídicos (Martínez, 1995).

La deficiencia de potasio generalmente se manifiesta con una clorosis típicamente moteada de las hojas maduras que luego se distribuye a las jóvenes. Los hábitos de crecimiento en roseta son típicos por deficiencia de potasio, e incluso achaparramiento. Otras consecuencias son la reducción del crecimiento caulinar, el debilitamiento del tallo y la baja resistencia a patógenos (Bidwell, 1979).

Lumsden *et al.* (1990) realizó estudios sobre el efecto de la nutrición mineral en el crecimiento y multiplicación de plántulas de *Hemerocallis* y *Delphinium* cultivados *in vitro*. Emplearon diferentes fuentes para analizar la asimilación del PO_4^{3-} , NO_3^- y K^+ , encontrando que la concentración del PO_4^{3-} y el NO_3^- decrece con el incremento en el número de plantas por tubo. Por el contrario, la asimilación de K^+ no parece seguir el

mismo comportamiento, su asimilación continua con el incremento en el número de planteles, y la asimilación por planta quedó mas o menos constante, indicando que no hubo limitación por la asimilación individual de las plantas igual que con alto número de plantas por tubo. Concluyeron que el K^+ es metabolizado o utilizado con menor rapidez que los demás nutrientes estudiados.

II MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, dependiente de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

3.2 Material vegetal

Se empleó como explante cormillos de *Gladiolus sp.*, previamente obtenidos de cormillos cultivados *in vitro* en el laboratorio de cultivo de tejidos de esta Facultad. La preparación y separación de los explantes se hizo bajo condiciones asépticas, sobre cajas de petri previamente esterilizadas, colocándolos en tubos de ensaye que contenían el medio de cultivo con la concentración de nitrógeno para cada tratamiento (10 ml. por tubo). Todo esto se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar horizontal con el fin de conservar las condiciones de asepsia.

3.3 Medio de cultivo

Para la solución nutritiva se empleó, como base, el medio Cruz-Pizarro (2000), manteniendo en su establecimiento una concentración de nitrógeno con las fuentes nutritivas de NH_4NO_3 , de KNO_3 , y de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, conservando como fuente

de amonio unicamente la primera, variando la proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de acuerdo a cada tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5: Medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000). Las fuentes de nitrógeno fueron modificadas para los cinco tratamientos, y se conservó para el tratamiento 6 (testigo).

Compuesto químico	PM	μM ó mM	mg.L^{-1}
NH_4NO_3^*	80	2.50 mM	200
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$	236	2.50 mM	590
KH_2PO_4	136	1.25 mM	170
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246	1.50 mM	369
KNO_3^*	101	2.50 mM	252.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278	0.09 mM	25
Na Edta	380	0.10 mM	38
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169	5 μM	0.84
H_3BO_3	62	100 μM	6.1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	242	1 μM	0.24
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	287	30 μM	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249	0.1 μM	0.0000249
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238	0.1 μM	0.0000238
Mio-inositol	180	0.55mM	100.
Tiamina	337	0.29 μM	0.1
Piridoxina	205	2.44 μM	0.5
Ac. Nicotínico	123	4.07 μM	0.5
BA	225	2.22 μM	0.5
AIB	203	0.49 μM	0.1
Agar			6000
Azúcar			60000

Fuente: Cruz-Pizarro, (2000).

* Adicionado, en diferentes concentraciones, para la determinación de mejor proporción.

3.4 Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales en el cuarto de cultivo fueron controladas, con una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, manteniendo un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de obscuridad, con una intensidad luminosa de $47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

3.5 Brotación y proliferación de los explantes

Después del establecimiento del experimento se procedió a obtener las muestras a partir de 45 días después de la siembra, considerando las variables de estudio propuestas. Las observaciones se realizaron cada tercer día, por un periodo de 90 días.

3.6 Variables de estudio

1. Formación de brotes: A partir del explante, considerado como nuevo brote cuando se puede observar una brotación adventicia bien diferenciada a partir del nuevo cormillo. Estableciendo el promedio por tratamiento.
2. Número de cormillos neoformados: Contando su número y estableciendo su promedio por tratamiento.

3. Formación de hojas: A partir de los nuevos brotes, se considera hoja cuando se observa la formación de lámina foliar bien diferenciada del nuevo brote. Contando su número y estableciendo su promedio por tratamiento.

4. Longitud de las hojas formadas: Medidas en centímetros a partir de la base de la misma. Obteniendo su promedio por tratamiento a lo largo de todo el experimento.

5. Presencia de raíces y número de raíces formadas en los brotes: Obteniendo el promedio correspondiente por tratamiento.

6. Longitud de raíces: Medidas en centímetros, obteniendo su promedio por tratamiento a lo largo de todo el experimento

7. Diámetro ecuatorial de los cormillos neoformados: Medidas en mm, obteniendo su promedio por tratamiento.

De cada una de las variables se obtuvo su promedio por unidad experimental y por tratamiento a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento.

3.7 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar, teniendo un total de seis tratamientos, siendo el factor de estudio el nitrógeno, utilizando como fuentes el NH_4NO_3 en una solución de 80 g L^{-1} a un nivel de 2.5 mM , para todos los tratamientos, el KNO_3 en una solución de 101 g L^{-1} , a tres niveles (2.5 , 5.0 , y 7.5) y el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, a tres niveles (1.25 , 2.5 , y 5.0), (cuadro 6), con 20 repeticiones por tratamiento, dando un total de 120 unidades experimentales (U.E). La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye, el cual contenía el medio con su tratamiento y explante correspondiente.

Cuadro 6. Tratamientos con las tres fuentes de nitrógeno empleadas y sus diferentes niveles en mM.

TRATAMIENTO	NH_4NO_3 (mM)	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ $4\text{H}_2\text{O}$ (mM)	KNO_3 (mM)	NO_3^- (mM)	NH_4^+ (mM)	RELACIÓN $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	Nitrógeno Total (mM)
1	2.5	0	0	2.5	2.5	1:1	5
2	2.5	1.25	0	5	2.5	2:1	7.5
3	2.5	1.25	5	10	2.5	4:1	12.5
4	2.5	2.5	7.5	15	2.5	6:1	17.5
5	2.5	5	7.5	20	2.5	8:1	22.5
6	2.5	2.5	2.5	10	2.5	4:1	12.5

El tratamiento seis se consideró como testigo, adicionando las fuentes de nutrientes reportadas en el cuadro 5.

Para todos los tratamientos se tomó como medio de cultivo, lo reportado en el cuadro 5, con las variaciones en las concentraciones reportadas en el cuadro 6.

Se realizó el análisis de varianza correspondiente y la comparación de medias para todos los tratamientos por el método de Tukey a un $\alpha \geq 0.5$, en las variables que presentaron diferencias significativas.

