

EFEECTO DE DIFERENTES AGENTES GELIFICANTES EN LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO *IN VITRO* DE PLÁNTULAS DE *ECHINOCACTUS PLATYACANTHUS* LINK ET OTTO (CACTACEAE)

EFFECT OF DIFFERENT GELLING AGENTS ON *IN VITRO* GERMINATION AND SEEDLING DEVELOPMENT OF *ECHINOCACTUS PLATYACANTHUS* LINK ET OTTO (CACTACEAE)

A.L. López-Escamilla^{1,2}; M. López-Herrera¹, y C. Loaiza-Alanís¹

¹Laboratorio de Morfofisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Mineral de la Reforma, Hidalgo, 42184.

²Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad Nacional Autónoma de México; Ex-Fábrica San Miguel Morcón s/n, San Miguel Contla, Santa Cruz Tlaxcala, Tlaxcala, 90640. Correo electrónico: lopezescamilla@st.ib.unam.mx

RESUMEN

El agente gelificante puede tener un efecto en el crecimiento y desarrollo en los cultivos *in vitro*. El objetivo del estudio fue evaluar diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo de plántulas de *Echinocactus platyacanthus in vitro*. Las semillas se esterilizaron y se germinaron en medio de cultivo Murashige y Skoog a la mitad de la concentración de sus sales y solidificado con diferentes agentes gelificantes: 6 g L⁻¹ Agar-Agar (Sigma), 8 g L⁻¹ Bacto agar (Difco), 8 g L⁻¹ agar bacteriológico (Bioxon) y 3 g L⁻¹ Gelrite Gellan Gum (Sigma). Se evaluó el índice y porcentaje de germinación, el crecimiento de las plántulas y la concentración de clorofilas. El mayor porcentaje de germinación se registró en el medio de cultivo gelificado con Agar-Agar, seguido de Gelrite, Bioxon y Bacto-Agar, el mayor índice de germinación fue en Gelrite y el menor en Bacto-Agar. Los resultados muestran diferencias en el alto y ancho de

las plántulas germinadas, largo de la raíz y el contenido de clorofilas, influenciados por el agente gelificante empleado. Aunque no se observan diferencias en el potencial hídrico de los medios, es evidente que cada agente gelificante tiene características fisicoquímicas como la fuerza del gel que permitirá mayor o menor disposición de agua del medio de cultivo.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, agentes gelificantes, germinación, clorofila, *Echinocactus platyacanthus*, Cactaceae.

ABSTRACT

The gelling agent can have an effect on growth and development *in vitro* cultures. The aim of this study was to evaluate of different gelling agents in germination and development of seedlings *Echinocactus platyacanthus in vitro*. Seeds were sterilized and germinated on half strength concentration Murashige and Skoog (MS50%)

media solidified with different gelling agents: 6 g L⁻¹ Agar-Agar (Sigma), 8 g L⁻¹ Bacto-Agar (Difco), 8 g L⁻¹ bacteriological agar (Bioxon) and 3 g L⁻¹ Gelrite Gellan Gum (Sigma). The germination index and percentage, plant growth and chlorophylls were evaluated. The highest percentage of germination was recorded in the culture medium gelled with agar-agar, followed by Gelrite, Bioxon and Bacto-Agar, the highest germination index was in Gelrite and lowest in Agar-Agar. The results show differences in the height and width of the germinated seedlings, root length and chlorophyll content which are influenced by the gelling agent used. Although no differences were observed in the water potential of the media, it is clear that each gelling agent has physicochemical characteristics such as gel strength will enable varying water available from the culture medium.

Key words: *in vitro* culture, agars, germination, chlorophyll, *Echinocactus platyacanthus*, Cactaceae.

INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo cumplen con los requerimientos nutricionales necesarios para sostener el crecimiento de los tejidos vegetales establecidos *in vitro* y la respuesta morfo-genética depende sustancialmente del medio de cultivo empleado (Szabados *et al.*, 1993). Algunos de ellos son específicos y se adaptan a un sólo tipo de tejido o a una determinada especie vegetal, mientras que otros como el medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), son ricos en sales lo que ha permitido ser utilizado en diversas especies (George, 1993; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Se conocen como agentes gelificantes a los componentes

