

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFFECTO DE LUZ Y SACAROSA SOBRE LA ACTIVIDAD DE
PEROXIDASA *in situ* Y PRESENCIA DE LIGNINAS EN VIOLETA
AFRICANA (*Saintpaulia ionantha* Wendl) CULTIVADA *in vitro*.

T E S I S P R O F E S I O N A L

PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

CLAUDIA PATRICIA MEDINA QUIROZ

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. GERARDO ORTIZ MONTIEL

MAYO 2004



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.

Siempre te llevo en mi corazon y todo lo que hago es para ti.
Te amo

Mama

A quien mas quiero.
Gracias por darme todo tu amor, apoyo incondicional, por todos los momentos malos, maravillosos y divertidos que hemos compartido.

Gustavo

DEDICATORIA

A Juanis, Mari, Luzma, Pati, Ara, Vero y Chavo por todo el amor y apoyo, porque cada día aprendo más de ustedes.

A Mario, Miguel, Eduardo y Miriam por ser parte de mi familia. Pero muy en especial a mi pintor favorito: Guillermo por ser mi amigo y compañero de infancia.

A mis sobrinos favoritos y a los que adoro: Andy, Jackie, Gordo, Silvia, Sandi, Seles, Vale, Ilse, Nayis, Chavito, Mayito, Emis, Kati y Caro.

A mis inseparables, incondicionales y hermosas AMIGAS: Areli, Claudia y Elisa.

A Alejandro, Alfredo, Daniel, Enrique y Manolo por todos esos momentos compartidos

A Jose Luis Andrade por tu amistad, confianza y la paciencia que me tienes. Por enseñarme que no importa cuanto trabajo exista, siempre será divertido si se baila.

A Gerardo Ortiz por ser mi amigo, mi maestro, mi guía, mi conciencia. No me queda más que agradecerte por todas tus enseñanzas, consejos y apoyo incondicional que me has brindado.

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales por todo su apoyo, atenciones y comentarios para este trabajo.

M. en C. Antonia Trujillo Hernandez

M. en C. Socorro Sanchez Correa

Dr. Ernesto Aguirre Ponce

M. en C. Gerardo Ortiz Montiel

M. en C. Manuel Mandujano Piña

A los Doctores Jorge Arguez (CICY) y Louis Santiago (Univ. Berkeley- CICY) por las sugerencias a este trabajo.

A Juana Vargas por todo su apoyo para realizar esta tesis.

INDICE

TEMA	PÁGINA
Resumen	5
Introducción	
◆ Cultivo de tejidos vegetales	6
◆ Etapas de micropropagación	7
◆ Actividad de Peroxidasas	8
◆ Biosíntesis de ligninas	10
◆ Violeta Africana	11
◆ El cultivo <i>in vitro</i> en violeta africana	12
Objetivos	
◆ Objetivo general	13
◆ Objetivos particulares	13
Materiales y Métodos	
◆ Selección y obtención de la planta	14
◆ Preparación del medio de cultivo y condiciones de cultivo	14
◆ Localización de actividad de peroxidasas y ligninas <i>in situ</i>	15
◆ Concentración de proteína soluble	15
◆ Peso fresco	16
◆ Concentración de clorofila	16
◆ Potencial osmótico	16
Resultados	
◆ Actividad de peroxidasa y ligninas <i>in situ</i>	17
◆ Concentración de proteína soluble	20
◆ Peso fresco total	22
◆ Peso fresco en peciolo y hoja	24
◆ Concentración de clorofila	26
◆ Relación de clorofila	28
◆ Potencial osmótico	30
Discusión	32
Conclusiones	36
Recomendaciones	37
Referencias	38
Apéndice	42

Resumen

Se han desarrollado múltiples estudios sobre el efecto de los factores ambientales con plantas en invernadero y campo, sin embargo se conoce poco sobre el efecto de estos en sistemas *in vitro*. Particularmente los efectos fisiológicos de dos factores en las primeras etapas del cultivo *in vitro*, parecen ser muy importantes en la adquisición de una morfología típica y en la transición mixotrófico-autotrófica: el flujo de fotones fotosintético y la presencia de azúcares en el medio. Por otro lado, se han asociado indicadores de la actividad metabólica a una serie de marcadores como: la actividad respiratoria, la actividad fotosintética y actividades enzimáticas específicas entre las que se encuentran la actividad peroxidasa, invertasa, sacarosa sintetasa y la síntesis de almidón, así como la cuantificación de ligninas que son indicadores de la presencia de anaerobiosis o de alteraciones en la estructura y morfología de la plántula.

Las alteraciones en la lignificación promueven la formación de plantas débiles *in vivo*. De esta manera los procesos que permiten la formación de ligninas parecen participar en la aclimatización de plantas obtenidas *in vitro*, siendo determinantes en la sobrevivencia de las mismas, sin embargo poco se ha hecho al respecto, particularmente en plantas herbáceas con tallos frágiles como los de la violeta africana. En este trabajo se analizó el efecto de cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl), durante sus primeras etapas de multiplicación en cultivo *in vitro*, para observar su efecto sobre la actividad peroxidasa, cantidad de ligninas *in situ* y potencial osmótico, determinando las condiciones más adecuadas de desarrollo de las plántulas que permitan caracterizar de mejor manera un sistema de micropropagación.

Obteniendo que la peroxidasas (proteínas solubles) disminuyeron con el tiempo de incubación, como un efecto de la aclimatización a las condiciones del medio de cultivo. El peso fresco total de pecíolo y de hoja de violeta africana propagada *in vitro* tuvo un ligero aumento durante el tiempo de incubación. Sin embargo, la síntesis de clorofila total y clorofila a/b no presentaron diferencias en las tres irradiaciones lumínicas y las cuatro concentraciones de sacarosa.

INTRODUCCIÓN

Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales está basado en el principio de **“Totipotencialidad”** que bajo el concepto de la “Teoría celular” propuesta por Schwann (1839), expresa que **“toda célula de un organismo multicelular puede ser capaz de desarrollarse independientemente si se le provee de las condiciones apropiadas”**. El elemento más importante en el desarrollo de estas técnicas ha sido el medio de cultivo y sus componentes que permiten el desarrollo de respuestas específicas en los materiales cultivados, en conjunto con las condiciones ambientales del mismo y el hecho de que todo se debe encontrar en total asepsia (Ortiz 2000).

De acuerdo a lo anterior, esta expresión y otras como cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos y micropropagación, entonces, se refieren principalmente a la obtención de plantas nuevas o al mantenimiento de la reproducción celular aislada o en masas de tejidos conocidos como callos, partiendo de porciones muy pequeñas de plantas llamados explantes. Estos pueden ser células, tejidos u órganos (embriones, semillas, granos de polen, tallos, meristemos apicales, hojas, raíces, frutos inmaduros), que se colocan en medios nutritivos específicos y bajo condiciones asépticas, así como condiciones ambientales particulares para que se lleve a cabo su desarrollo (George y Sherrington, 1984 y Hartmann *et al* 1987). En la práctica los cultivos de tejidos más reconocidos son:

- ◆ Cultivo de callos
- ◆ Cultivo de células en suspensión
- ◆ Cultivo de protoplastos
- ◆ Cultivo de anteras
- ◆ Cultivo de órganos
- ◆ Cultivo de meristemos aislados
- ◆ Cultivo de yemas
- ◆ Cultivo de embriones somáticos

Esta técnica se ha convertido en un método de reproducción que presenta diversas ventajas en comparación con los métodos tradicionales como son:

- ◆ El cultivo se realiza a microescala
- ◆ Se reproducen grandes cantidades de plantas a partir de pocos explantes provenientes de callos, cultivo de meristemos y protoplastos.
- ◆ Es posible propagar especies *in vitro* que no pueden multiplicarse *in vivo*, a través de híbridos somáticos.
- ◆ La multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*.

- ◆ Se pueden obtener plantas libres de patógenos a partir de meristemos apicales.
- ◆ Debido a las condiciones controladas se puede eliminar el efecto estacional y tener una producción homogénea todo el año.
- ◆ Se pueden hacer transformaciones genéticas provenientes de protoplastos.
- ◆ Se utiliza como banco de germoplasma (George y Sherrington, 1984 y Pierik, 1990).
- ◆ Se reducen los ciclos de cultivo y la mortalidad en las primeras etapas de desarrollo.
- ◆ Promueve la precocidad.
- ◆ Se obtiene un gran número de plantas de buena calidad fitosanitaria (Pierik, 1990; De Rezende *et al.* 2000).

Etapas de la Micropropagación

La micropropagación como proceso se ha dividido en varias etapas, que fueron descritas por primera vez por Murashige en 1974. Este autor propone cuatro etapas o pasos en la micropropagación en la multiplicación *in vitro* de plantas. Esto ha sido adoptado por investigadores y laboratorios comerciales. Sin embargo algunos autores han sugerido que el tratamiento y preparación del material inicial se tome como una etapa aparte y se propone como una etapa 0. Por lo que se consideran en la actualidad 5 etapas en la micropropagación. (Torres, 1989).

- ◆ Etapa 0: Seleccionar la planta madre
- ◆ Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico, induciendo en los explantes las respuestas morfogénicas requeridas.
- ◆ Etapa 2: La obtención de una producción estable de propágulos *in vitro* para incrementar en número los materiales obtenidos.
- ◆ Etapa 3: Enraizamiento *in vitro*. Esta etapa se caracteriza por la inducción de raíces en las plántulas, y su posterior multiplicación. (George & Sherrington, 1984).
- ◆ Etapa 4: Aclimatización. Es la etapa más crítica de la plántula, ya que pasa de un ambiente en donde la transpiración es baja con alta humedad a otro exterior con mayor transpiración y menor humedad, lo cual le puede ocasionar estrés hídrico. Es decir, va de un estado heterotrófico y aséptico a un estado autotrófico que puede estar sujeto a ataques de microorganismos. (De Rezende *et al.*, 2000).

Aún cuando la reproducción se ha logrado masivamente de manera excepcional, durante las primeras etapas (I y II), se han reportado numerosas anormalidades en plántulas obtenidas *in vitro*, lo que disminuye su viabilidad. Una de las anormalidades más comunes se asocia a una serie de cambios anatómicos definidos por una ausente o reducida diferenciación de algunos tipos celulares como: hiperhidratación y disminución o pérdida de las células en empalizada de las hojas (Debergh et al, 1981), hipertrofia de parénquima cortical y medular; baja o defectuosa lignificación en vasos y traqueidas (Kevers *et al*, 1984; Grout y Aston, 1978); grandes espacios de aire en el mesófilo (Brainerd y Fuchigami, 1981); alteración en algunas actividades enzimáticas (Kevers y Gaspar, 1985), y en general plántulas débiles y alargadas.

Wardle y colaboradores (1983), sugirieron que las condiciones de crecimiento, caracterizadas por una alta humedad relativa y baja densidad de flujo fotónico dentro del frasco de cultivo, puede ser la causa de las modificaciones anatómicas y funcionales de las plantas *in vitro*. De acuerdo a lo anterior, el estudio de la fisiología del desarrollo de las *plantas in vitro* es de suma importancia durante las diferentes etapas de la micropropagación para la obtención de las respuestas esperadas en este proceso.

Se han desarrollado múltiples estudios sobre el efecto de los factores ambientales con plantas en invernadero y campo, sin embargo se conoce poco sobre el efecto de estos en sistemas *in vitro*, particularmente los efectos fisiológicos de dos factores en las primeras etapas del cultivo *in vitro* parecen ser muy importantes en la adquisición de una morfología típica y en la transición mixotrófico-autotrófica: el flujo de fotones fotosintético (FFF) y la presencia de azúcares en el medio.

Se ha observado que un alto FFF ocasiona una disminución en la capacidad fotosintética (Björkman y Demmig-Adams, 1994), la presencia de azúcares en el medio produce una alteración en la regulación de la fotosíntesis y pérdida de proteínas en el aparato fotosintético (Koch, 1996). Otros estudios mencionan que la presencia de azúcares en el medio mejoran la proporción de los componentes fotosintéticos y la actividad de los mismos (Kovtun y Daie, 1995). El crecimiento, la acumulación de materia seca y área foliar en tabaco *in vitro* fue mejor bajo condiciones fotomixotróficas que fotoautotróficas, afectándose positivamente la actividad fotosintética con azúcares (Tichá *et al* 1998).

Por otro lado, se han asociado como indicadores de la actividad metabólica a una serie de procesos como: la actividad respiratoria, la actividad fotosintética y actividades enzimáticas específicas entre las que se encuentran la actividad peroxidasa, invertasa, sacarosa sintetasa y la síntesis de almidón, así como la cuantificación de ligninas como indicadores de presencia de anaerobiosis o de alteraciones en la estructura y morfología de la plántula (Kevers et al, 1984).

Actividad de peroxidasas

Las peroxidasas son proteínas con actividad enzimática que utilizan como donador al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxidando un amplio intervalo de moléculas incluyendo citocromos, fenoles, nitratos, ácido ascórbico, indoles, aminas y ciertos iones orgánicos. (Gaspar *et al* 1982). Se localizan en vacuola, citosol, y pared celular en las plantas (Siegel, 1993), están involucradas en diversos procesos fisiológicos (Gaspar *et al* 1982), incluyendo el catabolismo de auxinas (Normanly *et al.* 1995; Savitsky *et al.* 1999), la defensa en contra de patógenos (Kerby y Somerville, 1992), modificación de las propiedades de la pared celular, y lignificación (Goldberg *et al* 1986; Lagrimini, 1996; Mäder y Füssli, 1982 en Chen *et al* 2002). Las peroxidasas están separadas en aniónicas (ácidas) y catiónicas (básicas) de acuerdo a sus puntos isoeléctricos y son cruciales para la formación de ligninas. (Gazaryan *et al* 1996; Wang y Liu, 1999).

Se realizó un estudio en fibras de lino, donde se encontró una correlación positiva entre la lignificación y el incremento de peroxidasas iónicas y covalentes (peroxidasas unidas a pared celular) (MacDougall 1992). Por ejemplo, en coleoptilos y raíces de arroz (*Oryza sativa* L.) se observó una relación recíproca entre el crecimiento y los niveles de peroxidasas unidas a pared celular en plantas de arroz etioladas creciendo en condiciones de anoxia (Lee y Lin, 1995). Además durante la senescencia de hojas de arroz se propuso un posible papel del metabolismo de H_2O_2 , y cambios en la actividad enzimática en presencia de luz ($40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) y oscuridad. Se encontró, que la luz retarda la senescencia al mismo tiempo que se acumula H_2O_2 , de tal manera que existe una relación entre el incremento en la concentración de H_2O_2 y el aumento en la actividad de la superóxido dismutasa y la ascorbato peroxidasa (Chang y Kao, 1998).