En este trabajo se ha utilizado el diseño completamente al azar, puesto que el material que se usó fue tomado de un cultivo *in vitro* con condiciones homogéneas con medio ambiente controlado, y solo variaron las fuentes y concentraciones de nitrógeno del medio de cultivo. A este respecto, Martínez-Garza (1988) menciona que, un caso especial de los diseños experimentales ocurre cuando el material de ensayo es suficientemente homogéneo; se tiene que todas las unidades experimentales reúnen prácticamente las mismas características, de modo que el efecto de un tratamiento sobre la variable bajo estudio, es el mismo, independientemente de la unidad experimental donde se mida. Además, las condiciones de desarrollo en laboratorio garantizan la homogeneidad del experimento. Fundamentado también por lo que menciona Steel y Torrie, (1986): El diseño completamente aleatorio es útil cuando las unidades experimentales son esencialmente homogéneas, es decir, cuando la variación entre ellas es pequeña y agruparlas entre bloques sería poco más que un proceso aleatorio. Este es el caso de muchos tipos de experimentos de laboratorio en los que una cantidad de material esta completamente mezclada y luego se divide en porciones pequeñas para formar las unidades experimentales a los cuales se les asignan los tratamientos en forma aleatoria.

En plantas cultivadas *in vitro*, donde se tiene mayor homogeneidad de las condiciones de cultivo, uno de los criterios que se siguen por investigadores del Colegio de Postgraduados es el de establecer un número de unidades experimentales que sean necesarias, y entre más se incremente el número de repeticiones, se reduce el error experimental, por lo que se vuelve más precisa la prueba. Loma de la (1982) menciona que: La repetición sistemática de las parcelas que reciben tratamientos análogos en una experiencia reduce, en general, el error típico y el error probable y, por tanto, el error experimental, es decir, la variabilidad ajena a la propia experiencia. Al aumentar el número de repeticiones es mayor la precisión del experimento, porque la media de un conjunto de variantes es tanto más precisa cuanto mayor es el número de dichas variantes, es decir, que un promedio merece más confianza a medida que el número de observaciones de que procede es más grande. Desde luego, cuanto mayor sea el número de repeticiones, más grandes serán las probabilidades de obtener resultados ajustados a la realidad. Por lo menos debe establecerse un número de repeticiones lo bastante elevado para poder asegurar una buena determinación de la media y de la desviación típica. El uso de un número adecuado de repeticiones está respaldado por consideraciones importantes de tipo estadístico y las razones de que se dispone para dicho uso son sumamente sólidas; los datos experimentales en que se apoyan son claramente significativos. Una de las consideraciones más fundamentales es que la estimación de la variabilidad debida al azar, o sea, a causas desconocidas, debe basarse en un número suficiente de grados de independencia. Si se cuenta con un número demasiado reducido de grados para el error experimental, el valor de la relación F que se requiere para que la variación producida por el factor en estudio se pueda considerar como significativa, es relativamente grande, lo

que impedirá apreciar diferencias que realmente existan entre los tratamientos correspondientes; es decir, el experimento adolecerá de poca sensibilidad. Esto ocurrirá también al aplicar la prueba de t , pues si el número de grados de independencia para el error experimental es pequeño, la media cuadrática o variación de dicho error, que es cociente de dividir la suma de cuadrados atribuible al mismo por el número de grados de independencia, será grande, y el límite de significación de cualquier diferencia entre las producciones totales o los promedios de los tratamientos será tan elevado, que pocas diferencias resultarán significativas estadísticamente.

Para este experimento, en particular, se consideró un tubo de ensaye como unidad experimental y como repetición para cada tratamiento, pues las condiciones de cultivo *in vitro* permiten el estudio de cada una de las variables en un solo tubo; aquí todos los explantes son iguales por provenir de una clonación, por lo tanto, se esperan comportamientos homogéneos en el experimento y tal condición de homogeneidad en el material experimental, permite que cada tratamiento puede ensayarse con el número de repeticiones que se desee. Al ser las unidades experimentales de tamaño pequeño, permiten concentrar un número mayor de ellas en un espacio reducido, y con ello se mantiene un mayor control de las variables de estudio en un mayor número de repeticiones. Steel y Torrie, (1986) menciona que una unidad experimental, es la unidad de material a la cual se le aplica un tratamiento. Cuando se mide el efecto de un tratamiento, se mide en una unidad de muestreo, cierta fracción de la unidad experimental. La unidad de muestreo puede ser la unidad completa. El mismo autor sostiene que a medida que el número de repeticiones aumenta, las estimaciones de las medias poblacionales, esto es, las medias observadas de los tratamientos, se hacen más

precisas. En ciertos tipos de experimentos, la repetición es un medio de aumentar el alcance de la inferencia de un experimento. La repetición nos permite agrupar unidades experimentales de acuerdo con la respuesta esperada en ausencia de tratamientos. El número de tratamientos afecta la precisión de un experimento y el número de repeticiones necesarias para un grado de precisión dado por ejemplo, si aumentamos el número de tratamientos y mantenemos constante el número de repeticiones para cada uno, entonces aumentamos el tamaño del experimento y el número de grados de libertad para la estimación de σ^2 . El número de repeticiones puede reducirse si no se requiere un aumento de precisión. Por otra parte, si mantenemos constante el tamaño del experimento, entonces un mayor número de tratamientos implica menos repeticiones de cada uno de ellos y menos grados de libertad para estimar σ^2 , como resultado se tiene menor precisión. El número de repeticiones debe aumentarse para lograr una precisión fijada. Todo este razonamiento es más apropiado para experimentos pequeños, por ejemplo, con menos de 20 grados de libertad en el error. Los grados de libertad dependen del número de repeticiones, del número de tratamientos y del diseño experimental. Cuando el número de grados de libertad es menor a 20, bien vale la pena incrementar la precisión. Así por ejemplo, obsérvese que $t_{0.025}$ para 5 grados de libertad, es 2.57; para 10 grados de libertad, 2.23; para 20 grados de libertad, 2.09 y para 60 grados de libertad, 2.00. el valor de t a todo nivel de probabilidad disminuye notablemente por cada grado más de libertad hasta llegar a 20; más allá de este valor, la disminución es lenta.

En este experimento se usó la prueba F para comprobar diferencias reales entre los seis tratamientos, pero mejor aun, para este caso de comparaciones múltiples entre

medias poblacionales con igual número de repeticiones para cada tratamiento, el método de Tukey es aplicable a pares de medias y con un solo valor se puede juzgar la significancia de todas las diferencias. En este caso, todas los pares de medias constituyen una familia y su tasa de error es para todas.

El valor crítico calculado se aplica a las diferencias de todos los pares de medias, en una tasa de error de $\alpha = 0.05$. Así en experimentación repetida, cuando todas las medias poblacionales son iguales, el 5 % de las familias o conjuntos de diferencias tendrían una o mas declaraciones de significancia falsas, y el 95 % de ellas, no se harían declaraciones de una diferencia significativa (Steel y Torrie, 1986).

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Número de brotes y número de cormillos neoformados.

Los resultados muestran los promedios para estas variables, de donde se obtuvo un mayor número de brotes y de cormillos neoformados para los tratamientos 1, 4, y 6 (testigo), en los que la proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ corresponde a 1:1, 6:1, y 4:1 respectivamente, (Figura 5 y Cuadro 7). De acuerdo con la prueba estadística de Tukey, no existió diferencia significativa entre las medias obtenidas en todos los tratamientos.