del medio de cultivo que se utilizan para que éste permanezca en un estado semisólido y que proporciona sostén al explante. El agar es una mezcla de polisacáridos que se extraen de las paredes de las algas rojas *Pterocladia*, *Gelidiella* (McLachan, 1985 citado por Babbar y Jain, 1998; Montilla-Escudero *et al.*, 2011) debido a sus propiedades físico-químicas es el agente gelificante más utilizado en el cultivo de microorganismos y plantas (Amer, 1982; Singha, 1982; Jain y Babbar, 2002; Babbar *et al.*, 2005; Jain y Babbar, 2006; Dobránszki *et al.*, 2011; Montilla-Escudero *et al.*, 2011), pero es el componente más caro en la preparación del medio de cultivo (Jain y Babbar, 2002; Babbar *et al.*, 2005), ya que incrementa en un 70% el costo total del medio (Prakash, 1993 citado por Mohamed *et al.*, 2010). Por lo que se han realizado estudios buscando agentes gelificantes menos costosos y relativamente puros, entre ellos están Agarosa y AgarGel compuesto de polisacáridos obtenidos de *Gelidium*, *Gracillaria* (Dobránszki *et al.*, 2011); Gellan gum y Gelrite o Phytigel son heteropolisacáridos secretados por bacterias del género *Sphingomonas* (Bajaj *et al.*, 2007) o producto de la fermentación de varias especies de *Pseudomonas* (Shungu *et al.*, 1983); Isubgol, proviene del mucílago de las semillas de *Plantago ovata* (Babbar y Jain, 1998); gum Katira, goma insoluble derivado de la corteza de *Cochlospermum religiosum* (Jain y Babbar, 2002), Xanthan gum, polisacárido producido por *Xanthomonas campestris* (García-Ochoa *et al.*, 2000; Jain y Babbar, 2006) algunos proveen claridad de los geles y bajos costos (Podwyszynska y Olszewski, 1995). El tipo de agente gelificante y las concentraciones a ser empleadas pueden ser tan importantes como la selección de la mezcla ideal de nutrientes. Diversos trabajos han probado

la eficacia de los diferentes agentes gelificantes en el desarrollo de los tejidos, la germinación de embriones somáticos o formación de brotes en especies leñosas, herbáceas o de importancia hortícola (Amer, 1982; Singha, 1982; Gulsen y Dumanoglu, 1991; Ladyman y Girad, 1992; Chacón *et al.*, 2000; Clapa *et al.*, 2010; Saglam y Cifici, 2010; Dobránski *et al.*, 2011; Veitía *et al.*, 2012). En cactáceas la germinación y propagación *in vitro* se realiza utilizando preferentemente agar bacteriológico (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Choreño-Tapia *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; Retes-Pruneda *et al.*, 2007) y pocas veces con Phytigel (Santos *et al.*, 2001; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). Se considera que los agentes gelificantes no deben intervenir en el crecimiento y desarrollo del material inoculado (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Montilla-Escudero *et al.*, 2011), aunque se ha podido observar en diferentes estudios que el agar no es inerte fisiológicamente, dependiendo de su origen y en el proceso de purificación pueden quedar impurezas minerales y orgánicas (Szabados *et al.*, 1993; Dobránski *et al.*, 2011) que modifican las características químicas y físicas del medio de cultivo (Debergh, 1983) y pueden afectar significativamente el desarrollo de los tejidos puesto que posee cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento (Amer, 1982; Singha, 1982; Gulsen y Dumanoglu, 1991; Ladyman y Girad, 1992; Saglam y Cifici, 2010; Veitía *et al.*, 2012), así mismo le confiere diferentes particularidades en el potencial hídrico que permitirán una mayor o menor toma de agua y nutrimentos al tejido, que se reflejará en las características fisiológicas y morfológicas del explante, causando hiperhidratación y necrosis (Chacón *et al.*, 2000; Cárdenas y Villegas, 2002; Dobránski *et al.*, 2011;

Veitía *et al.*, 2012). Los objetivos del presente trabajo fueron analizar el efecto de cuatro diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae), determinar si el medio con los distintos agentes gelificantes después de tres meses de incubación modifica su potencial hídrico y evaluar el contenido de clorofilas en las plántulas provenientes de los medios gelificados con los diferentes agentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Elaboración de medio de cultivo con cuatro agentes gelificantes

Se elaboró medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50% de todos sus componentes incluyendo la sacarosa (MS50%) se ajustó el pH a 5.7-5.8 con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio (0.1 M), el agente gelificante se adicionó a los medios ya preparados en las siguientes proporciones: Agar-Agar (Sigma) 6 g L⁻¹; Bacto agar Difco 8 g L⁻¹; Agar bacteriológico (Bioxon) 8 g L⁻¹; Gelrite Gellan Gum (Sigma) 3 g L⁻¹; se vertieron 30 ml de medio en frascos de alimento infantil con capacidad de 125 ml y la esterilización se realizó en una autoclave a 121°C a 1.5 Kg/cm² durante 18 min. Como grupo testigo se consideró un lote de 30 semillas sembradas en una mezcla de sustrato compuesta de piedra pómez y arena (1:1)