En explantes de *Cichorium intybus* incubados con una radiación de $10 \text{ Watt}/\text{m}^2$ presentaron mayor peso fresco, se estimuló la síntesis de peroxidasas relacionadas con la lignificación, cantidad de ligninas y contenido de clorofila que los cultivados en oscuridad (Boeuf *et al*, 1999). En hipocotilos de frijol mungo (*Vigna radiata*) se evaluó el efecto de la irradiación luminosa ($16.7 \text{ Watt}/\text{m}^2$) sobre peroxidasas y síntesis de ligninas, se encontró que la irradiación redujo el crecimiento de los hipocotilos y los niveles endógenos del ácido indol acético (AIA). La actividad de peroxidasa y lacasa se incrementó al igual que el contenido de ligninas (Chen *et al.* 2002).

Se han realizado ensayos histoquímicos *in situ* para la detección de H₂O₂ en tejido fresco de tabaco (*Nicotina tabacum* cv White Burley), calabaza (*Cucumis sativus* L. cv. Laura) y *Kalanchoe daigremontiana*, mediante la utilización de una solución de almidón y yoduro de potasio (KI) que se aplicó al tejido fresco, usando como agente revelador permanganato de potasio. Para obtener una coloración café que indica la presencia de H₂O₂ que se produce durante la lignificación. (Repka, 1999). Por medio de las técnicas de histoquímica se localizó la actividad de peroxidasa en soya (*Glycine max* L. var. kalmi), guisante (*Pisum sativum*), frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Saxa), girasol (*Helianthus annuus* L.) y calabaza (*Cucumis sativus*) sobre papel de nitrocelulosa colocando una mezcla de KI y una solución de almidón, para una detección rápida y localización de H₂O₂ en órganos de plantas superiores (Schopfer 1994). Para la distribución de la actividad de peroxidases se utilizó como planta modelo a *Junglans nigra* usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), se encontró una alta actividad enzimática en la zona del cambium y en el eje central de la albura. La inmunohistlocalización de las peroxidases reveló que la proteína se presentó en la zona de transición, aún si la actividad enzimática no era detectable (Dehon, *et al.* 2002).

Biosíntesis de Ligninas

Se ha observado que alteraciones en la lignificación, promueven la formación de plantas débiles *in vivo*. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) o los radicales libres son el resultado de muchos procesos metabólicos que han sido implicados en numerosos desarrollos y respuestas adaptativas en células animales y vegetales (Dypbukt *et al.* 1994; De Marco y Roubelakis-Anfelakis, 1996; Lamb *et al.* 1997 en Repka, 1999). La producción de peróxido de hidrógeno está asociada con varios procesos intracelulares como el rompimiento oxidativo y la lignificación en células vegetales (Repka, 1999).

La lignificación comienza con una reacción catalizada por la fenilalanina-amonioliasa para producir alcoholes precursores de lignina y terminando con un par oxidado de monómeros de ligninas en un proceso que requiere peróxido de hidrógeno y peroxidases unidas a pared celular (Gross *et al.* 1977 en Repka, 1999). La biosíntesis de ligninas y las enzimas involucradas en el proceso están caracterizadas como se observa en la figura 1. La fenilalanina amonioliasa (PAL) cataliza la conversión de fenilalanina hacia el ácido trans-cinámico, éste es hidroxilado en la posición *para* por el ácido cinámico 4-hidroxilasa hacia la forma de ácido p-cumárico, sin embargo, p-cumárico puede ser formado por la desaminación de la tirosina catalizada por la tirosina amonioliasa. El ácido p-cumárico es fuertemente hidroxilado por la ácido-p-cumárico-hidroxilasa formándose ácido cafeico. La o-metiltransferasa, metila el ácido cafeico hacia ácido ferúlico. El ácido sinápico es formado por la hidroxilación y metilación del ácido ferúlico. El ácido cumárico, ferúlico y sinápico son convertidos respectivamente a ésteres de CoA por la ácido-cinámico-CoA-ligasa (Gaspar *et al.* 1982)

Los ésteres derivados del ácido cumárico son reducidos hacia sus correspondientes aldehidos y fuertemente reducido hacia alcoholes por el cinamomil -CoA-oxidoreductasa y el cinamil alcohol deshidrogenasa. La policondensación de los alcoholes cinamílicos probablemente ocurre a través de la mediación de las peroxidasaas unidas a pared (Gaspar, *et al.*, 1982).

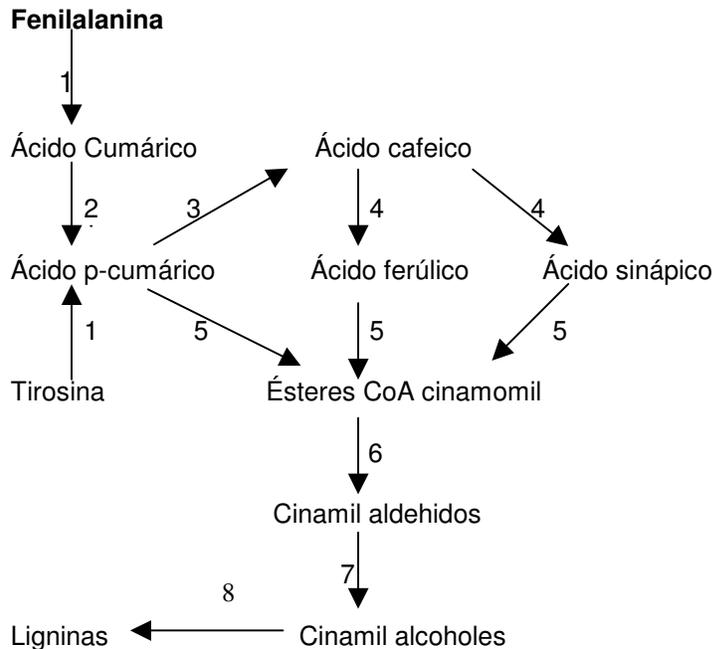


Figura 1. Ruta metabólica y enzimas involucradas en la biosíntesis de ligninas.

1. Fenilalanina amonía liasa 2. Ácido cinámico-4-hidroxisilasa 3. P-cumárico hidroxisilasa
 4. o-Metiltransferasa 5. Ácido cinámico-CoA-ligasa 6. Cinamomil-CoA-oxidoreductasa
 7. Cinamil alcohol deshidrogenasa 8. Peroxidasaas (op. cit).

De esta manera los procesos que permiten la formación de ligninas parecen participar en la aclimatización de plantas obtenidas *in vitro*, siendo determinantes en la sobrevivencia de las mismas, sin embargo poco se ha hecho al respecto, particularmente en plantas herbáceas con tallos frágiles como los de la violeta africana.

Violeta africana

El género *Saintpaulia* pertenece a la familia Gesneriaceae que es endémica del Este de África, y posee aproximadamente 20 especies. Se encuentra restringida geográficamente desde los Montes de Teita al sur de Kenia hasta las Montañas Uluguru en el este de Tanzania, pero la mayoría de las especies se localizan en las Montañas de Usambara en el noreste de Tanzania (Möller y Cronk 1997). Las especies de *Saintpaulia* fueron introducidas a Europa en el año de 1892 por el Barón Walter von Saint Paul.

Con el tiempo la Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl), se hizo popular como planta ornamental debido a que presenta una alta tolerancia a la sombra, florece bajo luz artificial y por el colorido de sus flores, actualmente es una de las plantas más importantes a nivel mundial (Lo, 1997; Sunpui & Kanchanapoom, 2002).

Saintpaulia ionantha es una planta herbácea carnosa, con tallo corto y rizomatoso, que alcanza una altura de quince centímetros y posee una roseta de hojas espatuladas, casi dispuestas horizontalmente de forma redondeada u oval, dentadas o festoneadas muy pecioladas y de color verde pálido a verde oscuro. Posee numerosas flores reunidas en grupos de hasta ocho en una inflorescencia cimosa, con la corola compuesta de cinco pétalos desiguales. Las anteras de color amarillo que contrastan con los pétalos de color azul turquesa con tendencia al violeta oscuro, lila, rosa, blanco, rojo y bicolores (Buchmann, 1983 en Harrison, *et al.* 1999).

La violeta africana puede reproducirse de distintas maneras incluyendo la propagación sexual por semillas y mediante diversas formas asexuales como la micropropagación o por esquejes (De Rezende *et al.* 2000).

El cultivo in vitro de Violeta africana

La violeta africana es un modelo o sistema excelente para estudiar la regeneración en el cultivo *in vitro*, ya que es notable por su habilidad regenerativa. De manera semejante a otras especies de plantas la composición química del medio de cultivo es un factor que afecta el rendimiento del tallo en el cultivo *in vitro*. Este factor, ha sido estudiado exhaustivamente en reportes previos (Start & Cumming, 1976; Vazquez *et al.*, 1977; Harney & Knap, 1979; Bilkey & Cocking, 1981; Pak *et al.*, 1983; Casells & Plunkett, 1984; Chen & Lu, 1987 citado en Lo, 1997). Sin embargo, la gran variación en el rendimiento del tallo se ha obtenido entre explantes individuales, los cuales pueden encontrarse en diversos medios de cultivo. De esta manera, estas fuentes de variación desconocidas han afectado y dificultado la interpretación de datos y análisis estadísticos para los biotecnólogos (Lo, 1997).

El cultivo *in vitro* de violeta africana se ha llevado a cabo con éxito a partir de varias fuentes de explantes incluyendo la hoja, yema floral, subepidermis, anteras y protoplasto. Recientemente se han llevado a cabo estudios de hibridación somática y transferencia directa de genes como técnicas de interés para extender la variabilidad genética en *Saintpaulia* como lo demuestran Sunpui & Kanchanapoom (2002).

Bajo el esquema anterior en este trabajo se analizó el efecto de la sacarosa y la irradiación luminosa sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl), durante sus primeras etapas de multiplicación en cultivo *in vitro*, para observar su efecto sobre la actividad de peroxidasa, presencia de ligninas *in situ* y el potencial osmótico, determinando las condiciones más adecuadas de desarrollo de las plántulas que permitan caracterizar de mejor manera un sistema de micropropagación.

OBJETIVO GENERAL

De acuerdo con lo anterior se propone evaluar el efecto de diferentes irradiaciones luminosas y diferentes concentraciones de sacarosa sobre la actividad de peroxidasa y ligninas *in situ*, en plántulas propagadas *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl).

OBJETIVOS PARTICULARES

Localizar la actividad de peroxidasas y ligninas *in situ* en peciolo de violeta africana (*S. ionantha* Wendl) cultivada *in vitro* por medio de una prueba histoquímica durante 25 días.

Determinar la concentración de proteína soluble total *in situ* en hoja y peciolo de violeta africana (*S. ionantha* Wendl) cultivada *in vitro*.

Evaluar el crecimiento de hoja y peciolo en violeta africana (*S. ionantha* Wendl) cultivada *in vitro*.

Determinar la concentración de clorofilas (a, b y total) y el potencial osmótico en hoja y medio de cultivo en violeta africana (*S. ionantha* Wendl) cultivada *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y obtención de la planta

Se seleccionó la violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) por ser una planta cosmopolita, ornamental y la base de la industria horticultora. Es una planta modelo en el cultivo *in vitro*, por la facilidad con la que se le puede propagar. Las plantas iniciales fueron de una variedad de flor blanca sencilla y se obtuvieron en viveros comerciales de Xochimilco, D.F.

Preparación del medio y condiciones de cultivo

Las plántulas fueron obtenidas mediante el método descrito por (Lo, 1997), partiendo de hojas seleccionadas y separadas de los peciolo, que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio y tritón 80x (0.010%) durante 10 minutos; se realizaron 4 lavados con agua estéril y se fraccionaron aproximadamente en cuadros de 2 cm², los cuales fueron incubados bajo condiciones estériles en frascos de vidrio (Gerber) con 25 ml de medio MS (1962) (Lo, 1997). El tiempo de incubación fue de 60 días, con una irradiación luminosa de 50 μmol/m²/s, producida por dos lámparas fluorescentes de 40 W (marca Phillips), con una temperatura de 22 ±3 °C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Las plántulas se fraccionaron y fueron subcultivadas en frascos de 100 ml. con 20 ml de medio de cultivo estéril Murashige y Skoog 1962 (MS62), con sales inorgánicas, vitaminas, 0, 15, 30 y 60 g/l de sacarosa, 7g/l de agar, 2 mg/ l de AIA y 0.08 mg/l de BAP, ajustando el pH a 5.6 (Lo, 1997), con irradiación luminosa de 22, 50 y 100 μmol/m²/s, incubadas durante 25 días.

El experimento consistió de 12 tratamientos (cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas). Se evaluó la actividad de peroxidasa y ligninas *in situ* en peciolo, el peso fresco (en hoja y peciolo), concentración de proteína (en hoja y peciolo), clorofilas a, b y total (en hoja) y potencial osmótico (en hoja y medio de cultivo). Estas mediciones se realizaron cada 5 días (5, 10, 15, 20 y 25).

Localización de actividad de peroxidasas y ligninas *in situ*

Para localizar la actividad de las peroxidasas y ligninas *in situ* se utilizaron dos pruebas histoquímicas:

Actividad de peroxidasas *in situ*: Se utilizó una solución de 1 mg/ml^{-1} de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), disuelto en buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 6.0 en presencia de 1 mM de H_2O_2 . Se sumergieron en esta solución cortes transversales de peciolo (región cercana a la hoja). La actividad de peroxidasas se determinó por una tinción café oscuro (Dehon et al. 2002).

Ligninas *in situ*: Se utilizó floroglucinol al 2% (Sigma) en HCl al 30% en cortes transversales frescos de la base del peciolo (parte cercana a la hoja). Las ligninas se localizaron por una coloración rosa (Repka, 1999).

Los cortes teñidos se observaron en un microscopio (Nikon A7, Japan), con cámara fotográfica integrada mediante epiiluminación tangencial (lámpara Osram 20 watts compacta), se tomaron fotografías a 4x y 10x y se digitalizaron usando un escáner (Canon Scan N340P), acoplado a una computadora Toshiba Satellite 1735 Intel Celeron.