El promedio general para el número de brotes formados fue de 2.76 brotes por explante, estos se desarrollaron a partir de una brotación adventicia originada en la base del cormillo.

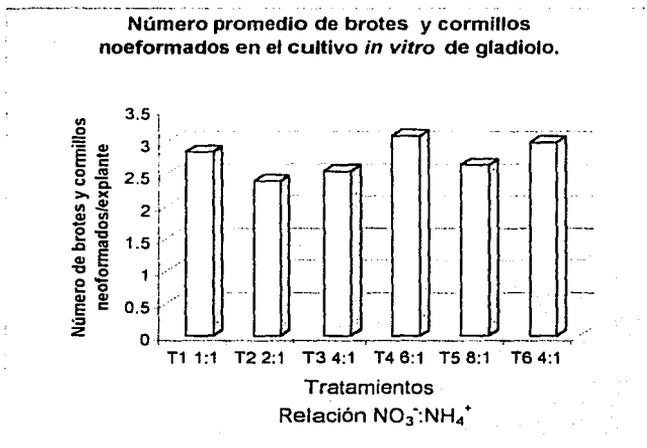
Se obtuvo un mayor número de brotes para la proporción 6:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (tratamiento 4) con un promedio de 3.1 brotes por explante (cuadro 7). Similar resultado es reportado por Zlenko et al. (1995), en *Vitis vinifera*, donde recomienda que la proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ sea modificada en 6:1. Estos resultados se acercan a lo reportado por Abu-Qaoud et al. (1991), Gavidia y Pérez-Bermudez (1997), Cruz-Pizarro (2000), y Luciani et al. (2000), en cultivares de pera, *Digitalis*, vid y ajo, respectivamente, donde se obtuvo el mayor número de brotes al incrementar la concentración de NO_3^- en la proporción $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$.

El menor número de brotes formados correspondió al tratamiento 2 en proporción 2:1 con un promedio de 2.4 brotes por explante, lo que representa el 77% del máximo obtenido. Este resultado no concuerda con lo reportado por Leblay *et al.* (1991), y Lillo (1989), en cultivares de pera y papa, donde encontraron que el mejor desarrollo de brotes fue a bajas concentraciones de nitrógeno como NO_3^- , (proporción 2:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$). Esto muestra que la concentración óptima de nitrógeno y la relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ difiere de una especie a otra.

Para el tratamiento 5 con una proporción 8:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ el promedio de brotes disminuyó a 2.65 brotes por explante, coincidiendo con lo reportado por Kalpana *et al.* (1997) en cultivares de *Eleusine coracana*; Taylor y Staden (2001) en cultivares de *Eucumis autumnalis*, mencionan que altas concentraciones de nitrógeno, por arriba de su óptimo, redujeron el número de brotes, pero en menor grado.

Para la variable número de cormillos neoformados, los resultados fueron similares al número de brotes, el promedio general fue de 2.82 cormillos neoformados, y se obtuvo un mayor número de cormillos nuevos en el tratamiento 4 (proporción 6:1 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) con 3.1 cormillos promedio por unidad experimental. Y el menor número de cormillos nuevos para el tratamiento T2 con 0.6 cormillos nuevos promedio por explante. Estos resultados están muy relacionados con la formación de brotes, puesto que se obtuvo en general un cormillo nuevo por cada brote.

Figura 5. Número promedio de brotes por cormillo, y cormillos neoformados en el cultivo *in vitro* de gladiolo.



De acuerdo al análisis de varianza de las variables número de brotes y cormillos neoformados muestra que no se encontró diferencia significativa entre tratamientos (cuadros 12 y 13, anexo), sin embargo, se pueden observar diferencias propias para su análisis, donde se ve que altas concentraciones de nitrógeno como NO_3^- presentaron mejor respuesta en el desarrollo de los explantes para estas variables (figura 5).

Cuadro 7. Comparación de promedios para la variable número de brotes (V1) y cormillos neoformados (V2), a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo.

TRATAMIENTO	PROMEDIO V1	PROMEDIO V2
1	2.85a	2.85a
2	2.40a	2.50a
3	2.55a	2.75a
4	3.10a	3.10a
5	2.65a	2.70a
6	3.00a	3.05a
PROMEDIO GENERAL	2.758	2.825
Valor de w en la prueba de Tukey	1.37	1.40

Todos los valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey a una P de ≤ 0.05

2. Número de hojas

El promedio general para el número de hojas fue de 3.1 hojas por explante, con el mejor tratamiento para 6 (testigo) en la proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ con un promedio de 4 hojas por explante. Se observó que para proporciones mayores el número de hojas disminuyó. El menor número de hojas (2.65 por cormillo, lo que representa el 66 % del máximo valor), se presentó en el tratamiento 3 en una proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. Con estos resultados podemos observar que altas concentraciones de nitrógeno como nitrato dieron mejores resultados en el desarrollo de hojas por explante, sin embargo, al

aumentar la concentración por encima del nivel óptimo, los resultados se ven afectados. Es posible que estas concentraciones altas de nitrógeno hayan causado un efecto tóxico en los explantes disminuyendo su número de hojas.

Los resultados de los promedios obtenidos para esta variable se pueden observar en la Figura 6 y el Cuadro 8, La comparación de medias por el método de Tukey muestran que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos (cuadro 14, anexo)

Similares resultados se presentan en lo reportado por Cruz-Pizarro (2000) donde el mayor número de hojas, en explantes de vid, se obtuvo en la proporción 6:1 de NO_3^- : NH_4^+ , y en mayores proporciones tendió a disminuir.

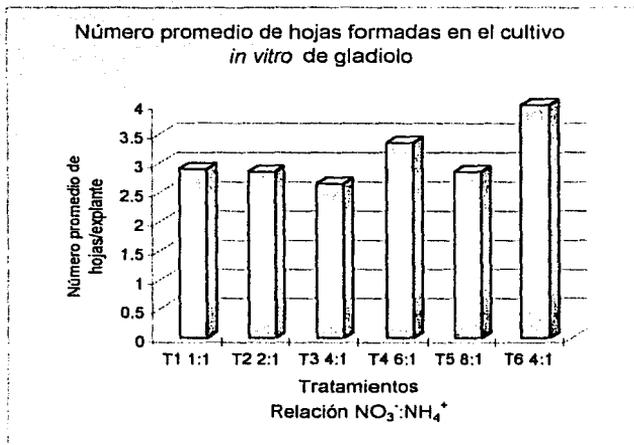
Los resultados comparados con lo que señala Elkonin y Pakhomova (2000), son análogos, donde un incremento en la concentración de nitrógeno aportado como nitrato, significativamente elevó la inducción de callos en sorgo,. A este respecto Luciani et al. (2000) menciona que el uso de altos niveles de nitrógeno, aportado como nitrato, mejora el índice de multiplicación en ajo.

Los tratamientos 3 y 6 difieren entre sí, a pesar de tener la misma relación NO_3^- : NH_4^+ . (4:1). Esto se debe fundamentalmente a la fuente de nitrógeno empleada, el tratamiento 6 (Testigo) se le adicionó una concentración de 2.5 mM. de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 2.5 mM de KNO_3 (relación 1:1 Ca^{++} : K^+) como fuentes de nitrógeno, mientras que para el tratamiento 3 solo se emplearon 1.25 mM. de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ por 5 mM. de KNO_3 (cuadro 6).