2. Cultivo *in vitro*

Semillas de *Echinocactus platyacanthus* colectadas en la localidad de Buena Vista, en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo se escarificaron en H₂SO₄ por 15 segundos, se lavaron con detergente líquido comercial Dawn® (15 min), desin-

fectadas superficialmente en una solución de Microdyn® (15 min), alcohol etílico al 70% (2 min) y blanqueador doméstico 30% (v/v) (6% de cloro activo) (30 min), en condiciones asépticas se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada (1 min c/u). Se sembraron las semillas en los medios de cultivo MS50% solidificados con los diferentes agentes gelificantes. Para cada tratamiento se usaron tres lotes de 30 semillas que se distribuyeron colocando cinco semillas por frasco, con seis repeticiones. En total por cada tratamiento se emplearon 90 semillas. Todos los cultivos se incubaron a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16 h luz, $28.24 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El criterio de germinación fue la ruptura de la cubierta seminal y la emergencia de la radícula (Moreno, 1984; Baskin y Baskin, 1998). La germinación se registró diariamente hasta que germinó la totalidad de las semillas. Se calculó el porcentaje de germinación y el índice de germinación (IG) con la fórmula $\Sigma (ni \ t_i) / N$, donde n es el número de semillas germinadas en el día i, t es el número de días transcurridos desde que se inició el experimento y N es el número total de semillas (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996, citado en Álvarez *et al.*, 2004).

3. Medición del potencial hídrico

Se evaluó el potencial hídrico de los medios de cultivo MS50% solidificados con los distintos agentes gelificantes en dos condiciones: un día después de ser elaborados (medio fresco) y después de tres meses de permanecer en las mismas condiciones de incubación mencionadas en la germinación. Para realizar las mediciones del potencial hídrico, se tomó una muestra de cada medio de cultivo que se colocó en charolas de plástico de forma circular de 40 mm de diámetro

por 12 mm de profundidad y se introdujeron en la cámara psicométrica (WP4 Dewpoint PotentiaMeter, Decagon Devices Inc.). Se tomaron ocho frascos de cada medio y de cada frasco se obtuvieron seis muestras, para dar un total de 48 mediciones para cada tipo de medio, en la medición de cada seis muestras pertenecientes a un frasco, se eliminó la cifra mayor y la menor, por lo que en total quedaron 32 cifras, de las cuales se obtuvo el promedio.

4. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofila total fue determinado por el método de Arnon (Arnon, 1949) que consistió en pesar 1 g de plántulas de tres meses de edad procedentes de los medios solidificados con los diferentes agentes gelificantes. La muestra se colocó en un mortero al cual se adicionaron pequeños volúmenes de acetona al 80% no excediendo los 10 mL, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante seis minutos y 3 mL del sobrenadante se colocó en cubetas de espectrofotómetro, se leyó la absorbancia a 663, 645 y 440 nm. Se realizaron 30 lecturas para cada muestra procedente de los diferentes agentes gelificantes así como del grupo testigo. Se calculó el porcentaje de pigmentos tomando en cuenta el peso fresco y se utilizó la fórmula propuesta por Machinney en 1941 (Rodés-García y Collazo-Ortega, 2006) que se modificó de acuerdo al volumen final del extracto de pigmentos (9 mL)

$$\% \text{ de pigmentos} = C (\text{peso de la muestra} / \text{volumen del extracto (9 mL)}) / \text{peso}$$

Donde C es la concentración de pigmentos en mg L^{-1} obtenida a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ca (mg L}^{-1}\text{)} = 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645})$$

$$\text{Cb (mg L}^{-1}\text{)} = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})$$

$$\text{C a+b (mg L}^{-1}\text{)} = 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})$$

$$\text{Cc (mg L}^{-1}\text{)} = 4.695 (A_{440}) - 0.268 (C \text{ a+b})$$

El número de semillas germinadas se evaluó diariamente hasta los 20 días de su siembra. A los datos obtenidos de la germinación, potencial hídrico y contenido de clorofilas se realizó el análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre los distintos agentes gelificantes. Se utilizó el programa SPSS Statistics 17®.

RESULTADOS

1. Medición del potencial hídrico y germinación

El potencial hídrico registrado en el medio solidificado con los diferentes agentes gelificantes fue muy similar. En el medio fresco se obtuvo en Agar-Agar (-0.48 MPa), Bacto Agar (-0.51 MPa), Bioxon (-0.49 MPa), Gelrite (-0.49 MPa) y el medio con tres meses de incubación: en Agar-Agar (-0.50 MPa), Bacto Agar (-0.48 MPa), Bioxon (-0.50 MPa), Gelrite (-0.48 MPa), no mostraron diferencias estadísticamente significativas para medio fresco ($P \geq 0.05$) y para medio con tres meses de incubación ($P \geq 0.05$). La germinación inició en los diferentes tipos de agente gelificante entre el quinto y sexto día y finalizó a los 16 días en Agar-Agar, a los 17 días con Bacto-Agar Difco y Agar Bioxon y a los 18 días con Gelrite. Los porcentajes de germinación registrados fueron en Agar-Agar (98%), Gelrite (97.7%), Agar Bioxon (86.6%), Bacto-Agar Difco (66.6%). El análisis de varianza del porcentaje e índice de germinación muestra diferencias estadísticamente significativas para el tipo de agente gelificante ($p \leq 0.05$), el mayor índice se regis-

tró con Gelrite (7.60), seguido de Agar-Agar (7.28), Bioxon (6.34) y Bacto-Agar (2.02).