Las fotografías digitalizadas se analizaron con el programa Image Tool para Windows, versión 2 desarrollado por Wilcox, D., B. Dove, D. McDavid y D. Greer (1996), en la Universidad de Texas, Centro de Ciencias de la Salud, San Antonio Texas de distribución gratuita en internet <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/> (Garcilazo, 2002). Los resultados se interpretaron tomando el área total del corte a la cual se le restó el área teñida para obtener el porcentaje de actividad de peroxidasas y ligninas.

Concentración de proteína soluble

Se homogenizó una fracción del tejido (hoja y peciolo) con 1 ml de regulador de fosfatos 10 mM y pH 6.2, el extracto se centrifugó a 14000 r.p.m. en una microcentrifuga Eppendorf (Centrifuge 5415 C), por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína soluble mediante el método de Bradford (1976) a 595 nm en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS), utilizando albúmina sérica de bovino como referencia. Para el análisis de datos se utilizó una prueba estadística ANOVA de 2 vías con $\alpha = 0.05$, mediante el software de análisis estadísticos (STATISTICA 6.0).

Peso fresco

Se tomaron 6 plántulas del medio de cultivo por cada tratamiento, se pesaron en una balanza analítica obteniendo el peso total. Para obtener el peso de hoja y peciolo se desprendieron las hojas de cada plántula, pesándolas por separado. Los datos se analizaron con una prueba estadística ANOVA de 2 vías con $\alpha=0.05$, mediante el software de análisis estadísticos (STATISTICA 6.0).

Concentración de clorofila

Se maceraron 6 plántulas en un mortero con acetona fría al 80 % y el homogeneizado se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 5 min. (Eppendorf Centrifuge 5415 C). Se determinó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS) en dos longitudes de onda 647 nm y 664 nm, calculando la concentración de clorofilas (a, b y total) de acuerdo lo reportado por Hall *et al.* (1992 citado en Ortiz (2000).

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{M}) = 13.19(A_{664}) - 2.57(A_{647})$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{M}) = 22.10(A_{647}) - 5.26(A_{664})$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{M}) = 7.93(A_{664}) + 19.53(A_{647})$$

Potencial Osmótico

Se midieron los potenciales osmóticos de discos de hoja y medio de cultivo en un Psicrómetro marca Wescor Inc. Modelo HR-33T Dewpoint Microvoltmeter, con cámara adiabática, éstos se incubaron durante 5 minutos antes de la medición. La transformación de los datos de microvolts a bares se llevó a cabo mediante la siguiente relación: $\mu\text{volts} / -0.75 \mu\text{volts/Bar} = \text{-Bares}$, donde $-10 \text{ Bars} = -1 \text{ MPa}$. Los resultados están expresados - MPa.

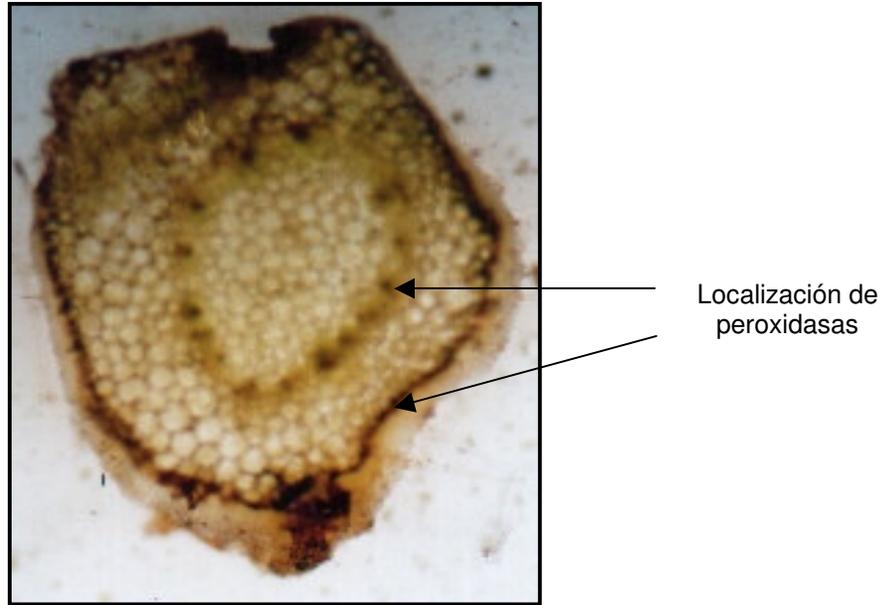
Resultados

Localización de actividad de peroxidasas y ligninas *in situ*.

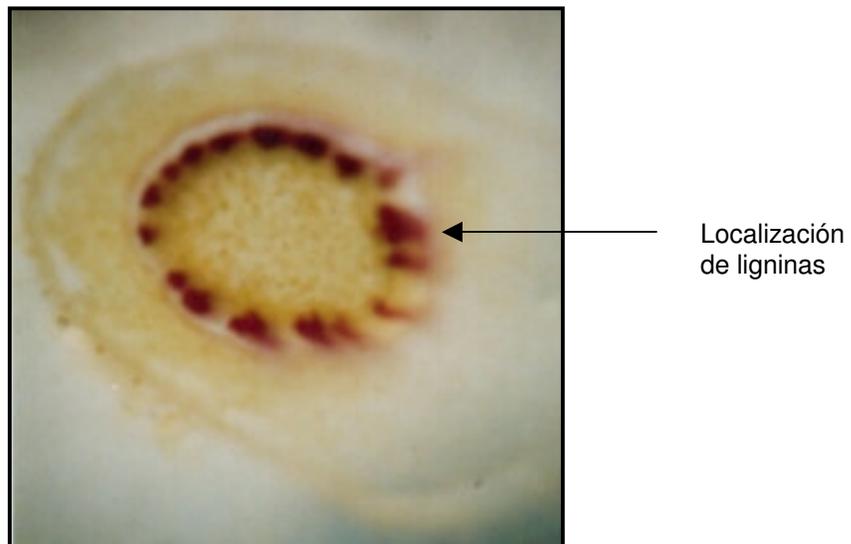
Se observó la actividad de peroxidasas y presencia de ligninas *in situ* en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) durante los 25 días en todos los tratamientos con sacarosa e irradiación luminosa, mediante fotografías con el programa analizador de imágenes (PAID). La actividad de peroxidasas se localizó en el haz vascular y en la periferia del corte transversal de peciolo con una coloración café (Fig. 1a). En el caso de las ligninas siempre se localizaron en el haz vascular representadas con una coloración rosa (Fig. 1b).

En el tratamiento de $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ la concentración de 0 g/l de sacarosa en el quinto día presentó un 25% de actividad de peroxidasas, la cual disminuyó al final del tratamiento a un 15%. Para 15 g/l de sacarosa inició con un 22% y terminó en 2%, a 30g/l de sacarosa la actividad comenzó en un 9% y concluyó en 8%, por último, a 60 g/l de sacarosa de un 45% disminuyó al final del tratamiento hasta 2% de actividad de peroxidasas (Fig. 2a).

En el tratamiento de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ la concentración de sacarosa 0g/l presentó 8% de actividad en el día 5, aumentando a 9% hacia el día 25, la de 15 g/l de sacarosa inició con un 19% y concluyó con un 12%, la de 30 g/l sacarosa presentó un 28% de inicio y finalizó con un 2%, para la de 60 g/l sacarosa un porcentaje de 38 % al inicio del tratamiento y 2% al término (Fig. 2b). En el caso del tratamiento $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ la concentración de 0 g/l de sacarosa presentó la actividad más alta de todos los tratamientos con un 55% y finalizó con un 10%, para 15 g/l la actividad de peroxidasas inició en un 18%, para 30 g/l en un 9% y en 60 g/l un 20% y los tres tratamientos finalizaron con una actividad de 5% (Fig. 2c).

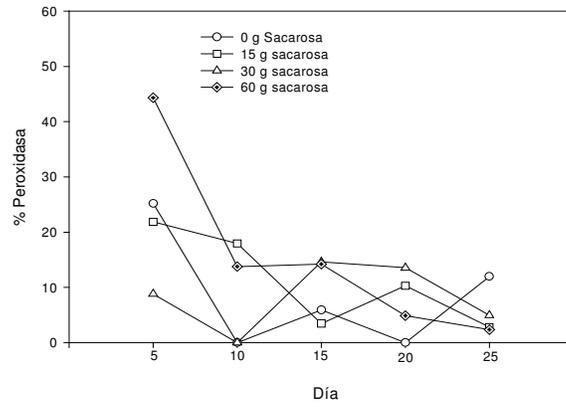


a)

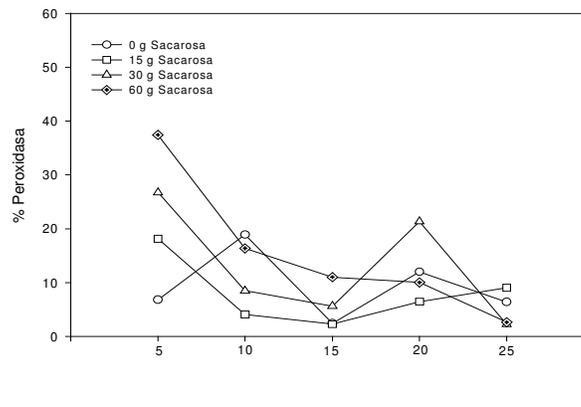


b)

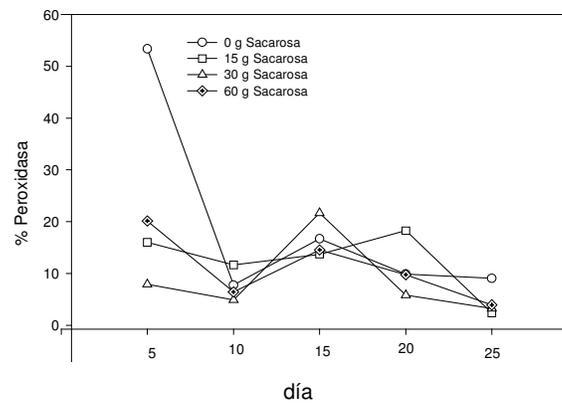
Figura 1. Localización de actividad de peroxidasas (a) y ligninas (b) *in situ* en corte histológico (4x) de peciolo de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). Día 20, tratamiento con 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 30 g/l sacarosa.



a) 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



b) 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



c) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

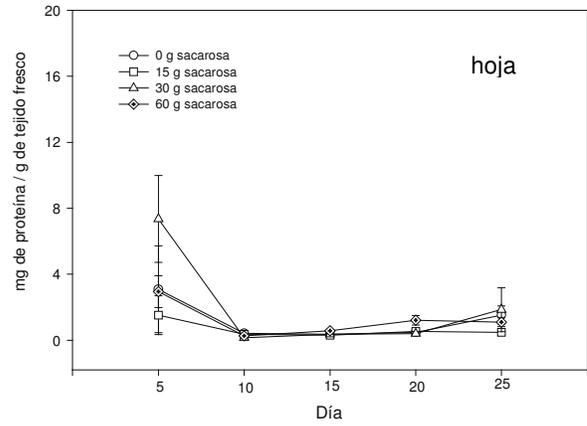
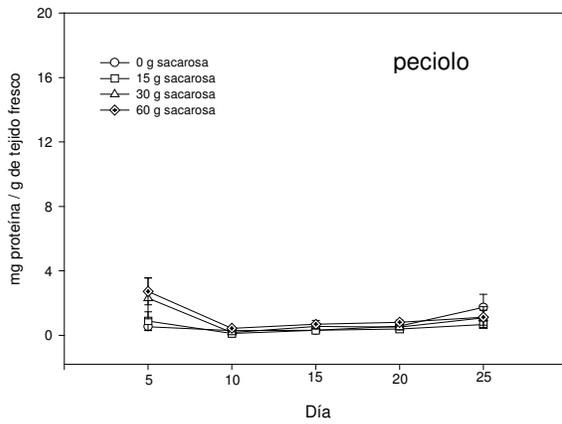
Figura 2. Localización de actividad de peroxidasa *in situ* en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) en cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas (n=1).

Proteína soluble

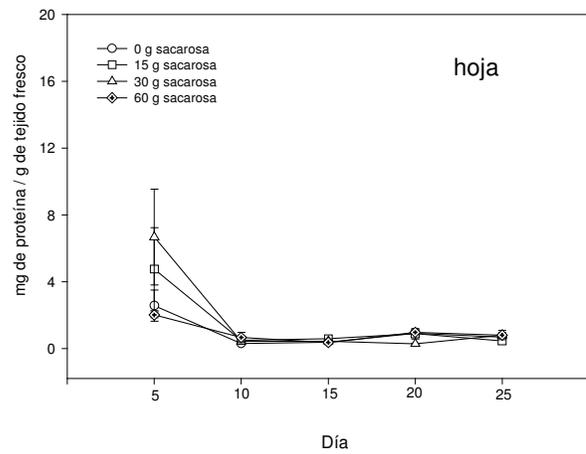
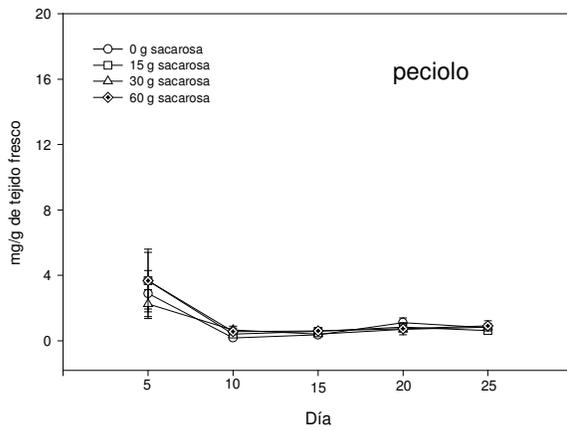
La concentración de proteína soluble en peciolo en los tratamientos de 0, 15, 30 y 60 g/l sacarosa con $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, se registró entre 0.54 y 2.73 mg/g de tejido fresco (T.F.) durante el día 5. Sin embargo, para el día 25 los valores se encontraron entre 0.66 y 1.73 mg/g de T.F. Los valores en hoja se situaron entre 1.53 y 7.35 mg/g de T.F. para el día 5 y disminuyeron hasta 0.48 mg/g de T.F. en el día 25 (Fig.3 a).