Es posible que el efecto del calcio en una más alta concentración haya inhibido el efecto toxico de otras sales, tal como lo menciona Bidwell (1979), ocasionando que el tratamiento 6 haya obtenido mayor número de hojas. Además, una reducción en la concentración de Ca^+ determina deterioro en la planta (Bidwell, 1979) como pudo haber sucedido en el tratamiento 3.

Los resultados se relacionan con lo obtenido por Lumsden *et al.* (1990) en donde menciona que el K^+ es asimilado con menor rapidez que los demás nutrientes, con lo que se deduce que la concentración de este nutriente no influyó lo suficiente en los resultados.

Figura 6. Número promedio de hojas formadas a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo



Cuadro 8. Comparación de promedios para la variable número de hojas (V3) a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo.

TRATAMIENTO	PROMEDIO
1	2.90a
2	2.85a
3	2.65a
4	3.35a
5	2.85a
6	4.00a
PROMEDIO GENERAL	3.10
Valor de w en la prueba de Tukey	1.55

Todos los valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey a una P de ≤ 0.05

3. Longitud de hojas

Para esta variable, el promedio general para todos los tratamientos fue de 1.93 cm. por explante, con la mayor longitud de 2.98 cm promedio por explante para el tratamiento 6 (testigo) en una proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, seguido muy por abajo por los tratamientos 5 y 4 (1.89 y 1.8 cm promedio por explante, respectivamente) en proporción 6:1 y 8:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. Esto coincide con lo reportado por Abu-Qaoud et al. (1991) donde obtuvieron la mayor longitud de brote para la proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$.

El tratamiento 1 con una proporción 1:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ fue el que obtuvo el menor promedio en longitud de hojas (1.54 cm, lo que representa el 51 % del máximo obtenido.) similar resultado reporta Abu-Qaoud et al, (1991) encontrando un mínimo desarrollo de los explantes en el medio donde la concentración de nitrógeno fue baja. Estos resultados también se asemejan a lo reportado por Gavidia y Pérez-Bermúdez (1997) en que las proporciones 1:1 y 2:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ presentaron las longitudes de hoja más bajas.

Los resultados son aproximados a lo obtenido por Leblay et al. (1991) y Cruz-Pizarro (2000) donde la menor longitud la obtuvieron en una proporción 2:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. A este respecto Cao y Tibbits (1998) mencionan que los rangos óptimos en la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo son más amplios y altos con NO_3^- que con NH_4^+ . También es importante mencionar lo reportado por Abu-Qaoud et al, (1991) en pera, menciona que cuando no se incluye amonio al medio, no se obtiene desarrollo de brotes.

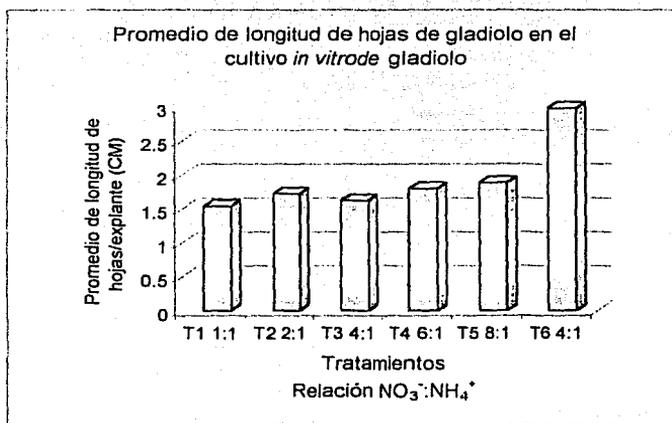
Los promedios obtenidos para la variable longitud de brotes se muestran en la figura 7 y el cuadro 9. Se encontró que los tratamientos 1, 2, 3, 4, y 5 no presentaron diferencia significativa entre sus medias para la prueba de Tukey. Sin embargo, al hacer la comparación de medias de estos tratamientos con el tratamiento 6 (testigo), se obtuvo altamente significativa para la prueba de Tukey (cuadro 15, anexo)

Con respecto a brotación, número y longitud de hojas, los mas altos índices de estas variables nos aseguran una mejor proliferación de los explantes, puesto que entre mayor es el número de hojas y su longitud, la calidad de la plantula se eleva al

predisponer un tallo o pseudotallo mas vigoroso y con mas posibilidades de aclimatación y desarrollo en los siguientes estados de cultivo. Además, la mayor longitud puede tener como consecuencia un número mayor de flores en la planta.

Nuevamente se observa que la proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ para el tratamiento 6 dio los mejores resultados, no así para el tratamiento 3 con la misma proporción, se puede inferir en la posible actuación del Ca^{++} , en una concentración mayor para el tratamiento 6, como inhibidor de toxicidad de sales (Bidwell, 1979).

Figura 7. Promedio de longitud de hoja a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo.



Cuadro 9. Comparación de promedios para la variable longitud de hojas (V4) a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo.

TRATAMIENTO	PROMEDIO
1	1.54a
2	1.72a
3	1.62a
4	1.80a
5	1.89ab
6	2.98b
PROMEDIO GENERAL	1.93
Valor de w en la prueba de Tukey	1.13

Todos los valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey a una P de ≤ 0.05

4. Formación y longitud de raíces.

A los 17 días, después de colocar los cormillos en el medio de cultivo, se empezó a notar la brotación de raíces en la base de los mismos para la mayoría de los tratamientos, pero se evaluó la respuesta total a los 45 días.

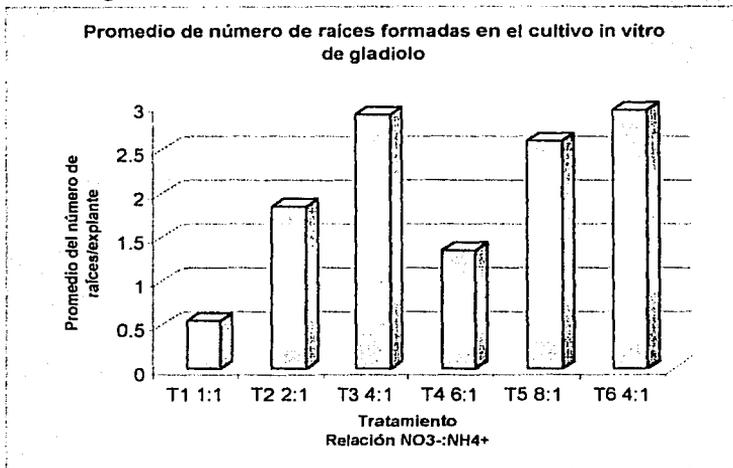
El promedio general de raíces formadas para todos los tratamientos fue de 2.033 raíces por cormillo, y se obtuvo el mayor número de raíces (2.95 raíces por cormillo) para el tratamiento 6 (testigo) en la proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, seguida por el tratamiento 3 (2.9 raíces por cormillo) en una proporción igual de 4:1 pero con diferente concentración

de nitrógeno (figura 8, cuadro 10). Y para la menor brotación de raíces (0.55 raíces por cormillo, lo que representa tan solo el 18 % del máximo obtenido), se dio en el tratamiento 1 con la proporción 1:1, es decir, para el mejor tratamiento con 12.5 mM de N total, y 5 mM de N total para el tratamiento mas bajo.