Características morfológicas de las plántulas en los diferentes agentes gelificantes

Las plántulas germinadas en los distintos medios con los agentes gelificantes mostraron diferencias morfológicas en el desarrollo y proporción del hipocótilo y epicótilo, color de las espinas, en el ancho y largo total de las plántulas, posición de las aréolas y tamaño de las raíces. Las plántulas germinadas en medio gelificado con Agar Bioxon, desarrollaron más el hipocótilo que el epicótilo así como las aréolas de la región apical y lateral, con espinas y algunos tricomas, la raíz principal presentó un evidente desarrollo (fig. 1A). Las plántulas procedentes de Agar-Agar, el hipocótilo e epicótilo adquirieron una forma redonda, las aréolas se concentraron en el ápice, con espinas blancas y una gran cantidad de tricomas, se generaron varias raíces secundarias delgadas (fig. 1B). Respecto a las germinadas en medio de cultivo gelificado con Bacto-Agar Difco se desarrolló más el epicótilo, las aréolas de la zona apical y lateral están más separadas entre sí, con espinas blancas y pocos tricomas, no se desarrolló una raíz principal, sino varias cerca de la zona basal de la plántula (fig. 1C). En las plántulas germinadas en medio de cultivo gelificado con Gelrite, el hipocótilo es largo y más delgado que el epicótilo, las aréolas están más separadas entre sí con el desarrollo de espinas, se generaron numerosas raíces secundarias (fig. 1D) y el 70% de las plántulas presentaron indicios de hiperhidratación. El análisis de varianza muestra diferencias significativas para el alto, ancho de las plántulas así como para el largo de la raíz (tabla 1).

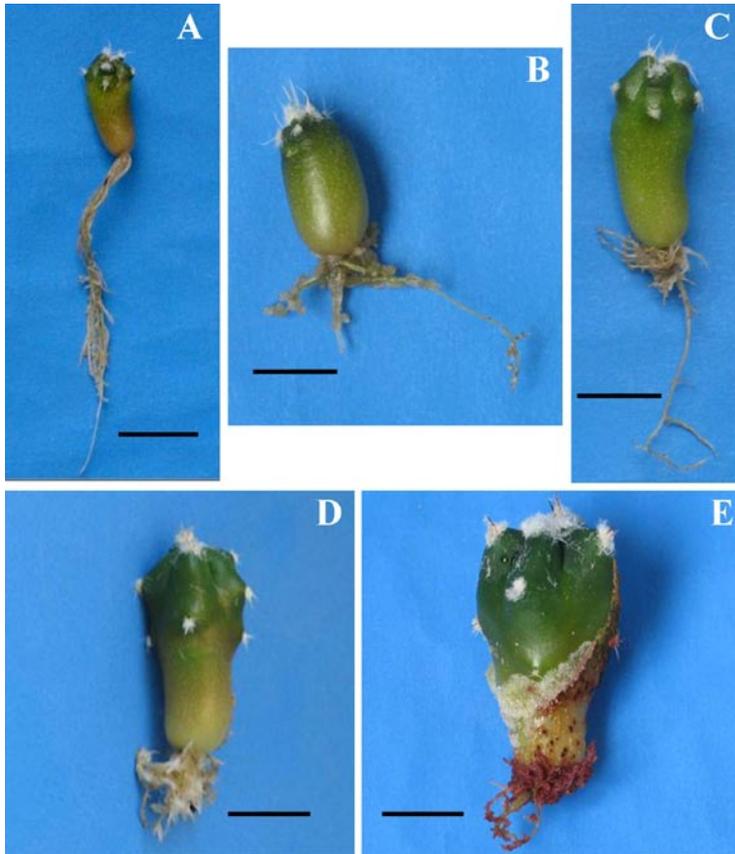


Fig. 1. Desarrollo de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* en medio MS 50% adicionado con diferentes tipos de agar y Gelrite. A) Agar Bacterológico Bioxon Barra = 8 mm; B) Agar-Agar Barra = 5 mm; C) Bacto Agar Difco Barra = 4 mm; D) Gelrite Barra = 5 mm; E) Gelrite después de dos meses de incubación. Barra = 5 mm.

Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos

La clorofila *b* está presente en mayor proporción que la clorofila *a* en todos los ensayos realizados. Los carotenos registraron datos negativos, con excepción del testigo (0.29

mgL⁻¹). El contenido de pigmentos es similar en aquellas plántulas que germinaron en medio de cultivo solidificado con Agar-Agar, Bacto-Agar Difco, Agar Bioxon y registraron mayores valores de contenido de pigmentos que las plántulas sembradas en el sustrato (grupo control), en cambio

Tabla 1. Tamaño promedio del largo de la raíz, altura y ancho de las plántulas de *Echinocactus platyacanthus* con tres meses de edad creciendo en medio MS 50%, solidificado en cuatro diferentes agentes gelificantes.

	Agar-Agar	Bacto agar (mm)	Bioxon	Gelrite
Alto	10.1b	9.55b	8.21b	13.77a
Ancho	5.03b	5.16b	4.52b	6.85a
Raíz	19.42a	18.55a	32.39b	22.08a

Letras distintas indican diferencias significativas a nivel $P = 0.05$ según prueba de Tukey

las plántulas que germinaron en Gelrite registraron los valores más bajos en todos contenidos de pigmentos. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenos ($p \leq 0.05$) (tabla 2).