En el tratamiento de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con las cuatro concentraciones de sacarosa en peciolo durante el día 5, los valores obtenidos fueron entre 2.25 a 3.68 mg/g de tejido fresco (T.F.), para el día 25 se observó un descenso desde 0.63 a 0.93 mg/g de T.F. En cambio los valores que se registraron en hoja en el día 5 fueron entre 2.01 a 6.67 mg/g de T.F., al término del tratamiento la concentración de proteína soluble osciló entre 0.45 y 0.80 mg/g de T.F (Fig.3 b).

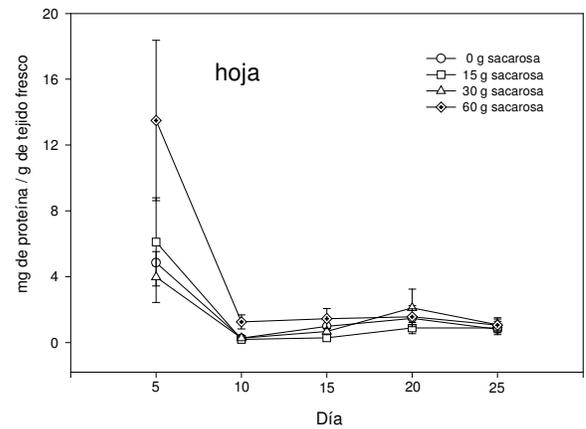
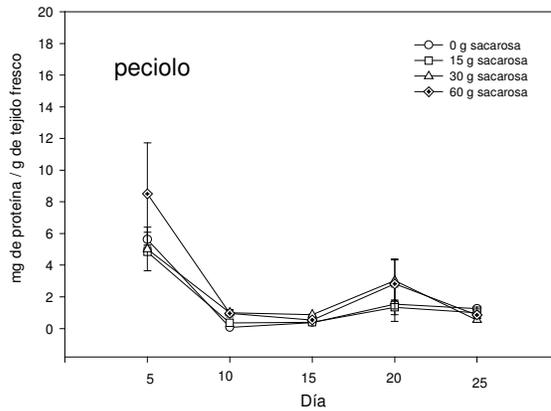
En el último tratamiento de $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y las cuatro concentraciones de sacarosa se observó el mismo patrón de descenso en la concentración de proteína soluble que en los tratamientos anteriores. En peciolo para el día 5 se obtuvieron valores entre 4.84 a 8.49 mg/g de T.F.; para el día 25 desde 0.55 a 1.25 mg/g de T.F. Debido a la gran variación entre los datos y en base a la prueba estadística Anova no presentaron diferencias significativas en los tratamientos tanto para proteína soluble de peciolo como en hoja (Fig. 3 c).



a) 22 μmol/m²/s



b) 50 μmol/m²/s



c) 100 μmol/m²/s

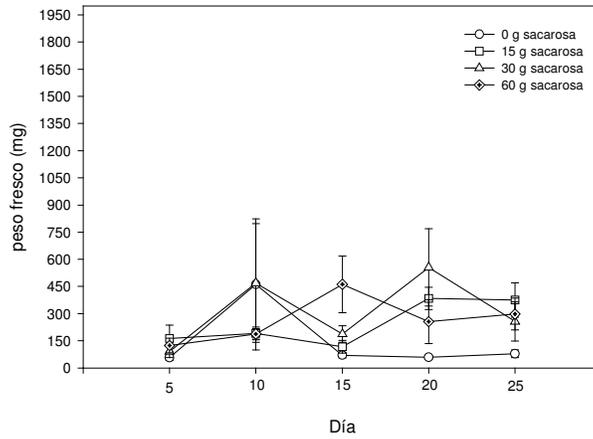
Figura 3. Concentración de proteína soluble en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) en cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas (n=3) x ± e.e.

Peso fresco total

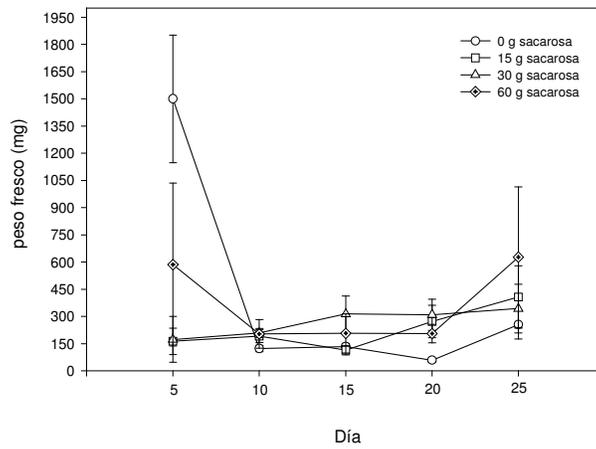
En la irradiación de $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ no se observaron diferencias significativas en los tratamientos de 0, 15, 30 y 60 g/l de sacarosa de acuerdo con la prueba estadística ANOVA.

Los pesos obtenidos del día 5 al 25 para 0 g/l fueron de 43 a 79 mg, en 15 g/l (162 a 375 mg), 30 g/l (91 a 253 mg) y 60 g/l (124 a 297 mg) como se muestra en la Figura 4a. Para el caso de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en 0 g/l de sacarosa el día 5 presentó 1500 mg de peso fresco total y concluyó al día 25 con 255 mg, en 15 g/l de sacarosa el peso fresco fue de 163 mg para el día 5 y 407 mg para el 25; Mientras que en el tratamiento de 30 g/l se registró 173 mg y 343 para el día 25, por último en 60 g/l se registró 585 mg como peso inicial y 626 para el último día del tratamiento (Fig. 4b).

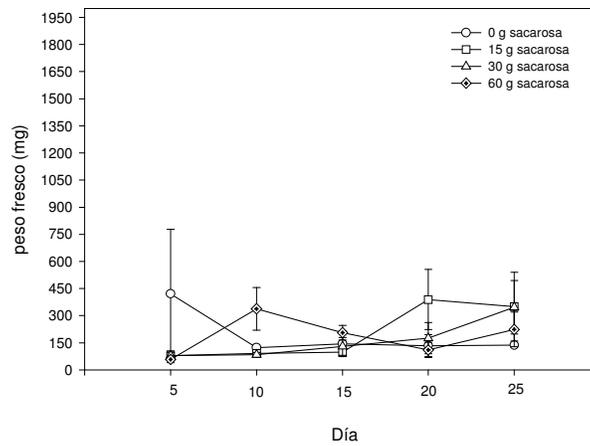
En la irradiación de $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con 0 g/l de sacarosa, el peso descendió de 421 mg a 136 mg del día 5 al 25, en los tratamientos restantes se registró un ligero aumento en el peso con respecto al tiempo de incubación (Fig. 4c); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.



a) 22 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$



b) 50 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$



c) 100 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$

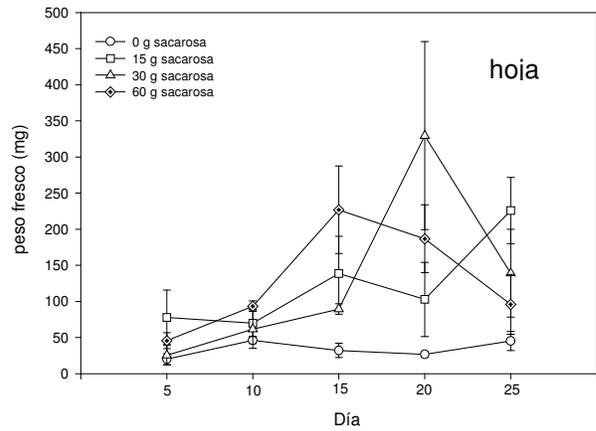
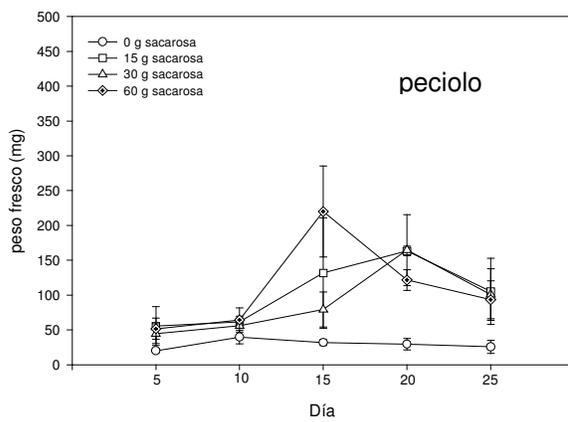
Figura 4. Peso fresco total en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) en cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas ($n=3$) $\bar{x} \pm e.e.$

Peso fresco en peciolo y hoja

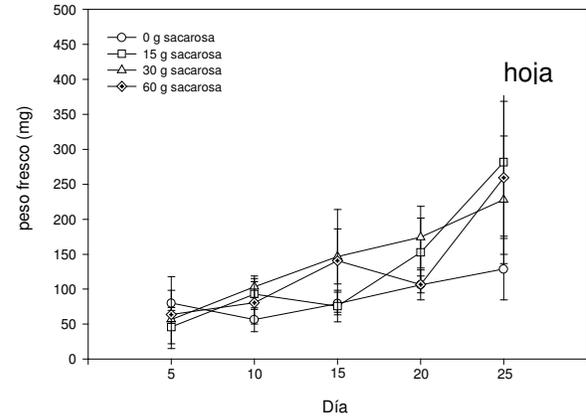
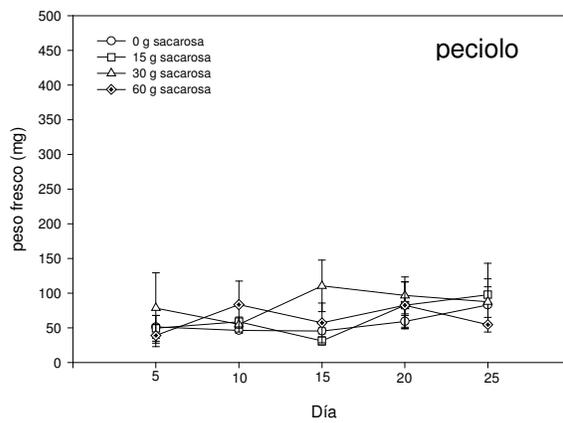
El peso fresco del peciolo en el tratamiento de $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de irradiación en 0 g/l de sacarosa aumentó de 20 a 25 mg del día 5 al 25, para 15 g/l el cambio fue de 53 a 105, en 30 g/l de 46 a 101 mg y en 60 g/l de 51 a 93 mg; Sin embargo cabe mencionar que los valores de peso fresco no fueron constantes en el tiempo de incubación (Fig. 5a).

Para $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a 0 g/l de sacarosa se registró un peso de $51 \neq 53$ mg, para 15 g/l un cambio de 50 a 98 mg, en 30 g/l de 79 a 88 mg y por último 60 g/l presentó un cambio de 39 a 55 mg de peso fresco de peciolo (Fig. 5b). Respecto a la irradiación de $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ la concentración de 0 g/l no presentó cambios en el peso fresco de peciolo, sin embargo en 15 g/l fue de 26 a 91 mg, en 30 g/l de 27 a 112 mg y en 60 g/l un cambio de 27 a 55 mg de peso fresco en peciolo (Fig. 5c).

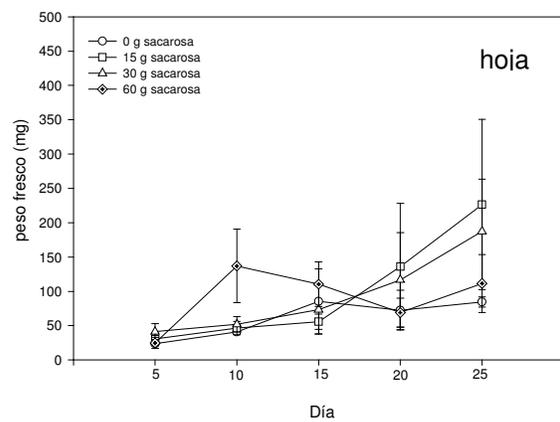
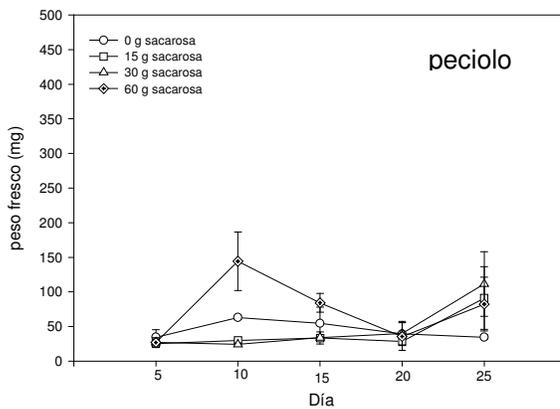
Con respecto al peso fresco de hoja a $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ para 0 g/l de sacarosa se registró un peso de 20 a 45 mg del día 5 al 25, para 15 g/l de 77 a 226 mg, para 30 g/l de 26 a 139 y para 60 g de 46 a 96 mg (Fig. 5a). En el tratamiento de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en 0 g/l de sacarosa pasó de 80 a 129 mg del día 5 al 25, en 15 g/l de 46 a 236 mg, en 30 g/l de 57 a 228 mg y en 60 g/l de 64 a 260 mg (Fig. 5b). Por último la irradiación de $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en 0 g/l de sacarosa paso de 24 a 85 mg, en 15 g/l de 31 a 227 mg, para 30 g/l de 41 a 187 y en 60 g/l de 25 a 112 mg (Fig. 5c). con la prueba estadística Anova no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos para peciolo y hoja.



a) $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



b) $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



c) $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

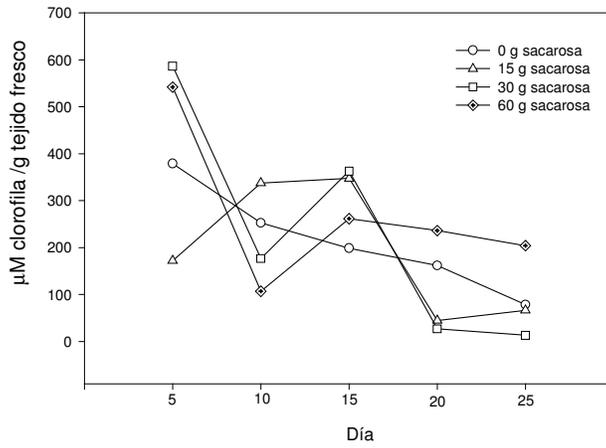
Figura 5. Peso fresco de peciolo y hoja en violeta africana (*S. ionantha*) en cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas ($n=3$) $\times \pm e.e.$

Concentración de clorofila

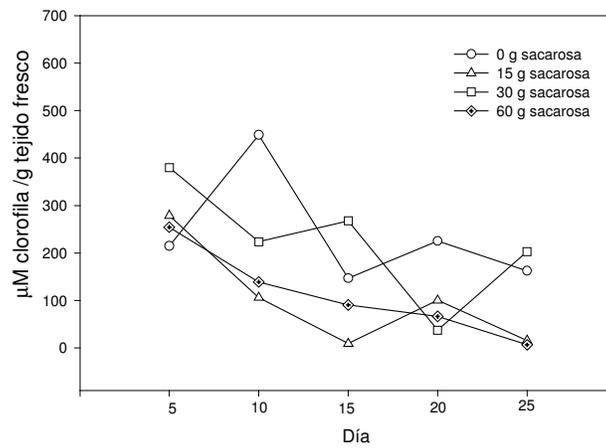
En el tratamiento de $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 0 g/l de sacarosa inició en $379 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y concluyó con $79 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, en 15 g/l de sacarosa se registró en 173 y terminó en $67 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco; para 30 g/l en el día 5 obtuvo un valor de 587 y $13 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco para el final del tratamiento; por último 60 g/l registró 542 al quinto día y $204 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco al día 25 (Fig.6a).