Estos resultados se asemejan a lo obtenido por Bensaddek , et al., (2001) en donde encontró que el aumento en la concentración de amonio causo un descenso en la formación de pelos radicales, y demostraron que la mas alta producción de raíces se dio en una proporción de 4.81:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. Esto se asemeja de lo obtenido por Bon et al. (1998) y Cruz-Pizarro (2000) en el que altos niveles del cation nitrato dieron los mejores resultados, y con similar resultado para el mínimo de raíces brotadas en el que en general las proporciones bajas en nitrógeno obtuvieron menor número de raíces. Teniendo una diferencia altamente significativa en la comparación de medias (cuadro 16, anexo).

La longitud de raíces tuvo un promedio general de 1.303 cm de longitud para todos los tratamientos. El promedio máximo de longitud en raíz se obtuvo para el tratamiento 6 (testigo, 2.48 cm por cormillo) en la proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, y la menor longitud (0.3 cm por cormillo, lo que representa solo el 12 % del máximo obtenido) se registra en el tratamiento 1 con una proporción 1:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (figura 9, cuadro 10) Estos resultados fueron altamente significativos en la comparación de medias (cuadro 17). Es necesario hacer notar que el tratamiento 3 con una proporción 4:1 pero con diferente fuente de nitrógeno, también presento buenos resultados.

Figura 8. Promedio de número de raíces formadas a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo

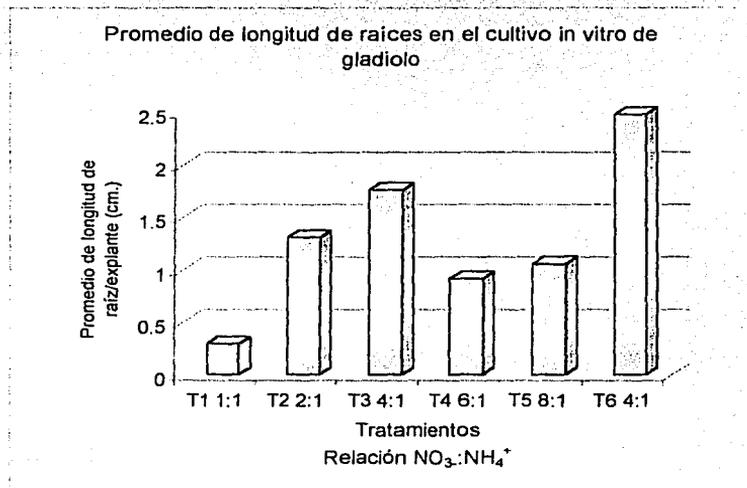


Cuadro 10. Comparación de promedios para la variable número de raíces brotadas (V5) y longitud de raíces (V6), a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo.

TRATAMIENTO	PROMEDIO V5	PROMEDIO V6 (cm)
1	0.55a	0.30a
2	1.85ab	1.31ab
3	2.90b	1.76bc
4	1.35ab	0.92ab
5	2.60b	1.05ab
6	2.95b	2.48c
PROMEDIO GENERAL	2.03	1.303
Valor de w en la prueba de Tukey	1.77	1.11

Todos los valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey a una P de ≤ 0.05

Figura 9. Promedio de longitud de raíces a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo.

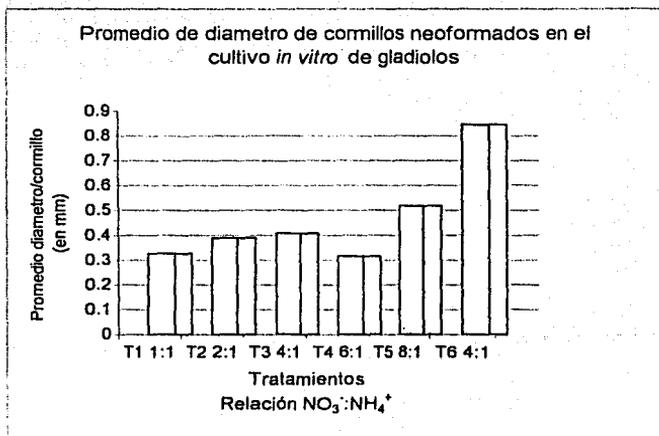


5. Diámetro de los cormillos neoformados.

El promedio general de esta variable fue de 4.6 mm. de diámetro por cormillo neoformado a partir del explante. Esta longitud se puede considerar buena de acuerdo con lo que menciona Dantu y Bhojwani (1995), en el estudio realizado para evaluar la formación de cormos en plantas de gladiolo, donde obtuvo pequeños cormillos de 4-5 mm de diámetro después de 8 semanas de cultivo *in vitro*.

El mayor diámetro de los cormillos se obtuvo en el tratamiento 6 (testigo) con 8.45 mm de longitud por cormillo a una proporción de 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. Este tratamiento superó altamente a los demás tratamientos (figura 10, cuadro 11), al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey, fue altamente significativa (cuadro 18, anexo). La menor longitud de diámetro se obtuvo en el tratamiento 4 (3.15 mm de diámetro por cormillo, lo que representa el 37 % del máximo valor obtenido), en una proporción 6:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Cao y Tibbits (1998) y Cruz-Pizarro (2000) quienes mencionan que altas concentraciones de nitrógeno en su forma NO_3^- da mejores resultados en la proliferación de explantes.

Figura 10. Promedio de diámetro de los cormillos neoformados a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolos.



Cuadro 11. Comparación de promedios para la variable diámetro de cornillos neoformados (V7) a partir del explante en el cultivo *in vitro* de gladiolo.

TRATAMIENTO	PROMEDIO (mm)
1	3.26ab
2	3.88bc
3	4.07b
4	3.15a
5	5.17d
6	8.45e
PROMEDIO GENERAL	4.66
Valor de w en la prueba de Tukey	0.66

Todos los valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey a una P de ≤ 0.05

V. CONCLUSIONES

1. Existe una respuesta diferencial al aporte de nitrógeno en diferentes concentraciones y proporciones de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ para las variables número de brotes, cormillos neoformados, número y longitud de hojas, formación y longitud de raíces, y diámetro ecuatorial de los cormillos neoformados en el cultivo *in vitro* de *Gladiolus*.
2. El mayor número de hojas y la mejor longitud de hojas se obtuvo al aportar 12.5 mM de nitrógeno total (proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, tratamiento 6)
3. El mayor número de raíces y la mayor longitud de raíces se obtuvo al aportar 12.5 mM de nitrógeno total (proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, tratamiento 6)
4. El mayor diámetro ecuatorial de los cormillos neoformados se obtuvo al aportar 12.5 mM de nitrógeno total (proporción 6:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, tratamiento 6)
5. En el número de brotes y cormillos neoformados, la mejor concentración de nitrógeno total fue de 17.5 mM (proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, tratamiento 4)
6. En general, para el buen desarrollo de plantas de gladiolo cultivadas *in vitro*, la proporción 4:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (Tratamiento 6), presentó los mejores resultados con una misma proporción de los cationes Ca^{++} y K^+ (1:1).