DISCUSIÓN

1. Medición del potencial hídrico y germinación

El medio Murashige y Skoog (1962) se caracteriza por su gran cantidad de sales que junto con la sacarosa que se adiciona genera un potencial de -0.45 MPa (Yoshida *et al.*, 1973 citado por Cárdenas y Villegas, 2002), este valor es similar a los registrados en los medios solidificados con los distintos agentes gelificantes. La diferencia entre ellos puede ser generada por sus características físicas, entre ellas la fuerza del gel (g cm^2), que se define como la fuerza que puede ser aplicada a un gel para que se fracture (Matsushashi, 1998). Se menciona que la inhibición de la germinación se debe por la presencia de sales que disminuye el potencial hídrico y genera una menor

disponibilidad de agua para las semillas (Goycokic y Saavedra, 2007; Rodríguez *et al.*, 2014) y debe considerarse también el efecto que pueda ejercer el agente gelificante. Los diferentes porcentajes e índices de germinación obtenidos en *Echinocactus platyacanthus*, muy probablemente se deban principalmente a la disponibilidad del agua que es proporcionada por la fuerza del gel de cada agente gelificante empleado. Dependiendo del tipo de agente gelificante y la proporción de sales del medio de cultivo se han registrado diferentes porcentajes de germinación. Rosas-López y Collazo-Ortega (2002) reportaron para *Echinocactus platyacanthus* y *Polaskia chichipe* 84 y 90% respectivamente en agua-agar (10 gL^{-1}) y con medio MS50% más 10 gL^{-1} de agar el 80 y 84%. Rodríguez (2006) con *Echinocactus grusonii* obtuvo en agua-agar (8 gL^{-1}) 95%, seguido de MS 50% (94%) y MS 100% (74%), en el agua-agar no hay solutos disueltos y por lo tanto hay mayor disponibilidad de agua, pero no proporciona los nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento de las plántulas, esto se observó en semillas de *Cephalocereus senilis* sembradas en agua-agar (8 gL^{-1}) registrando 6% de

Tabla 2. Contenido de pigmentos fotosintéticos de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* sembradas en medio MS 50% solidificado con cuatro agentes gelificantes.

	Agar-Agar	Bacto agar mg L ⁻¹	Bioxon	Gelrite	Sustrato
Ca	7.1a	7.37a	6.62a	5.23b	6.81b
Cb	11.8a	11.69a	11.29a	7.94b	9.78b
C a+b	18.8a	18.77a	17.76a	13.19b	16.59b
Cc	-1.85a	-2.3a	-1.71a	-1.03b	0.29c

Letras distintas indican diferencias significativas a nivel P= 0.05 según prueba de Tukey.

germinación y con MS 100% (98%) (Tapia, 2006). Santos *et al.* (2001) establecieron *in vitro* semillas de *Astrophytum myriostigma* en medio Murashige y Skoog al 50% de la concentración de sus sales adicionado con 0.35% de Phytigel y reportaron el índice y porcentaje de germinación de 8.98 y 85% respectivamente, estos valores son cercanos a los obtenidos en el ensayo realizado con semillas de *E. platyacanthus* sembradas en medio MS adicionado con Gelrite (IG = 7.60, 97.7%). La composición de ambos agentes gelificantes Gelrite y Phytigel se basan en polisacáridos secretados por bacterias y proporcionan una fuerza del gel que oscila de 225 y 400 g cm², según las especificaciones de las hojas técnicas.

Características morfológicas de las plántulas por los diferentes agentes gelificantes

El potencial hídrico de los medios de cultivo incubados durante tres meses no presentó diferencias estadísticamente significativas pero sí se observaron diferencias morfológicas y estadísticamente significativas en el desarrollo de las plántulas de *E. plathya-*

canthus. Esto puede estar relacionado por la presencia del agente gelificante en el medio. Ghashghaie *et al.* (1991) y Beruto *et al.* (1999a) señalan que el agar es el responsable del componente mátrico del potencial hídrico del medio de cultivo y genera una fuerza del gel que será diferente entre las marcas de agar debido a sus propiedades fisicoquímicas, esta fuerza influye en la liberación de agua, limita la movilidad de los solutos en el medio e influyen en el crecimiento de los tejidos *in vitro*. Diversos trabajos han demostrado la relación entre el tipo de agente gelificante empleado y la respuesta morfogénica (Fuentes *et al.*, 1998; Beruto *et al.* 1999b, Chacón *et al.*, 2000; Garriga *et al.*, 2006). Las plántulas germinadas de *E. platyacanthus* en medio MS solidificado con Gelrite alcanzaron una mayor talla (alto y ancho) esto pudo deberse a que este agente gelificante proporciona una fuerza del gel de 225-400 g cm² y por lo tanto hay una mayor disponibilidad de agua, pero ocasionó que las plántulas tuvieran tendencia a la hiperhidratación. Este fenómeno es reportado frecuentemente en trabajos de micropropagación de cactáceas Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; de la Rosa-Carrillo *et al.*, 2012;