En la irradiación de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ las plántulas en las distintas concentraciones de sacarosa presentan para el día 5 valores desde 215 a $380 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, para el día 25. En 0 g/l se obtuvo $162 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, en la concentración de 30 g/l se registró un valor de $203 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco (Fig. 6b). En las concentraciones de 15 y 60 g/l se registraron valores de 15.47 y $6.25 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco respectivamente.

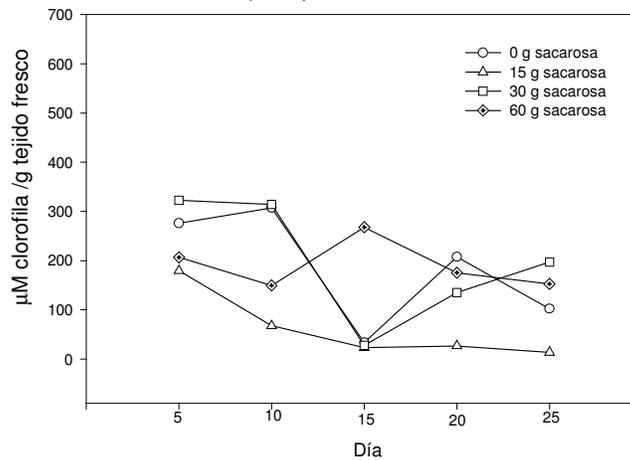
Para la irradiación de $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con 0 g/l de sacarosa inició en $276 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y terminó en $102 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco; en 15 g/l se inició en $186 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y concluyó en $14 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco. Para 30 g/l al quinto día se registró $322 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y al día 25 de $197 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, en la concentración de 60 g/l fue $207 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y finalizó con 153 (Fig. 6c).



a) 22 μmol/m²/s



b) 50 μmol/m²/s



c) 100 μmol/m²/s

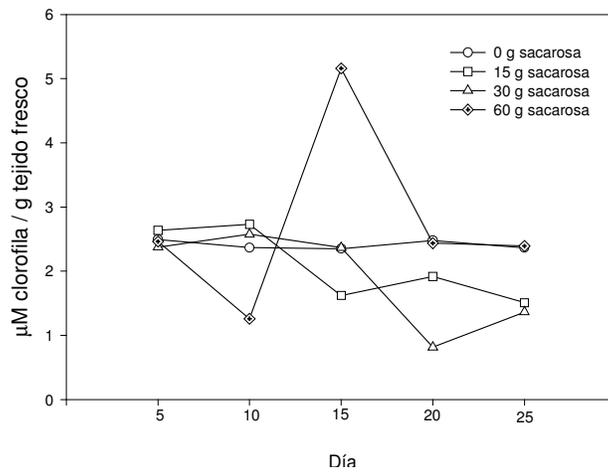
Figura 6. Concentración de clorofila total en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) en cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas (n=1).

Relación de clorofila

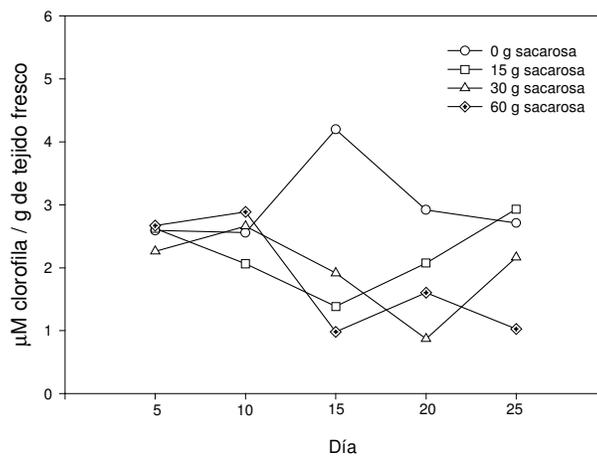
Con respecto a la relación de clorofila *a/b* para $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en 0 g/l de sacarosa inició con $2.49 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y finalizó el tratamiento en $2.37 \mu\text{M}/\text{g}$ T.F., para la concentración 15 g/l en el día 5 se registró en $2.64 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y hacia el día 25 con $1.51 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, en 30 g/l inició con $2.38 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco para concluir con $1.36 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco. Finalmente en 60 g/l de sacarosa el valor inicial fue de $2.46 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y hacia el día 25 la relación de clorofila aumentó a $2.59 \mu\text{M}/\text{g}$ T.F (Fig. 7a).

En la irradiación luminosa de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con 0 g/l de sacarosa registró un valor inicial de 2.59 para concluir con $2.71 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco. En 15 g/l en el día 5 tuvo un valor de $2.63 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y concluyó con $2.93 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco. En las concentraciones de 30 y 60 g/l se observó una disminución del día 5 al 25, registrando valores de 2.26 a $2.16 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco y de 2.67 a $1.03 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, respectivamente (Fig. 7b).

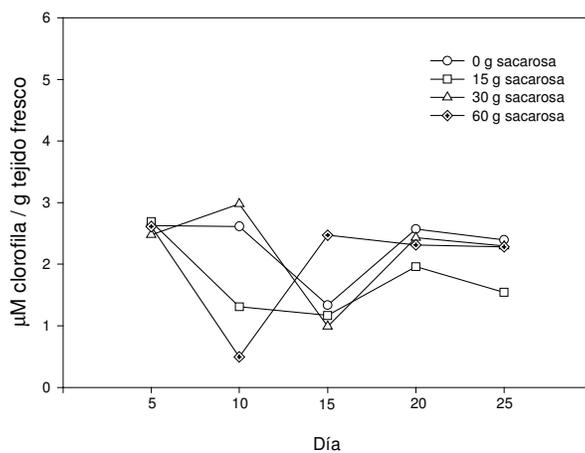
Por último en la irradiación de $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con las cuatro concentraciones de sacarosa se observó una disminución en la relación de clorofila del día 5 al 25. Obteniendo para 0 g/l valores de 2.63 a $2.39 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, en 15 g/l de 2.69 a $1.54 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, en la concentración de 30 g/l con un valor de 2.48 a $2.30 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco, y finalmente para 60 g/l de 2.61 a $2.28 \mu\text{M}$ clorofila /g tejido fresco (Fig. 7c).



a) 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



b) 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



c) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

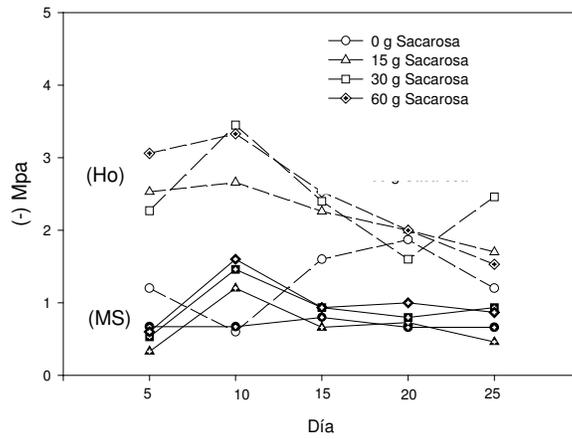
Figura 7. Relación de clorofila a/b en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) en cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas en (n=1).

Potencial osmótico

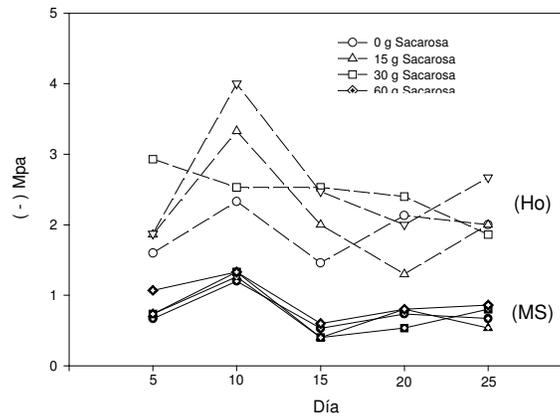
En este estudio los potenciales osmóticos registrados entre el medio de cultivo y la hoja difieren en magnitud. Es decir, el potencial osmótico de la hoja es menor que el potencial del medio de cultivo como se puede apreciar en la gráfica (8a). Para la hoja el potencial osmótico fue de -1.2 MPa en los días 5 y 25 del tratamiento con $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 0 g/l de sacarosa. Para 15 g/l el potencial fue de -2.5 MPa (día 5) y -1.70 MPa en el día 25; para 30 g/l de -2.3 MPa a -2.5 MPa y en 60 g/l de -3 MPa a -1.5 . Se observó a partir del día 15 aumentó el potencial osmótico de la hoja. De esta manera, los valores del potencial osmótico del medio en las tres irradiaciones luminosas y las cuatro concentraciones de sacarosa oscilaron entre -0.60 MPa y -0.73 MPa.

El potencial osmótico de la hoja en la irradiación de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 0 g/l de sacarosa presentó -1.6 MPa al día 5 y -2 MPa para el día 25; para 15 g/l se mantuvo alrededor de -1.9 MPa; en 30 g/l de -3 MPa disminuyó a -2 MPa, y en 60 g/l se registró un aumento de -2.7 MPa al final del tratamiento. De manera general, se observó un aumento en el potencial osmótico a partir del día 15 de iniciado el tratamiento (Fig. 8b).

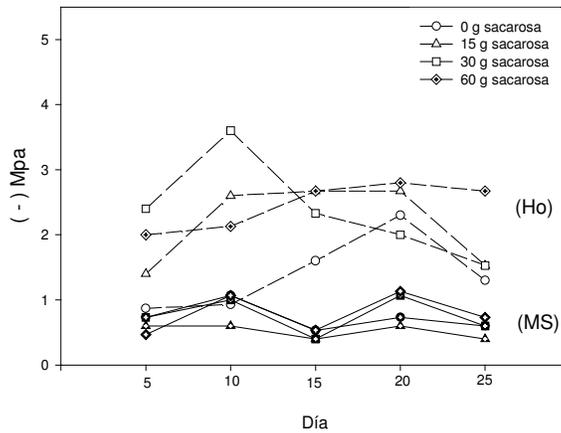
Por último, en $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 0 g/l de sacarosa el potencial osmótico de la hoja inició con -0.9 MPa y disminuyó para el día 25 a -1.3 MPa, destacando que en el día 5 el potencial era igual al del medio de cultivo. En 15 g/l el potencial se mantuvo entre -1.5 MPa; para 30 g/l de sacarosa inició con -2.4 MPa y subió a -1.5 MPa; en la concentración de 60 g/l aumentó su valor de potencial con respecto al tiempo de cultivo, registró inicialmente -2 MPa para con -2.6 MPa (Fig. 8c). Cabe destacar que el medio se encontraba con valores de entre -0.5 a -1.2 MPa, durante los 25 días de tratamiento.



a) $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



b) $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



c) $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

Figura 8. Potencial osmótico del medio MS62 (MS) y hoja (Ho) en violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) en cuatro concentraciones de sacarosa y tres irradiaciones luminosas (n=1)

Discusión

En este estudio se usó el programa analizador de imágenes digitalizadas (PAID), el cual ha sido implementado en la medición del área foliar, longitud del tallo y longitud de raíces de diferentes plantas (Garcilazo 2002). En violeta africana, este programa ha sido empleado en la medición del área foliar, como una alternativa en las hojas pequeñas obtenidas en los cultivos *in vitro* (Garcilazo 2002). Debido a su fácil manejo y bajo costo, se decidió implementar esta técnica en la digitalización de los cortes histológicos obtenidos en los tratamientos de presencia de peroxidasas y ligninas, el cual resultó ser eficiente para la localización de las peroxidasas, pero no así para las ligninas. Esto se debe a que el programa se basa en la detección de cuerpos oscuros y las peroxidasas presentaron tonalidades más fuertes (café oscuro) mediante la tinción con DAB, lo que facilitó identificar su presencia, ya que el programa puede restar el porcentaje de cuerpos claros de los oscuros que se encontraron en la imagen digitalizada. En el caso de las ligninas no se pudo evidenciar su presencia, debido a que presentaron una tonalidad rosa en la tinción debida a la reacción con fluoroglucinol, de esta manera el programa detectaba la tonalidad rosa como un cuerpo claro y no se obtenía una medición real, sin embargo sí fue posible detectar la presencia de ligninas en los diferentes cortes de tallo (Fig.1). En el caso de violeta africana la formación y presencia de ligninas se da en el haz vascular del pecíolo; además se sabe que la presencia de ligninas esta asociada principalmente a la actividad de peroxidasas de pared celular y sirve en la mayoría de los casos para darle rigidez al tallo de plantas en desarrollo (Barceló 1998).