7. Las concentraciones bajas de nitrógeno total en las proporciones 1:1 y 2:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ y concentraciones altas de nitrógeno total en la proporción 8:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ disminuyen la proliferación y desarrollo de los brotes de gladiolo.
8. Al emplear, a mayor concentración, el ión Ca^{++} en la fuente $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ influyó en el mejor desarrollo y proliferación de los brotes de gladiolo.
9. Los brotes y las hojas de gladiolos cultivados in vitro no presentaron toxicidad aparente por amonio, debido a que solo se manejo una concentración baja de NH_4^+ , (2.5mM)
10. La concentración de 12.5 mM de nitrógeno total, que presento una mejor respuesta a la organogénesis, corresponde al 20 % de lo que se utiliza en otros medios con mayor aporte nutricional.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Qaoud Hassan, R.M Skirvin y F. E Below. 1991. Influence of nitrogen form and $\text{NH}_4^+ \text{-N} / \text{NO}_3^-$ ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27: 315-319.
- Agüera, E., P. de la Haba, A. G. Fontes, y J. M. Maldonado. 1990. Nitrate and nitrite uptake and reduction by intact sunflower plants. Planta. 182:149-154.
- Amirato, P.V., D.A Evans, W.R Sharp, Y.P. Bajaj. 1990. Gladiolus. Handbook of Plant Cell Culture Ornamental Species. Ed. McGraw Hill, p 461-479
- Aoki, T., H. Matsumoto, Y. Asako, Y. Matsunaga, K. Shimomura. 1997. Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 16: 282-286.
- Arnold, N. P., M.R. Binns, D.C. Cloutier, N.N. Barthakur, y R. Pellerin. 1975. Auxins, salt concentrations and their interactions during *in vitro* rooting of winter-hardy and hybrid tea roses. HortScience. 30:1436-1440.
- Avila L, A., S.M. Pereyra, y J.A Argüello. 1998. Nitrogen concentration and proportion of $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ effect potato cultivar response in solid and liquid media. HortScience. 33: 336-338.
- Azcom Bieto J., y M. Talon. 1996. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Edt. Interamericana. Primera edición en español 1993. p p. 200-225, 381-392.

- Bajaj, Y.P.S., M.M.S. Sidhu, y A.P.S. Gill. 1983. Some factors affecting the *in vitro* propagation of gladiolus. *Scientia Hort.* 18: 269-275. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. Netherlands.
- Bensaddek, L., F. Gillet, J. E. Nava Saucedo, M.-A. Fliniaux. 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *Journal of Biotechnology.* 85: 35-40
- Bergman, B.A., Y.H. Sun, y A. Stomp. 1997. Harvest time and nitrogen source influence *in vitro* growth of apical bud from fraser fir seedlings. *HortScience.* 32: 125-128.
- Berlin, J., H. Beier, L. Fecker, W. Noé, F. Sasse, O. Schiel, V. Wray. 1985. Conventional and new approaches to increase the alkaloid production of plant cell cultures. En Bensaddek *et al.*, (2001). The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *Biotechnology* 85: 35-40
- Bidwell R. G. S. 1979. *Fisiología Vegetal*, primera edición en español, editorial A.G.T. editor S.A. pp. 216 - 217, 265-280.
- Bird, Kimon T., J. R. Johnson, J. Jewett-Smith. 1997. *In vitro* culture of sea grass *Halophyla decipiens*. *Aquatic Botany.* 60: 377-387.
- Boccon, G. J., 1984. Les Besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques, pp. 41-46, en Bailliere, J. B. (ed). *La culture in vitro et ses application horticoles*. Lavoisier, Paris.
- Bon, M. C., D. Bonal, D. Goh, y O. Monteuis. 1998. Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* explants. *Plant Cell, tissue Organ Culture.* 53: 171-177.

- Bramwell, D., 1990. The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. En: Hernández Bermejo, et al. 1990. Proc int. Congress of conserve. Techniques in Botanic Gardens. Koeltz Scientific Books, pp. 3-15.
- Bravdo, B., S. Mayak, y Y. Gravieli. 1974. Sucrose and water uptake from concentrated sucrose solutions by gladiolus shoots and the effect of these treatments on floret life. Can. J. Bot. 52, 1271-1281.
- Buch, P. O. 1972. The species . en "*The World of the Gladiolus*" p.p. 2-7. Edgewood Press, Maryland.
- Cao, Weixing., y T. W. Tibbits. 1998. Response of potatoes to nitrogen concentrations differ with nitrogen forms. Journal of Plant Nutrition. 21(4), 615-623.
- Capellades M., P. Vanderschaeghe, y P.C. Debergh. 1991. Ornamentals. En Micropropagation technology and application. Debergh P.C. and Zimmerman. R.H Klumer Academic Publishers. Netherlands. p 215-220.
- Chaleff, R. S. 1983. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2, 29. En Gavidia y Pérez-Bermúdez. 1997. *Digitaliz obscura* Cardenolidez. Effect of macronutrient concentration and N source on growth and productivity of shoot-tip cultures. Phytochemistry, vol. 46, 2, pp. 273-278.
- Cormier, F. 1991. Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension cultured in a production medium . Plant Cell, Tissue Organ Cult. 27: 169-174.
- Crawford N. M., y H.N. Jr. Arst. 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. Genet. 27: 115-46. En Lam et al. 1996. The molecular genetics of

- nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-93
- Crawford, N.M., 1995. Nitrate:nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* 7: 859-868. En Bensaddek et al. 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *Journal of Biotechnology*. 85: 35-40
- Cruz-Pizarro, F. 2000. Niveles de sacarosa y relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en el cultivo *in vitro* de brotes de vid (*Vitis vinifera*) "Málaga Roja". Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. 78 p.
- Dantu Prem K., S.S. Bhojwani 1992. *in vitro* propagation of *Gladiolus*: Optimization of conditions for shoot multiplication. *Journal Biochem. Biotechnol.* 1:115-118.
- Dantu Prem K., S. S. Bhojwani. 1995. *in vitro* corm formation and field evaluation of corm-derived plants *Gladiolus*. *Scientia Hort.* 61: 115-119.
- David, A., David, H., and Mateille, T., 1982. *Physiol. Plant.* 56, 102.
- Delgado E., R.A.C. Mitchell, M.A. Parry, S.P. Driscoll, B.J. Mitchell, D.W. Lawlor. 1994. Interacting effects of CO_2 concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat levels. *Plant Cell Environ.* 17:1205-13.
- Dougall, D. K. 1982. Nutrition and metabolism 22-49. In E. J. Staba edit. *Plant tissue culture as a source of biochemical*. CRC Press. Florida.
- Elkonin, L. A., y N. V. Pakhomova. 2000. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embriogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 61: 115-123.