García-Osuna *et al.*, 2011 citado en Lema-Rumińska y Kulus, 2014) y se refiere al contenido excesivo de agua en los tejidos *in vitro* que genera diferentes características morfológicas y anatómicas, como hojas alargadas, tallos delgados, reducción del sistema vascular, cutícula delgada, desorganización de los cloroplastos, tilacoides, cambios en los niveles de clorofila-carotenoides y actividad enzimática afectando la eficiencia fotosintética (Debergh *et al.*, 1992; Poljuha *et al.*, 2003; Balen *et al.*, 2003; 2012 citados en Lema-Rumińska y Kulus, 2014). Entre las principales causas de la hiperhidratación están el potencial osmótico y la concentración de agar en el medio de cultivo (George, 1993; Cárdenas y Villegas, 2002). Es importante mencionar que el medio gelificado con Gelrite después de tres meses de incubación se fue tornando líquido, probablemente al envejecimiento físico del medio que se da a nivel de la microestructura del gel, donde los enlaces no covalentes son rotos y reformados causando inestabilidad y el gel se hace sensible a la retrogradación y/o sinéresis que consiste en la contracción del gel con pérdida de líquido (Hawley y Lewis, 1993, citado por Pasquel, 2001). Esta liberación de agua provocó que las condiciones físicas del cultivo se modificaran, incrementando la humedad relativa dentro del contenedor y promoviendo la hiperhidratación

Pigmentos fotosintéticos

Las plantas cultivadas *in vitro* por las condiciones de incubación presentan cambios en sus características morfológicas, anatómicas y fisiológicas como en la concentración de clorofila por efecto del agente gelificante. Reil y Berger (1997) encontraron que la acumulación de clorofila se incrementó en

células de *Coleonema album* creciendo en agar Oxoid de 90 a 120 mg Kg⁻¹ y al utilizar Gelrite la acumulación fue de 175 a 250 mg Kg⁻¹, encontrando el mismo patrón de acumulación para monoterpenos. Premkumar *et al.* (2001) reportaron mayores concentraciones de clorofila a, seguido de carotenos y clorofila b en plantas de fresa, roble, aguacate y olivo cultivados *in vitro* en medio Murashige y Skoog solidificado con Agar-agar Sigma (7 g L⁻¹). Las plántulas de *E. platyacanthus* germinadas en Gelrite registraron los valores más bajos en el contenido de pigmentos fotosintéticos, muy probablemente ocasionado por la hiperhidratación de los tejidos, fenómeno que influye en la eficiencia fotosintética, ya que la estructura de los cloroplastos es defectuosa y el contenido de clorofila bajo, lo que se reflejará en una menor tasa fotosintética (Reil y Berger, 1997, Kevers *et al.*, 2004). El contenido de clorofila en las plantas *in vitro* puede ser explicado por la presencia de citocininas y carbohidratos exógenos en el medio que las hacen dependientes de una fuente de carbono, así mismo se ha reportado la escasa actividad de la Rubisco, debido a alteraciones en el nivel de nitrógeno o del nivel de compuestos fotosintéticos (Ladyman y Girard, 1992; Premkumar *et al.*, 2001; Ivanova y Van Staden, 2011).

CONCLUSIONES

Se determinó que no presentan diferencias estadísticamente significativas el medio de cultivo fresco y el almacenado durante tres meses al no modificarse su potencial hídrico, aún así es posible señalar que Agar-Agar, Gelrite y Bioxon tienen mayor capacidad de ceder agua que Bacto agar lo cual se vio reflejado en los porcentajes de germinación obtenidos y en las características morfoló-

gicas de las plántulas. Una alternativa para obtener altos porcentajes de germinación y promover un rápido desarrollo de las plántulas en etapas tempranas de *Echinocactus platyacanthus* es utilizar Gelrite (3 g L⁻¹) en medio Murashige Skoog al 50% de sus componentes sólo dos meses, debido a que las plántulas posteriormente se hiperhidratan. La concentración de pigmentos fotosintéticos en medio de cultivo gelificado con Agar Bioxon, Agar-Agar y Bacto-Agar Difco fue mayor que en Gelrite por el efecto de la hiperhidratación de los tejidos que se relaciona con una menor tasa fotosintética. Dentro de las características fisicoquímicas de los agentes gelificantes, la fuerza del gel que genera cada uno de ellos son la causa de las diferencias en la germinación, desarrollo y cantidad de clorofila de las plántulas *in vitro* de *Echinocactus platyacanthus*.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio contó con el apoyo del proyecto “El cultivo de tejidos vegetales como alternativa de conservación y producción de cactáceas en peligro de extinción del estado de Hidalgo”, FOMIX-HGO-2005-C01-053, así como la beca proporcionada para la realización de este trabajo (CLA).