Las peroxidasas unidas a pared participan en los últimos pasos de la síntesis de ligninas y son responsables del ensamblaje entre las ligninas y formación de fenoles que inducen la rigidez de la pared celular (Lee y Lin, 1995; Sánchez et al, 1995). Recientemente las ligninas, se han asociado con la lignificación en elementos del xilema de plantas vasculares durante sus primeras etapas de desarrollo, como es el caso de *Zinnia elegans* (López-Serrano et al. 2004), *Pinus halapensis*, *Populus alba*, *Citrus aurantium*, donde la producción de peróxido de hidrógeno esta ligada a los tejidos del xilema lignificados, a su vez estos procesos inician con la oxidación de los alcoholes cinamílicos hasta ligninas, por medio de las peroxidasas unidas a pared (Barceló 1998). Por tanto, las peroxidasas unidas a pared celular juegan un papel importante en las primeras etapas del crecimiento de violeta africana cultivadas *in vitro*, contribuyendo a darle rigidez al pecíolo. En este caso, la actividad de peroxidasas es baja o poco considerable (Fig. 2), y existe la posibilidad de que este comportamiento se deba a una relación inversa que se da en la actividad de las peroxidasas unidas a pared con respecto al crecimiento de coleótilos y raíces en plantas que se encuentran en medios bajo condiciones de anoxia (Lee y Lin 1995). Así, la actividad o presencia de peroxidasas en estas condiciones puede ser baja y no registrarse, debido al efecto de las condiciones anaerobias impuestas en el medio, como sucede en coleótilos de arroz (Lee y Lin 1995).

Por otro lado, la presencia de peroxidasas solubles (proteínas solubles) en todos los tratamientos tuvo una disminución drástica del día 10 al 25 tanto en peciolo como en hoja, sin embargo, esta disminución no es efecto de un tiempo largo de incubación, si no que la actividad de las peroxidasas puede variar en cuestión de horas por efecto de las condiciones anaeróbicas del medio proporcionado por el agar, así como por la condiciones microambientales presentes en el medio (Fig. 3). De esta manera, la disminución de la actividad de peroxidasas respecto al tiempo, se debió a que la planta estuvo en un periodo de aclimatación a las condiciones de cultivo, ya que en otras plantas cultivadas *in vitro* como es el caso de la papa (*Solanum tuberosum*), se ha obtenido que la actividad de peroxidasas (como proteína soluble) a distintas concentraciones de sacarosa, puede ser baja en los primeros 15 días del tratamiento, sin embargo tiende al aumento aproximadamente a los 20 días (Reyna 2002).

En otros trabajos como el de Rout *et al.* (2000), realizado con *Psoralea corylifolia*, se demostró que la mínima actividad de peroxidasa soluble se presentó en los dos primeros días de tratamiento y aumentó a los 6 días del mismo, para mantenerse hasta el final. Lo mismo sucedió en el cotiledón de *Phaseolus vulgaris* (Lima *et al.* 1997) y en coleoptilos de arroz (*Oryza sativa*) donde la actividad de peroxidasas solubles presentó un aumento en los primeros 5 días de desarrollo (Lee *et al.* 1995). Los resultados obtenidos respecto a la presencia de peroxidasas (proteínas solubles) en este trabajo, mostraron que la actividad disminuyó con el tiempo, ya que al inicio del experimento (día 5) la presencia de peroxidasas fue la mayor y probablemente se debe a que las plántulas provienen de un cultivo *in vitro* ya establecido de 60 días, donde la actividad de peroxidasas fue alta (Datos no mostrados). Esta situación es contraria a lo que se sugiere en tratamientos con diferentes intensidades de luz donde la actividad de peroxidasa aumenta como una respuesta a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por tanto como un factor que promueve la protección y retardo de la senescencia de plantas en desarrollo (Chang y Kao 1998).

Respecto a los resultados obtenidos en peso fresco total, no se observaron diferencias entre los tratamientos de 0, 15, 30 y 60 g/l de sacarosa a 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, por tanto no se registró ningún efecto sobre el peso fresco total debido a la combinación de estos factores (Fig. 4 a). Sin embargo, se observó que en el peso fresco del peciolo en las mismas condiciones se dio un ligero aumento al término del experimento (Fig. 5a), pero no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de sacarosa para peso fresco total, peso fresco de peciolo y de hoja a estas condiciones de luz. En el caso de 50 y 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ los tratamientos con y sin sacarosa no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se observó un desarrollo adecuado en la morfología de la planta en este medio, como se hace referencia en estudios de cultivos *in vitro* para violeta africana en presencia de sacarosa y bajas intensidades de luz (Lo 1997).

De esta manera, se pudo observar un buen desarrollo de la planta en el medio de cultivo y esto mismo se puede corroborar con las características morfológicas del tallo, hojas y presencia de raíz (datos no reportados). Esta última, fue más notoria en los tratamientos de 30 y 60 g/l de sacarosa donde fueron más largas y ramificadas, ya que en 0 y 15g/l de sacarosa fueron muy pequeñas o incluso no se presentaron. Este comportamiento puede estar asociado, con la presencia de una fuente de energía como la sacarosa, ya que en varios estudios sobre la cantidad y longitud de raíces de plantas cultivadas *in vitro*, se ha observado que a concentraciones de entre 20 y 60 g/l de sacarosa como fuente externa de carbono, hay una relación positiva entre la longitud, peso y cantidad de raíces, con respecto a la concentración de este azúcar (George 1996; Calvete *et al* 2002). Por otro lado, se observó un aumento en el grosor del tallo y un número mayor de hojas nuevas, especialmente en 30 y 60 g/l de sacarosa. Por tanto, el incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se puede relacionar con el aumento en el peso fresco de la plántula (Maldonado 1994), y así, el poco aumento en peso fresco que se obtuvo en este experimento, se debió al tiempo tan corto de incubación de las plántulas al medio de cultivo y a las bajas intensidades de luz a las que estuvieron sometidas.

La concentración de clorofila total disminuyó durante el tiempo del tratamiento, las plántulas iniciaron con una cantidad mayor de clorofila total y al día 25 presentaron alrededor del 50% de la cantidad con el se inicio el tratamiento. El valor más alto de clorofila total final fue de 204 $\mu\text{M/g}$ de tejido fresco en el tratamiento de 22 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ y 60 g/l de sacarosa y el valor más bajo 13.38 $\mu\text{M/g}$ de tejido fresco a 100 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ y 15 g/l de sacarosa (Fig.6).

La concentración de clorofila total obtenida después de los 25 días de tratamiento fue baja, con respecto a los obtenidos en ensayos *in vitro* en plántulas de papa a 25, 50 y 100 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ de irradiación luminosa, donde los valores van de 500 a 800 $\mu\text{M/g}$ de tejido fresco (Ortiz 2000). Respecto a los valores de la relación de clorofila a/b estos se encontraron entre 1.54 y 2.7 al termino del tratamiento (Fig.7), es decir son valores que se asemejan mucho a los obtenidos en cultivos *in vitro* de plantas que crecen bajo condiciones de baja irradiación (Huang *et al.* 2003). Este comportamiento se debió a que las plantas que se encontraron creciendo a bajas intensidades lumínicas o de sombra, tienen la capacidad de incrementar su captación de energía lumínica, mediante cambios en las proporciones de clorofila a y b, disminuyendo esta capacidad en ambientes de alta iluminación. De esta manera la proporción de clorofila a/b está íntimamente relacionada con la luz, así un aumento en la concentración de clorofila b se da bajo condiciones de baja luminosidad y viceversa (Ryberg *et al.* 1980; Ortiz 2000).

El comportamiento general de la violeta africana bajo condiciones de cultivo *in vitro* durante los 25 días de tratamiento tuvo una disminución del contenido de clorofila total y por tanto de la actividad fotosintética y esto se dio como una respuesta a la aclimatación de la plántula al ser subcultivada. Así, este comportamiento en violeta africana puede estar asociado con el papel que juega la sacarosa como fuente de carbono y la cantidad de luz disponible para las plantas cultivadas *in vitro*. Este funcionamiento se ha demostrado para algunas plantas cultivadas en estas condiciones (*in vitro*) donde la fotosíntesis puede ser baja, además la luz y la sacarosa son la fuente de energía. Esta última indispensable para su crecimiento (Pospisilova *et al.* 1998).

De esta manera, la relación de clorofila a y b, y la actividad fotosintética de la planta están relacionadas con la fuente de carbono exógeno del medio, de la cual depende la planta en sus primeras etapas de desarrollo y posteriormente se va preparando el mecanismo fotosintético para desempeñar su papel normal, hasta el periodo de aclimatización a un medio externo, donde se desempeñara ampliamente su papel autótrofo (fotosíntesis), el cual requiere de tiempo para ser eficiente después su aclimatización al suelo (Pospisilová *et al.* 1999).

Con respecto al potencial osmótico se observó una diferencia entre el potencial del medio de cultivo y el potencial osmótico de la hoja en este experimento (Fig.8). De esta manera, hubo un ajuste osmótico del tejido al medio de cultivo y probablemente este sea uno de los primeros eventos celulares que ocurren en la diferenciación de órganos, de esta manera la diferenciación de brotes u otra organogénesis, puede estar asociada con la diferencia de potencial y así la formación de brotes difiere en su necesidad osmótica con respecto a la formación de callos o embriones (Brown y Thorpe, 1980). Esta diferencia de potenciales encontrada entre el medio de cultivo y el tejido vegetal parece implicar cierto grado de estrés en el sistema *in vitro*; pero sin duda, esto permite la absorción de nutrientes, aún cuando se necesita un gasto energético por parte del tejido. Así, la existencia de un equilibrio o igualdad entre ambos se puede presentar cuando el tejido muere (Ortiz, 2000). Además los valores promedios observados para el medio de cultivo en violeta africana son de -0.5 a -1.2 MPa en todos los tratamientos y estos valores de potencial osmótico están de acuerdo con el estudio de Ghashghaire, *et al.* (1991). Por tanto, las plántulas de violeta africana se encuentran en un proceso de aclimatización al medio y microambiente del frasco de cultivo. En el cual pudieron estar sujetas a un estrés hídrico, debido al cambio en las condiciones del medio (tratamientos), ya que en el medio anterior (60 días de cultivo), tanto la humedad relativa como el potencial hídrico podrían estar en equilibrio. De esta manera, la respuesta de la plántula al medio es gradual, lo que le permitirá a ésta desarrollarse completamente cuando se obtenga un equilibrio en las condiciones ambientales del medio de cultivo.

Conclusiones

- ◆ La peroxidasa (proteínas solubles) disminuyeron con el tiempo de incubación, como un efecto de la aclimatización a las condiciones del medio de cultivo.
- ◆ El peso fresco total de pecíolo y de hoja de violeta africana propagada *in vitro* no aumentó durante los 25 días de incubación.
- ◆ La síntesis de clorofila total y clorofila a/b no presentó diferencias con las tres irradiaciones lumínicas.
- ◆ Las cuatro concentraciones de sacarosa y las tres irradiaciones lumínicas afectaron la presencia de peroxidasa y lignina en violeta africana propagada *in vitro*.
- ◆ Las concentraciones de sacarosa permiten un aumento en el potencial osmótico de la hoja en violeta africana propagada *in vitro*, lo cual se reflejó en el desarrollo de la planta.

Recomendaciones

Para estudios posteriores el tiempo de incubación para plántulas de violeta africana debe ser mayor a 30 días para observar una mayor expresión y presencia de actividad de peroxidasas y ligninas. Ya que se observó, que un período de 25 días corresponde a una aclimatación a las condiciones y al medio de cultivo. Además, se sugiere realizar un experimento mediante aclimatización ex vitro para conocer la presencia y actividad de peroxidasas y ligninas que favorecen el desarrollo y crecimiento de violeta africana en condiciones naturales después de la propagación in vitro. Así, como utilizar un número mayor de repeticiones para tratar de disminuir la variación de los datos obtenidos.

Referencias

Björkman O. y Demmig-Adams B. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. En Schulze E. y Caldwell M. (Ed). 1994. Ecophysiology of Photosynthesis. Springer-Verlag, Berlin.

Boeuf G., Legrand B. & Rambour S. 1999. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *Physiologia Plantarum*. 106:331-336.

Brainerd K.E., y Fuchigami L.H. 1981. Acclimatization of aseptically culture apple plants to low relative humidity. *Journal Amer. Soc. Horticultural Science* 106: 515 - 518.

Chang C.J. & Kao C.H. 1998. H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkenss. *Plant Growth Regulation*. 25: 11-15.

Chen Y.A., Shin J.W. & Liu Z.H. 2002. Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. *Plant Physiology Biochemical*. 40: 33-39.

Dami I. y Harrison H. 1995. Leaf anatomy and water loss of in vitro PEG-traeted "Valiant" grape. *Plant cell, tissue and organ culture* 42: 179 – 184.

Debergh. P., Harbaoui Y. y Lemeur R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential . *Physiologia Plantarum* 53: 181 – 187.

Dehon L., Macheix J.J. & Durand M. 2002. Involvement of peroxidases in formation of brown coloration of heartwood in *Junglans nigra*. *Journal Experimental of Botany* 53(367): 303-311.

De Rezende M.A.L., Bortolotti D.S.A. & Pascual M. 2000. Aclimatacao de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha Wendl*) obtenidas in vitro: Efeitos do substrato. *Cienc. Agrotec. Lavras*. 24 (1):9-12.

Garcilazo P.P. 2002. Propuesta y calibración de un método alternativo para la determinación de área foliar mediante análisis de imágenes digitalizadas. Tesis de Licenciatura.. F.E.S. Iztacala U.N.A.M. Méx. 29 p.

Gaspar T., Penel C., Thorpe T. & Greppin H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Universidad de Geneva, Geneva. 132p.

Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A & Thorneley R.N.F. 1996. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Journal Biochemical*. 313: 841-847

George E.F. & Sherrington P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Tomo 1. Ed. Exegetics limited. Inglaterra. p.p. 1-3, 331-382.

Ghashghaire J., Brenckmann F. y Saugier B. 1991. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 82: 73-78

Grout B.W.W & Aston M.J 1978. Modified leaf of Cauliflower Plantlets regenerated from meristem culture. *Annales de botanica*. 42:993-995.

Harrison J.C. Möller M. & Cronck C.B.Q. 1999. Evolution and development of floral diversity in *Streptocarpus* and *Saintpaulia*. *Annals of Botany*. 84: 49-60.