- Epstein, E. 1972 Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. En Salisbury y Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana S.A. de C.V. primera impresión en español, México. pp. 164-165.
- Fillipini, R. , R. Caniato, E.M. Capelletti, A. Piova, G. Innocenti. 1994. *in vitro* regeneration of *Aplophyllum patavinum* (L) G. Don fil., a rare and endangered plan. Bot. Garden Micropropagation News 1(7), 87-90.
- Flinn, B.S., D.T Webb, y W. Georgis. 1986. Canadian Journal of Botany. 64. En: Gavidia, y Pérez-Bermudez. 1997. *Digitaliz obscura* Cardenolidez. Effect of macronutrient concentration and N source on growth and productivity of shoot-tip cultures. Phytochemistry, vol. 46, 2, pp. 273-278.
- Forsberg, J.L., 1961. Hot water and chemical treatment of Illinois grown gladiolus cormels. III Nat. Hist. Surv. Biol. Notes. 43, 1-12.
- Gamborg, O. L., R.A. Miller, y K. Ojima. 1968. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- Gamborg, O. L., y J. P. Shyluk, 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. Plant Physiol. 45: 598-600.
- Gavidia, I., y Pérez-Bermudez, P. 1997. *Digitaliz obscura* Cardenolidez. Effect of macronutrient concentration and N source on growth and productivity of shoot-tip cultures. Phytochemistry, vol. 46, 2, pp. 273-278.
- Greving J. A. 1992. Growing *Gladiolus*. Neb Guide. Published by Cooperative Extension. Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln. pp. 1-8.

- Griesbach, R. A. 1972. The life structure and function in *Gladiolus*. En The World of *Gladiolus* (N. Koenig y W. Crowley, eds.), North Am. Glad. Council Edgerton Press, Md. pp. 8-40
- Hartmann, H. T., D.E. Kester, F. T. Davies Jr., 1990. Plant propagation: Principles and practices. 5th ed. Prentice Hall. pp. 496-525.
- Hoff T., H. N. Truong, y N. Caboche. 1994. The use of mutants and transgenic plants to study of nitrate assimilation. *Plant Cell Environ* 17:489-506. . En Lam et al. 1996. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-93.
- Hopkins W. G. 1995. Introduction to Plant Physiology. Second edition. Edit. John Wiley and Sons, Inc. pp. 99-120.
- Hughes, K. W. 1981. Ornamental species . En Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques (B. V. Conger, ad.9, pp. 5-50. CRC Press, Boca Raton, Fla. De P. V. Amirato 1990).
- Hussey, G. 1977. In vitro propagation of gladiolus by precocious axillary shoot formation. *Scientia Hort.* 6:287-296. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. Netherlands.
- Kalpna P., R.K. Vishnoi, S.L Kothari. 1997. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coranaca* (L) Gaertn on higher concentrations of NH_4NO_3 as a replacement of NAA in the medium. *Plant Science* 129:101-106.
- Kamo K. 1995. Stable transformation of *Gladiolus* using suspension cells and callus. *J. of Am. Soc. for Hort. Sci.* 120: 347-352.

- Knop W. 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. Landwirtsch. Vers. Stn. 7: 93-107.
- Kite L. 1990. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Timber Press, Oregon. 160 p.
- Kofranek, A. M., y A. H. Halevy. 1976. Sucrose of gladiolus stems before storage to increase spike quality. HortScience. 11: 572-573.
- Kumar, A., A. Sood, L.M.S. Paini, y A.K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 57: 105-112.
- Lal R. y S. Lal. 1990. Crop improvement utilizing biotechnology. CRC Press Boca Raton, Florida 1980. p 80-88.
- Lam, H. M., K.T. Coschigano, I. C. Oliveira, R. Melo-oliveira, G. M Coruzzi. 1996. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 569-93.
- Larson, R. A. 1988. Introducción a la Floricultura. A.G.T. editor S.A. primera edición en español, pp. 147 – 162.
- Leblay C., E. Chevreau, y L. M. Raboin. 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pears cultivars (*Pyrus communis*). Plant cell, Tissue and Organ Cult. 25: 99-105.
- Lewis, G. J., A. A. Obermeyer, y T. T. Bernard. 1972 *Gladiolus*- A revision of the south African species. J. S. Afr. Bot. 10.

- Lillo C. 1989. Effects of media components and environmental factors on shoot formation from protoplast-derived calli of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 19: 103-111.
- Logan A. E., y F. W. Zettler. 1985. Rapid *in vitro* Propagation of virus-indexed gladioli. *Acta Hort.* 164: 169-180. En Dantu and Bhojwanni. 1995. *In vitro* corm formation and field evaluation of corm-derived plants *Gladiolus*. *Scientia Hort.* 61: 115-119.
- Loma de la, Jose Luis, 1982. Experimentación agrícola. Edit. Hispanoamericana S.A. de C.V. México. pp. 248-257.
- Luciani G. F., P. A. Marinangeli, W. R. Curvetto. 2001. Increasing nitrate/ammonium ratio for improvement of garlic micropropagation. *Scientia Hort.* 87:1-20.
- Lumsden, P.J., S. Pryce, y C. Leifert. 1990. Effect of mineral nutrition on de growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. Tomado de Nijkamp, H.J.J. y L.H. W. Van Per Plas. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Klumer Academic Publishers, pp. 108-113, 119-124.
- Lloyd, G. Y B. McCown. 1980 Comercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- Magie, R.O., 1971. Effectiveness of treatments with hot water plus benzimidazoles and ethephon in controlling fusarium disease of gladiolus, plant dis rep. 55, 82-85.
- Magie, R.O., y S.L. Poe. 1972. Disease and pest associates of bulb and plant. In "The World of the Gladiolus" pp. 155-181.
- Malda G., H. Suzán , R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Hort.* 81:71-87.

- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid España. p. 230.
- Martínez, F. G. L. 1995. Elementos de Fisiología Vegetal. Ediciones Mundi Prensa S.A. Primera Edición. pp. 249-263.
- Martínez Garza Angel. 1988. Diseños experimentales. Métodos y elementos de teoría. Edit. Trillas. Primera edición México. pp 149-157.
- Mayak, S. , B. Bravdo, A. Guilli, y A. H. Halevy. 1973. Improvement of opening of cut gladioli flowers by pretreatment with high sugar concentrations. *Scientia Hort.* 1: 357-365.
- Millholand, R.D., y R. Aycock. 1965. Propagation of disease-free gladiolus from hot-water treated cormels in southeastern North Carolina, N. C., *Agric. Exp. Stn. Tech. Bull.* 168.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Niedz, R. P. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 39:1-5.
- Nitsch, J.P., y C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science.* 163:85-87.
- Nye, P. H., y P. H. Tinker. 1977. Solute Movements in the Root-Soil System. Blackwell, Oxford, England. En Salisbury y Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana S.A. de C.V. primera impresión en español, México. pp. 141-143, 319-336.