LITERATURA CITADA

- Álvarez, R.; H. Godínez-Álvarez, U. Guzmán, y P. Dávila, 2004. “Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación”. *Bol. Soc. Bot. Mex.*, **75**: 7-16.
- Amer, J., 1982. “Influence of agar Concentration on *in vitro* Shoot Proliferation of *Malus* sp. ‘Almely’ and *Pyrus communis* ‘Seckel’”. *Soc. Hort. Sci.*, **107**: 657-660.
- Arnon, D. I., 1949. “Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poly-phenoloxidase in *Beta vulgaris*”. *Physiol.*, **24**: 1-15.
- Babbar, S.B.; R. Jain, y N. Walia, 2005. “Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media”. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*, **41**: 258-261.
- Babbar, S.B., y N. Jain, 1998. “‘Isubgol’ as an alternative gelling agent in plant tissue culture media”. *Plant Cell Reports*, **17**: 318-322.
- Bajaj, I.B.; S. A. Survase, P.S. Saudagar, y R. Singhal, 2007. “Gellan Gum: Fermentative Production, Downstream Processing and Applications”. *Food Technol. Biotechnol.*, **45**(4): 341-354.
- Baskin C., y J. Baskin, 1998. *Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. Academic Press. San Diego, California. 666 pp.
- Beruto, M.; D. Beruto, y P. Debergh, 1999a. “Influence of agar on *in vitro* cultures: I Physicochemical properties of agar and agar gelled media”. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant.*, **35**: 137-143.
- Beruto M.; P. Curir, y P. Debergh, 1999b. “Influence of agar on *in vitro* cultures: II Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands”. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant.*, **35**: 91-104.
- Cárdenas, L.M., y A. A. Villegas, 2002. “Potencial osmótico del medio de cultivo

- con diferentes componentes para la propagación *in vitro*". *Revista Fitotecnica Mexicana*, **25**(2): 213-217.
- Chacón, A.G.; F. Saborio, L. Gómez, S. Torres, y R. Valverde, 2000. "El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de Yampi (*Dioscorea trifida*) y Ñame (*Dioscorea alata*)". *Agronomía Costarricense*, **24**: 57-64.
- Choreño-Tapia, J.M.; H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado, y A. Hernández-Livera, 2002. "Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas". *Revista Chapingo Serie Horticultura*, **8**(2): 183-196.
- Clapa, D.; A. Fira, y I. Pacurar, 2010. "In vitro propagation of *Pinguicula vulgaris*". *Bulletin UASVM Horticulture*, **67**(1): 330-335.
- De la Rosa-Carrillo, M.L.; M.S. Domínguez-Rosales, M.E. Pérez-Reyes, y E. Pérez-Molphe-Balch, 2012. "Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbincarpus*". *Interciencia*, **37**(2): 114-120.
- Debergh, P.C., 1983. "Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium". *Physiol. Plant.*, **59**: 270-276.
- Debergh, P.C.; J. Altken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. Von Arnold, R. Zimmerman, y M. Ziv, 1992. "Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation". *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **30**: 135-140.
- Dobrąnszki, J.; K. Magyar-Tábori, y E. Tombácz, 2011. "Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication". *Plant Biotechnol Rep.*, **5**: 345-352.
- Fuentes, A.D.; N. Soto, D. Alfonso, y P. Oramas, 1998. "Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28". *Biot. Aplicada*, **15**: 242-245.
- García-Ochoa, F.; V.E. Santos, J.A. Casas, y E. Gómez, 2000. "Xanthan gum: production, recovery, and properties". *Biotechnology Advances*, **18**: 549-579.
- Garriga C.M.; S. Alemán, y G. González, 2006. "Influencia del estado físico del medio de cultivo y diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem". *Biotechnología vegetal*, **6**(1): 3-7.
- George, E.F., 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The Technology. Exegetics. London.
- Ghashghaie, J.; F. Grenckmann, y B. Saugier, 1991. "Effects of concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro". *Physiol. Plant.*, **82**: 73-78.
- Goycokic, V., y G. Saavedra, 2007. "Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo". *IDESIA*, **25**(3): 47-58.