Huang L.C, Weng J.H., Wang C.H., Kuo C.I. & Shieh Y.J. 2003. Photosynthetic potentials of in vitro-grown juvenile, adult and rejuvenated *Sequoia sempervirens* (D.Don Endl. Shoots. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 31-35.

Kerby K. & Somerville C. 1992. Purification on an infection related extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiology*. 62: 397- 402.

Kevers C., Coumans M., Coumans-Guillés M.F y Gaspar Th. (1984). Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 61:69-74.

Kevers C. y Gaspar T.1985. Soluble membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonialyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured in vitro. *Journal of Plant Physiology* 118: 41 – 48.

Koch K.E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annual Rev. of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509 – 540.

Kovtun Y. y Daie J. 1995. End product control of carbon metabolism in culture grown sugar beet plants. *Plant Physiology* 108: 1647 – 1656.

Lee T.M. & Lin Y.H. 1995. Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa L.*) coleoptiles and roots. *Plant Science*. 106: 1-7.

Lima G., Fernández A. & Cataneo A. 1998. Alteracoes na actividade da peroxidase e do conteúdo de carboidratos em medioca cultivada *in vitro* sob esstresse salina. *Scientia Agrícola*. 55: (3).

Lo K.H. 1997. Factors affecting shoot organogénesis in leaf disc culture of African Violet. *Science Horticulture*. 72:49-57.

López-Serrano M., Fernández M.D., Pomar F., Pedreño M.A. & Ros Barceló A. 2004. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single cell tracheary elements and xylem vessels. *Journal of experimental botany*. 55 (396) 423-431.

Maldonado V.M.A. 1994. Efecto del medio de cultivo *in vitro* sobre el potencial osmótico y la síntesis de prolina de papa (*Solanum sp. L.*). Tesis de licenciatura. E.N.E.P. Iztacala. U.N.A.M. Méx. 62 p.

McDougall G.J. 1992. Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. *Phytochemistry*. 31(10): 3385-3389.

Möller M. & Cronk C.B.Q. (1997) Origin and relationships of *Saintpaulia* (Gesneriaceae) based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *American Journal of Botany*. 84(8): 956-965.

Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

Murashige T. 1974a. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review Plant Physiology*. 25:135-166.

Murashige T. 1974b. Propagation through cultures. *HortScience*. 9: 2-3.

Normanly J., Slovin J.P. & Cohen J.D. 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiology*. 107: 323-329.

Ortiz M.J.G. 2000. Respuestas fisiológicas y bioquímica de papa (*Solanum sp.*) var. Tollocan bajo diferentes condiciones de cultivo *in vitro*. Tesis de M en C. ENCB-IPN Méx. 75 p.

Pierik R.L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi Prensa. Madrid. p.p.15-37.

Pospíšilová J., Tichá I., Kadlecek P., Haisel D & Plzánková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497.

Repka V. 1999. Improved histochemical test for *in situ* detection of hydrogen peroxidase in cells undergoing oxidative burst or lignification. *Biología Plantarum* 42 (4): 599-607.

Reyna V.M. 2002. Actividad peroxidasa y su relación con la aclimatización en plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) var. Tollocan, cultivadas *in vitro*. Tesis de licenciatura. F.E.S. Iztacala U.N.A.M. Méx. 40 p.

Ros Barceló A. 1998. Hydrogen peroxidase production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Annals of botany*. 82: 97-103.

Rout G.R., Samantaray S. y Das P. 2000. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* lin: peroxidase activity as a marker. *Plant Growth Regulation*. 30: 215-219.

Ryberg H., Axelsson L., Windell K. & Virgin H. 1980. Chlorophyll b accumulation grana formation in low intensities of red light. *Physiologia Plantarum*. 49: 431-436.

Sánchez M., Revilla G. & Zarra I. 1995. Changes in peroxidase activity associated with cell wall during Pine hypocotyl growth. *Annals of Botany*. 75: 415-419.

Schopfer P. 1994. Histochemical demonstration and localization of H₂O₂ in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiology*. 104: 1269-1275.

Schwann, Th. 1839. *Microscopische untersuchungen über die Uebereinstimmung in der struktur und dem wachstume der tiere und Pflanzen*.

Siegel B.Z. 1993. Plant peroxidases an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*. 12: 303-312.

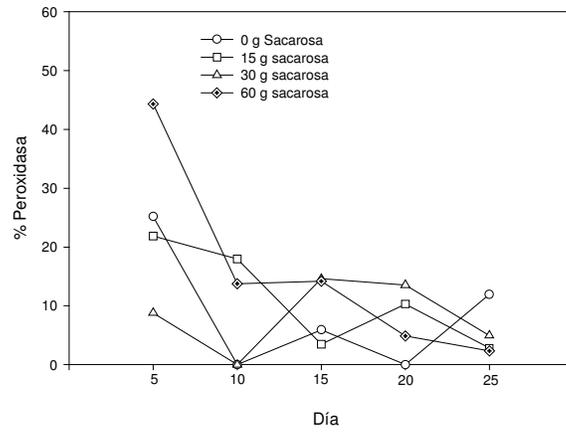
Savitsky P.K., Gazaryan I.G., Tishkov V.I., Lagrimini L.M., Ruzgas T. & Gorton L. 1999. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalyzed by plant peroxidase: Specificity for the enzyme structure. *Biochemical Journal* 340: 579-583.

Sunpui W. & Kanchanapoom K. 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*. *Songklanakarin Journal Science Technology*. 24 (3): 357-364.

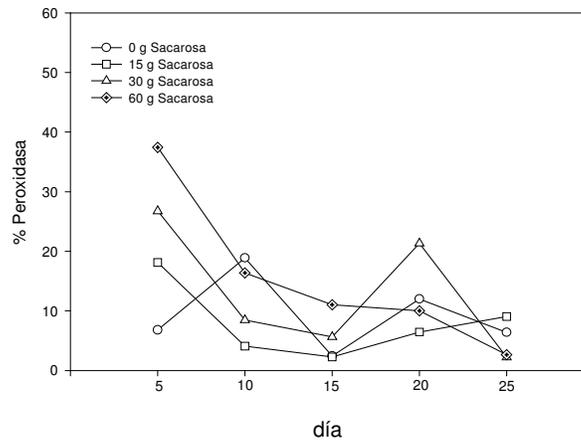
Tichá I., Cáp F., Pacovská D., Hofman P., Haisel D., Capková V. y Schäfer C. 1998. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 102: 155 – 162.

Torres K.C. 1989. *Tissue culture techniques for agricultura crops*. Ed. Van Nostrand Reinhold. New York, U.S.A. p.p.27-65.

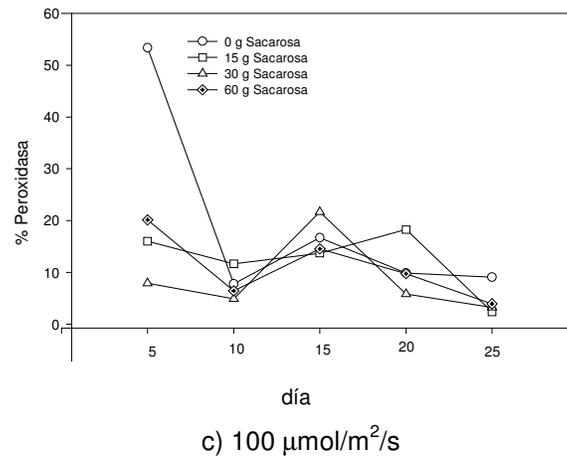
Wardle K., Dobbs E.B. y Short K.C. 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal American of the soc. Horticultural Science*. 108: 386 – 389.



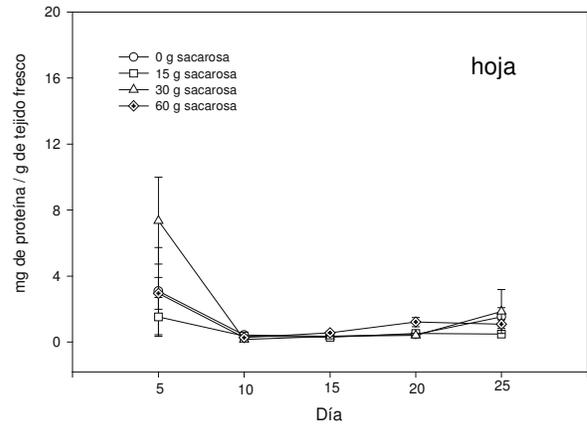
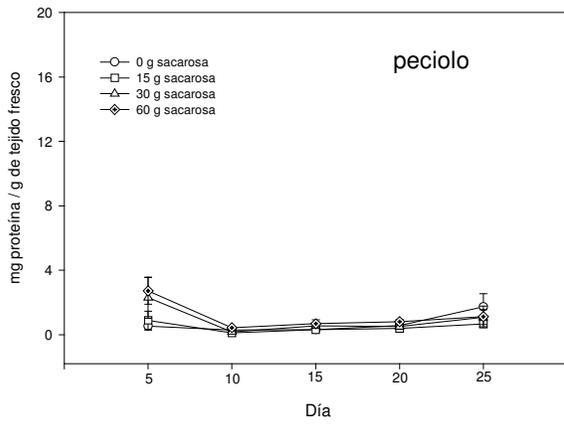
a) 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



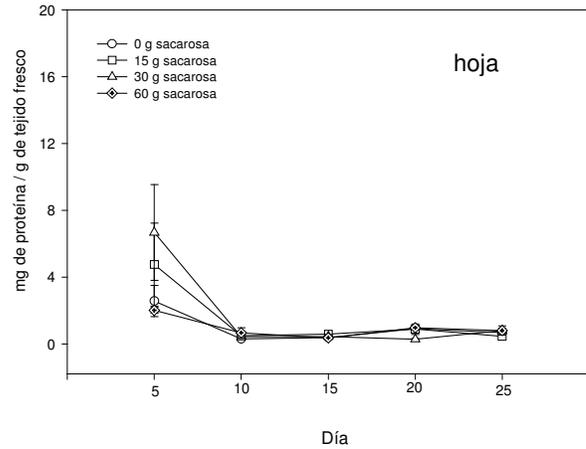
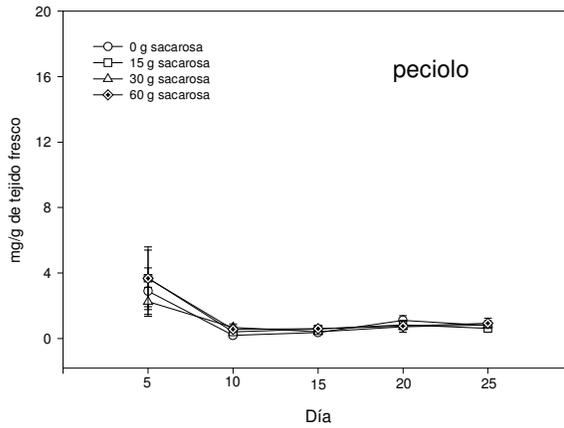
b) 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



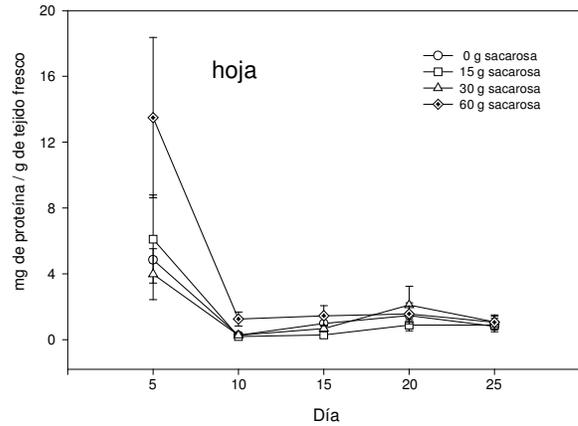
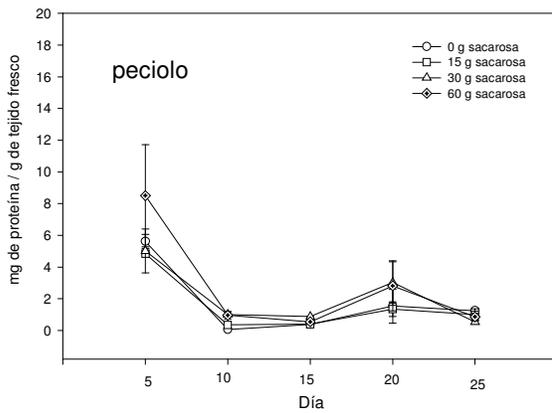
c) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



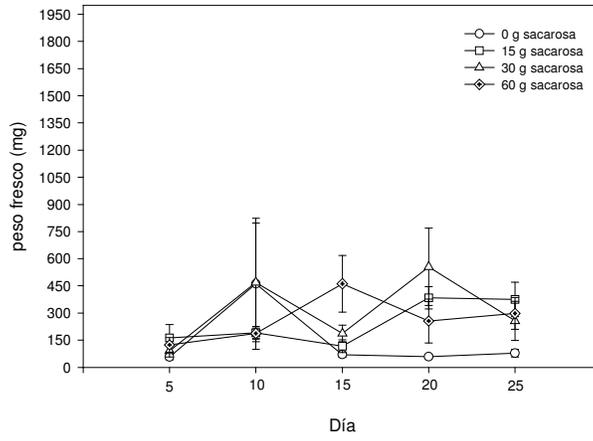
a) 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



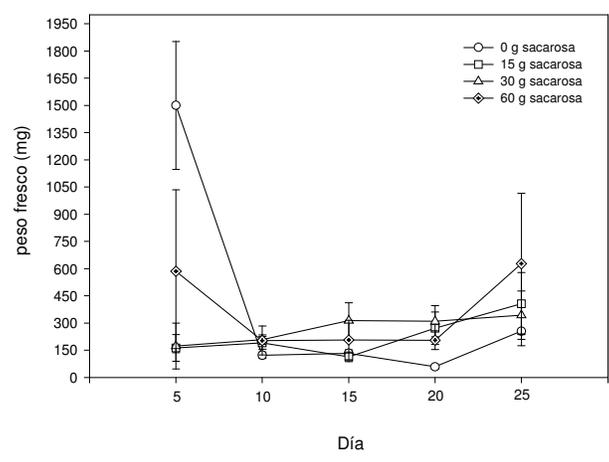
b) 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