- Pérez-Bermúdez, P., y H. E. Sommer. 1987. Plan Cell Tissue and Organ Culture, 11, 25. En Gavidia, Isabel y Pedro Pérez -Bermudez. 1997. *Digitaliz obscura Cardenolidez*. Effect of macronutrient concentration and N source on growth and productivity of shoot-tip cultures. *Phytochemistry*, vol. 46, 2, pp. 273-278.
- Pierik, R.M.L. 1990. *in vitro* culture of higher plants. 3th. Ed. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands. p. 325.
- Quoirin, M., y P. Lepoivre. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Hort.* 78:437-442.
- Remotti P. C., y H.J. M. Löffler. 1995. Callus induction and plant regeneration from *gladiolus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 171-178.
- Richter, G., 1993. *Métabolisme des Végétaux, physiologie et Biochimie*. Presses Plytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, pp. 341-344.
- Salisbury, B. F. y C. W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Edt. Iberoamericana S.A de C.V. primera impresión en español, México. pp. 141-143, 319-336.
- Salunkhe, D. K., Bhatt, N. R., Desai, B. B. 1990. *Postharvest Biotechnology of Flowers and Ornamental Plants*. Firts published. Naya Proka Sh: Calcutta-Six. P.p. 185-201.
- Schenk R.U. y A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Sen J. y S. Sen. 1995. Two-step bud culture technique for a high frequency regeneration of *Gladiolus* corms. *Scientia Hort.* 64:133-138.

- Steel, G. D. - R. Torrie, H. J. 1986. Bioestadística, principios y procedimientos. Edit McGraw-Hill, primera edición en español, México. pp. 118-187.
- Sutter, E. G. 1986. Micropropagation of *Ixia viridiflora* and a *Gladiolus x Homoglossum* hybrid. *Sci. Hort.* 29:181-189.
- Sutton, J., 1978. The production of virus-free *Gladiolus* using meristem culture. *Proc XXth Intl. Hort. Cong. Sydney, Australia.* En Ziv y Kipnis, 1990. *Gladiolus. Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species*, por Amirato P. V. , *et al.* edit. McGraw-Hill, pp. 461-477.
- Taylor J. L. S., y J. V. Staden. 2001. The effect of nitrogen and sucrose concentrations on the growth of *Eucomis autumnalis* (Mill) Chitt, Plantlets *in vitro*, and on subsequent anti-inflammatory activity in extracts prepared from the plantlets. *Plant Growth Regulation.* 34: 49-56.
- Tompkins, G. A., W. A. Jackson, y R. J. Volk. 1978. Accelerate nitrate uptake in wheat seedlings effects of ammonium and nitrite pretreatments and of 6-mehylpurine and puromycin. *Physiol. Plant.* 43: 166-171.
- Van der Linde. 1988. *In vitro* propagation of *Iris hollandica* Tub. Prof Blaauw. I. Regeneration on bulb scale explants. *Acta Hort.* 226: 121-128.
- Van der Linde, y Shipper 1992. micropropagation of *Iris*. *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 20 High Tech and Micropropagation p.p. 173-197.
- Wang, Q., H. Tang, Y. Quan, y G. Zhou. 1994. Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of "Fuji" apple and "Jinhua" pear cultured *in vitro*. *Journal of Hort. Sci.* 69: 833-839.

- Wetherell, D. F. y D. K. Dougall. 1976. *Physiologia Plantarum*, 37, 97. En Gavidía, Isabel y Pedro Pérez -Bermúdez, 1997. *Digitalis obscura* Cardenolidez. Effect of macronutrient concentration and N source on growth and productivity of shoot-tip cultures. *Phytochemistry*, vol. 46, 2, pp. 273-278.
- White, P.R. 1943. *A Handbook of plant tissue culture*. The Jacques Cattell Press, Lancaster, PA. En Abu-Qaoud Hassan, R.M Skirvin y F. E Below. 1991. Influence of nitrogen form and $\text{NH}_4^+/\text{N}/\text{NO}_3^-$ ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27: 315-319.
- Wilfret, G. J. 1970. A critical evaluation of the commercial gladiolus cultivars grown in Florida. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 83, 423-427.
- Wilfret, G. J. 1980. *Gladiolus*. En Larson, R.A 1988. *Introducción a la Floricultura*. Edt. Academic Press, primera edición en español, pp. 147-162.
- Williams, R.R. 1991. Factors determining mineral uptake *in vitro*. *Acta Hort.* 289: 165-166.
- Ziv, M. 1979. Transplanting *Gladiolus* Plants Propagated *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 11: 257-260.
- Ziv, M. 1989. Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured *Gladiolus* buds by growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17: 101-110.
- Ziv M., y Lilien-Kipnis H. 1990. *Gladiolus*. En *Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species*, por Amirato P. V. , *et al.* edit. McGraw-Hill, 1990. pp. 461-477.

- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En Debergh, P.C., y Zimmerman, R.H., (eds) Micropropagación. Dordrecht, Netherlands. p.p. 45-69.
- Zlenco, V. A., L.P. Troshin, y I.V. Kotikov. 1995. An optimized medium for clonal micropropagation of grapevine. 34: 125-126.

ANEXO

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable cormillos brotados

f v.	g.l.	SC	CM	Fc	Ft	
Trat .	5	7.34166667	1.46833333	0.657333595	2.29 5%	Ns
error	114	254.65	2.23377193		3.17 1%	
total	119	261.991667				

CV= 54.19%

Ns : No significativo

** : Altamente significativo

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable cormillos neoformados

f v.	g.l.	SC	CM	Fc	Ft	
Trat.	5	5.075	1.015	0.43135135	2.29 5%	Ns
error	114	268.25	2.35307018		3.17 1%	
total	119	273.325				

CV0 54.29 %

Ns : No significativo

** : Altamente significativo

Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable número de hojas

f v.	g.l.	SC	CM	Fc	Ft	
Trat.	5	24.8	4.96	1.74518519	2.29	5% Ns
error	114	324	2.84210526		3.17	1%
total	119	348.8				

CV= 54.38 %

Ns : No significativo

** : Altamente significativo

Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable longitud de hojas

f v.	g.l.	SC	CM	Fc	Ft	
Trat.	5	28.1371067	5.62742133	3.72636299	2.29	5% **
error	114	172.15876	1.51016456		3.17	1%
total	119	200.295867				

CV= 63.67%

Ns : No significativo

** : Altamente significativo

Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable número de raíces

f v.	g.l.	SC	CM	Fc	Ft	
Trat.	5	92.2666667	18.45333333	4.94285714	2.29 5%	**
error	114	425.6	3.733333333		3.17 1%	
total	119	517.866667				

CV= 95.17%

Ns : No significativo

** : Altamente significativo

Cuadro 17. Análisis de varianza para la variable longitud de raíces

f v.	g.l.	SC	CM	Fc	Ft	
Trat.	5	56.5021	11.30042	7.71883745	2.29 5%	**
error	114	166.89662	1.46400544		3.17 1%	
total	119	223.39872				

CV= 92.86%

Ns : No significativo

** : Altamente significativo

Cuadro 18. Análisis de varianza para la variable diámetro de cormillos

f v.	g.l.	SC	CM	Fc	Ft	
Trat.	5	3.96100937	0.79220187	1.52706258	2.29 5%	Ns
Error	114	59.1403488	0.51877499		3.17 1%	
Total	119	63.1013581				

CV= 15.46%

Ns : No significativo

** : Altamente significativo