- Gulsen, Y., y H. Dumanoglu, 1991. "The effect of sucrose, agar, and pH on shoot multiplication and quality in Quince A micropropagation". *Acta Hort.*, **289**: 115-116.
- Ivanova, M., y J. Van Staden, 2011. "Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*". *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **104**(1): 13-21.
- Jain, N., y S.B. Babbar, 2002. "Gum katira—a cheap gelling agent for plant tissue culture media". *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **71**: 223-229.
- Jain, N., y S.B. Babbar, 2006. "Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media". *Plant Cell Rep.*, **25**: 81-84.
- Kevers, C.; T. Franck, R.J. Strasser, J. Dommes, y T. Gaspar, 2004. "Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **77**(2): 181-191.
- Ladyman, J.A.R., y B. Girard, 1992. "Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrate sources". *HortScience*, **27**: 164-165.
- Lema-Rumińska, J., y D. Kulus, 2014. "Micropropagation of Cacti—a Review". *Haseltonia*, **19**: 46-63.
- Maguire, J.D., 1962. "Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor". *Crop Science*, **2**: 176-177.
- Marsuhashi, T., 1998. "Agar". Dumitriu, S. (Ed.). *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. New York, 335-375 pp.
- Mohamed, M.A.H.; A.A. Alsadon, y M.S. Al Mohaidib, 2010. "Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation". *African Journal of Biotechnology*, **9**(1): 12-16.
- Montilla-Escudero, E.A.; M.F. Dulce-Rivedeneira, B. Quevedo-Hidalgo, M. Mercado-Reyes, R. Álvarez-León, J.N. Molina-Vargas, y A.A. Trespalacios-Rangel, 2011. "Efecto del tratamiento alcalino sobre la productividad y las propiedades físicas del agar-agar proveniente de *Gracilaria verrucosa*". *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, **40**(1): 75-88.
- Moreno E., 1984. *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*. Instituto de Biología, UNAM, México, 103-106 pp.
- Murashige, T., y F. Skoog., 1962. "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- Pasquel, A., 2001. "Gomas: una aproximación a la industria de alimentos". *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, **1**(1): 1-8.
- Pérez-Molphe-Balch E., M. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones, y H. Lizalde, 1998. "Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation". *In Vitro Cellular & Develop Biology-Plant.*, **34**(2): 131-135.

- Pérez-Molphe-Balch, E.M.; R. Ramírez-Malgón, H.G. Núñez-Palenius, y N. Ochoa-Alejo, 1999. *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, 179 pp.
- Pérez-Molphe-Balch, E.; M.E. Pérez-Reyes, C.A. Dávila-Figueroa, y E. Villalobos-Amador, 2002. "In vitro propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert". *HortScience*, **37**(4): 693-696.
- Podwyszynska, M., y T. Olszewski, 1995. "Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena". *Scientia Horti*, **64**: 77-84.
- Premkumar, A.; J.A. Mercado, y M.A. Quesada, 2001. "Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of *Rubisco*, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio". *J. Plant Physiol.*, **158**: 835-840.
- Reil, G., y R.G. Berger, 1997. Variation of chlorophyll and essential oils in photomixotrophic cell cultures of *Coleonema album* (Thunb.). *J. Plant Physiol.*, **150**: 160-166.
- Retes-Pruneda, J.L.; M.L. Valadez-Aguilar, M.E. Pérez-Reyes, y E. Pérez-Molphe-Balch, 2007. "Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae)". *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **81**: 9-16.
- Rodés-García, R., y M. Collazo-Ortega, 2006. *Manual de prácticas de fotosíntesis*. Las prensas de Ciencias. UNAM. México, DF, 159 pp.
- Rodríguez, G.M., 2006. "Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción". Tesis de licenciatura. Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 78 pp.
- Rodríguez, M.; M. Chacón, y R. Carrillo, 2014. "Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ungi molinae*". *Bosque*, **35**(1): 119-122.
- Rosas-López U., y M. Collazo-Ortega, 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. *grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *Phyton*, **73**: 213-220.
- Ruvalcaba-Ruiz, D.; D. Rojas-Bravo, y A.J. Valencia-Botín, 2010. "In vitro propagation of *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) an endemic and endangered cactus". *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **12**: 139-143.
- Saglam, S., y C.Y. Cifci, 2010. "Effects of agar and isubgol on adventitious shoot regeneration of woad (*Isatis tinctoria*)". *International Journal of Agriculture and Biology*, **12**(2): 281-285.
- Santos M.S.; J.M. Martín del Campo, A. Arredondo, y M.L. Santos, 2001. "Efecto del medio de cultivo, cinetina

- y agentes osmóticos sobre la respuesta morfofogenética de *Astrophytum myriosigma* (Cactacea) *in vitro*". *Revista Fitotecnia Mexicana*, **24**(2): 133-138.
- Shungu, D.; M. Valiant, V. Tutlane, E. Weinberg, B. Wiessberger, L. Koupal, H. Gadebusch, y E. Stapley, 1983. "Gelrite as an agar substitute in bacteriological media". *App. and Environ. Microbiol.*, **46**: 840-845.
- Singha, S., 1982. "Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almely' and *Pyrus communis* 'Seckel'". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **107**: 657-660.
- Szabados, L.; V.M. Núñez, L.M. Tello, G. Mafla, J. Roa, y W.M. Roca, 1993. "Los agentes gelinizantes en el cultivo de tejidos". Roca, W. M., y Mroginski, L. A (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia, pp. 79-93.
- Tapia, C.D.M., 2006. "Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie en peligro de extinción". Tesis de licenciatura. Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 73 pp.
- Veitia, N.; R. Collado, L.R. García, I. Bermúdez-Caraballoso, D. Torres, D., y C. Romero, 2012. "Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos". *Biotechnología Vegetal.*, **12**(3): 143-148.

Recibido: 29 septiembre 2014. Aceptado: 27 noviembre 2015.