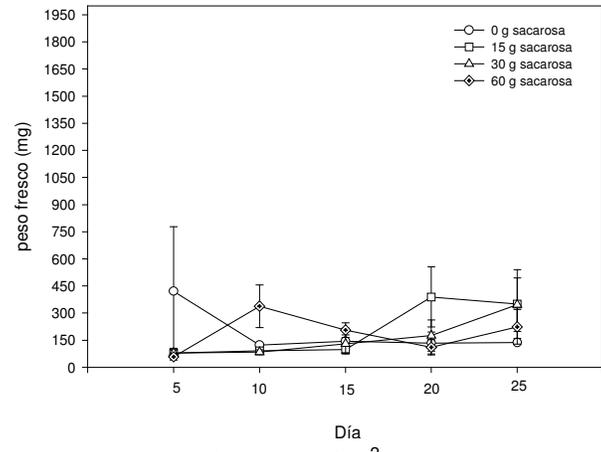
c) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



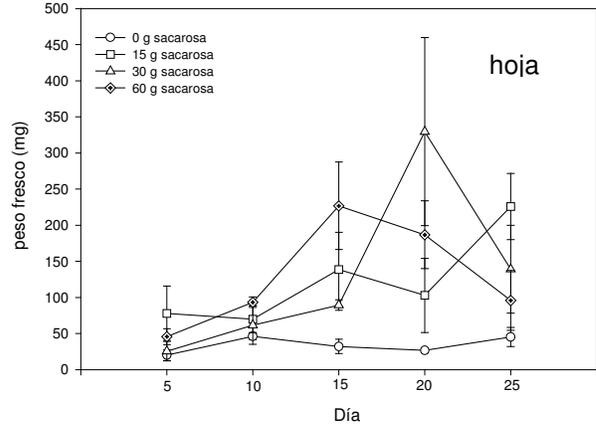
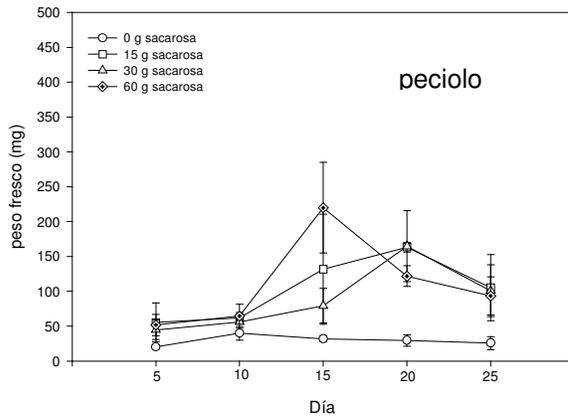
) 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



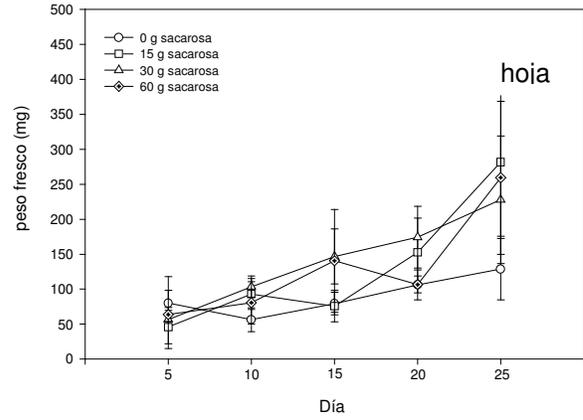
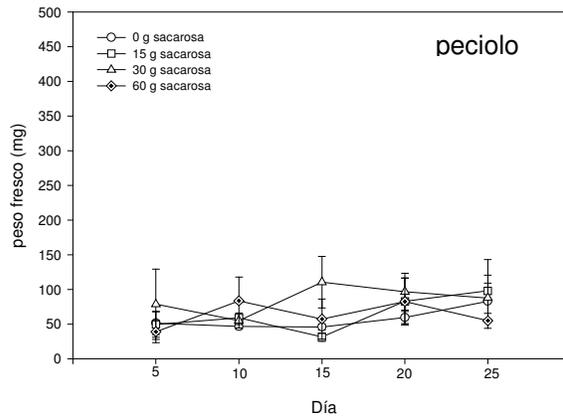
b) 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



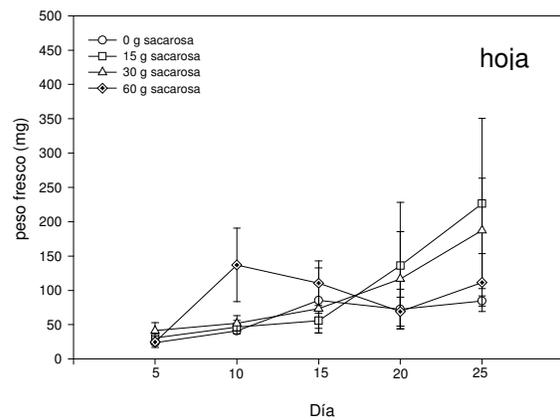
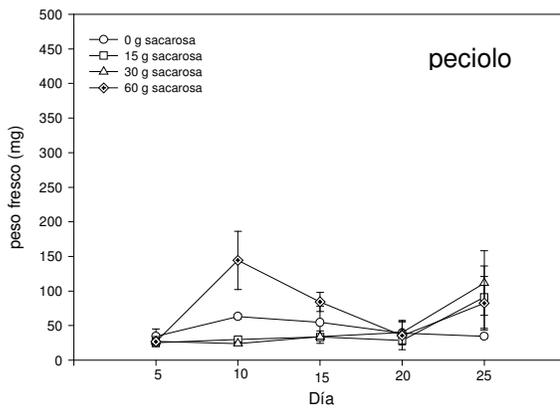
c) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



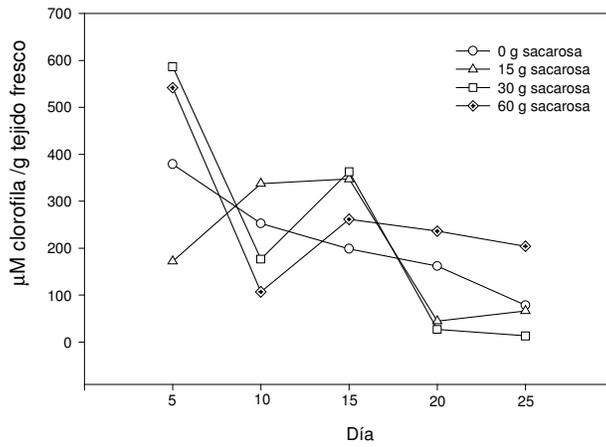
a) 22 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$



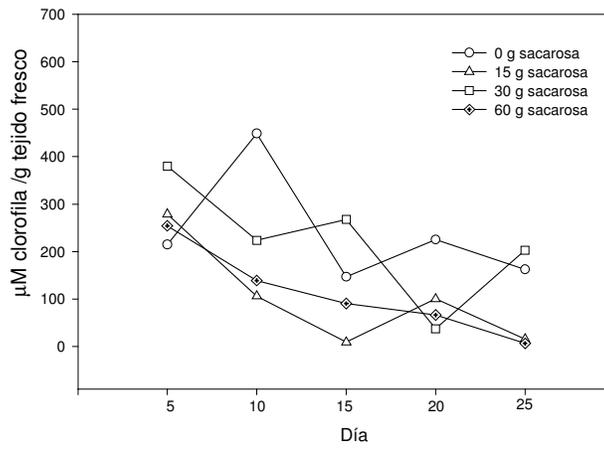
b) 50 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$



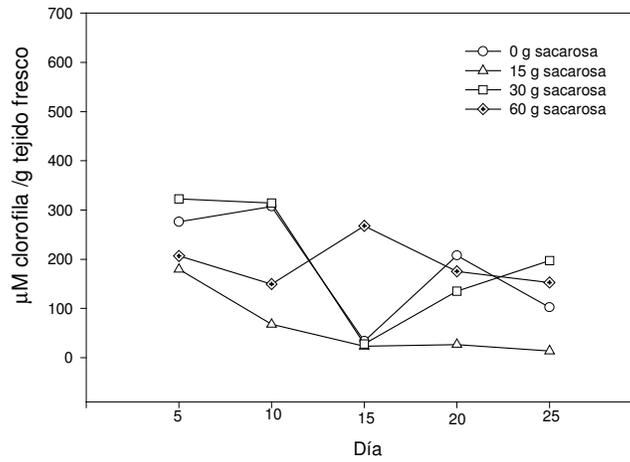
c) 100 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$



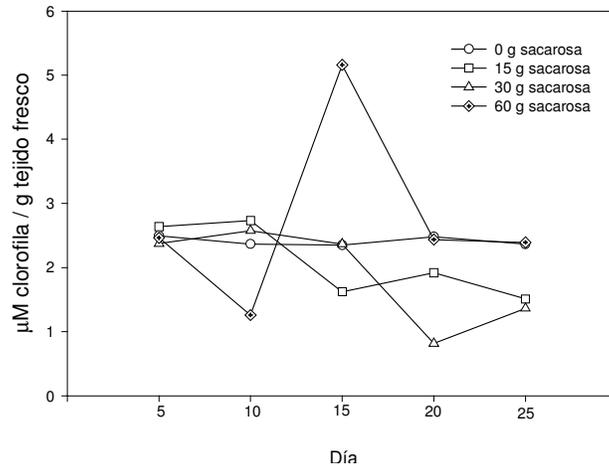
a) 22 µmol/m²/s



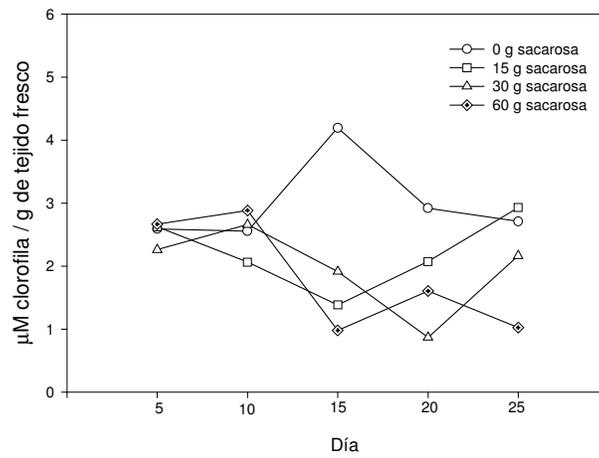
b) 50 µmol/m²/s



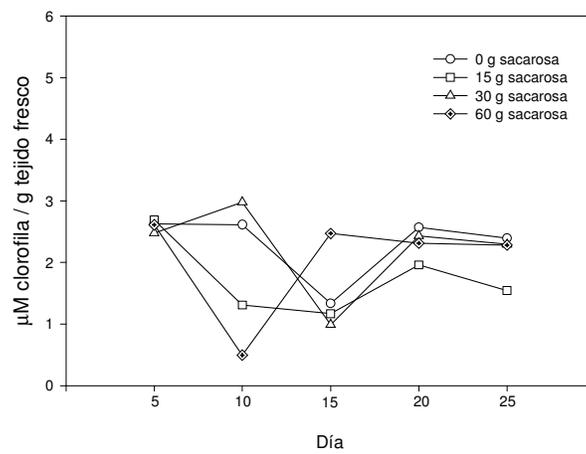
c) 100 µmol/m²/s



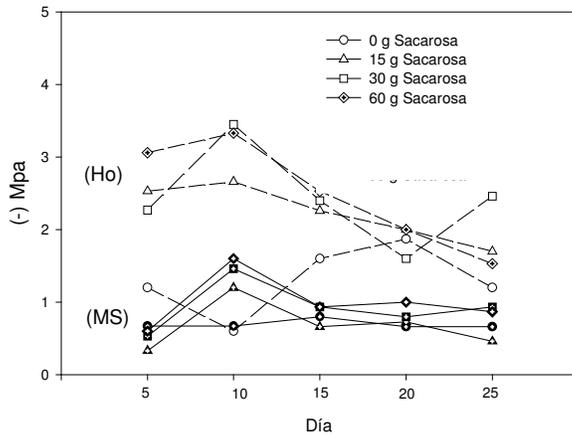
a) $22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



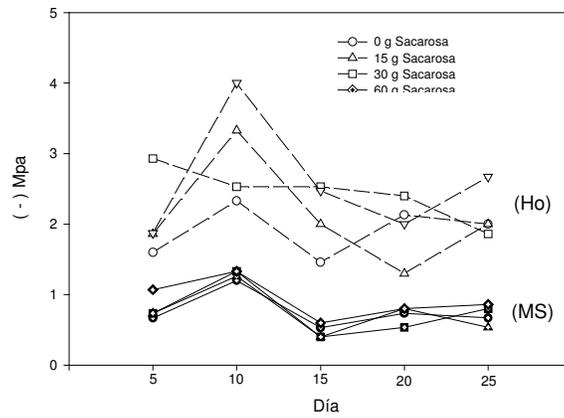
b) $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



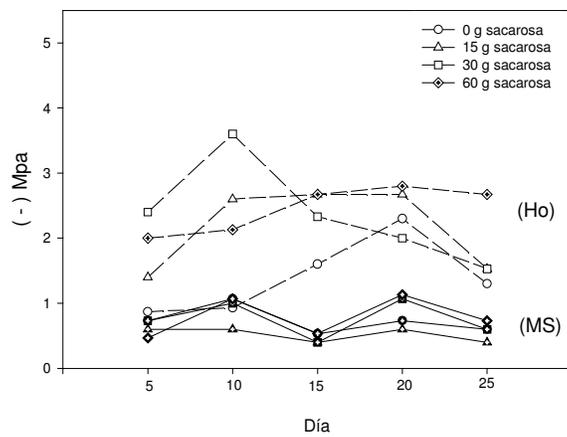
c) $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



a) 22 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



b) 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



c) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

Apéndice

Abreviaturas

AIA	Ácido indol acético
ANOVA	Análisis de Varianza
BAP	Benzil amino purina
CoA	Coenzima A
DAP	3-3`-diaminobenzidina
e.e	Error estándar
FFF	Flujo de fotones fotosintético
g	Gramo
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrógeno
KI	Yoduro de potasio
l	litro
MPa	Mega pascal
μM	micro molar
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
M	Molar
MS62	Murashige y Skoog 1962
n	Número de repeticiones
PAID	Programa analizador de imágenes digitalizadas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
T.F	Tejido fresco
UV/VIS	Ultravioleta / visible
W	Watt