

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CARACTERIZACION Y SELECCION DE  
SUSPENSIONES CELULARES DE *Cenchrus ciliaris*  
L. POR TOLERANCIA A SALINIDAD

POR:

ERNESTO RUIZ CERDA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS

MARIN, N. L. MEXICO

ENERO, 1998

TD  
SB201  
.B8  
R8  
1998  
c.1





1080110329

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



## CARACTERIZACION Y SELECCION DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Cenchrus ciliatus* L. POR TOLERANCIA A SALINIDAD

POR:

ERNESTO RUIZ CERDA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS

MARIN, N. L. MEXICO

ENERO, 1998

TD  
SB201  
- B8  
R8  
1998



T

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CARACTERIZACION Y SELECCION DE SUSPENSIONES CELULARES DE  
*Cenchrus ciliaris* L. POR TOLERANCIA A SALINIDAD

Por

ERNESTO RUIZ CERDA

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS

Marín, N. L. México

Enero, 1998

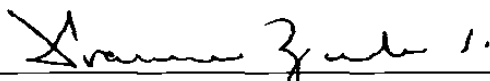
CARACTERIZACION Y SELECCION DE SUSPENSIONES CELULARES DE  
*Cenchrus ciliaris* L., POR TOLERANCIA A SALINIDAD

Aprobación de la tesis:



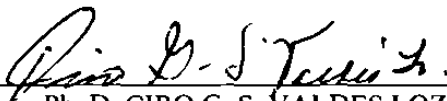
---

DRA. ELIZABETH CARDENAS CERDA  
Asesor principal



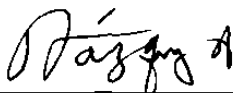
---

Ph. D. FRANCISCO ZAVALA GARCIA  
Co-asesor



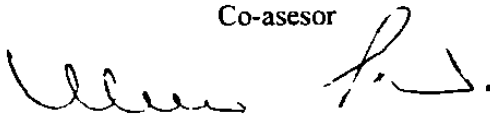
---

Ph. D. CIRO G. S. VALDES LOZANO  
Co-asesor



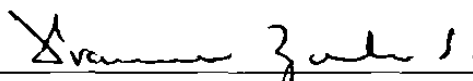
---

Ph. D. RIGOBERTO VAZQUEZ ALVARADO  
Co-asesor



---

DR. ULRICO LOPEZ DOMINGUEZ  
Co-asesor



---

Ph. D. FRANCISCO ZAVALA GARCIA  
Subdirector de estudios de postgrado

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a:

La Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda, por su gran apoyo con la orientación, tiempo dedicado a revisiones y confianza depositada en mí para la conducción y terminación del presente trabajo.

A los Doctores Francisco Zavala García, Ciro G. S. Valdés Lozano, Rigoberto Vázquez Alvarado y Ulrico Lopez Domínguez por formar parte del comité de tesis y aportarme sus valiosas sugerencias y tiempos durante la operación, discusiones y revisión del presente trabajo.

Al Dr. Emilio Olivares Saenz y al M. C. Omar G. Alvarado Gómez, por las sugerencias y aportaciones técnicas a la presente investigación, y al M. C. Cesáreo Guzmán Flores, por su apoyo en la parte del trabajo desarrollada en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la FAUANL.

Al personal y compañeros de los Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Suelos por la disposición y apoyo mostrados durante la realización del presente trabajo.

Al personal de la Unidad de recursos Genéticos, así como al personal del Invernadero y Vivero de la FAUANL, por su apoyo y aportación de materiales para la realización de la parte que correspondió al presente trabajo en éstas áreas.

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria, como mi fuente de empleo por los apoyos con tiempo, facilidades y medios económicos para la realización de mis estudios.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado durante el transcurso de mis estudios, así como el financiamiento del proyecto de tesis.

Al Consejo del Sistema Nacional de Educación tecnológica por el apoyo económico para la obtención del grado.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra a la realización de este trabajo.



## DEDICATORIA

**A Dios, que es fuente permanente e inagotable de bondad, sabiduría, comprensión y amor, por estar conmigo en todo momento y guiar mi camino para salir adelante en mis buenos propósitos**

**A mis padres Ernesto (+) y Dorotea, por su gran cariño, ejemplo y apoyo, que me han dado la confianza y seguridad para enfrentar este y otros retos en la vida**

**A mi esposa Consuelo, por su amor, comprensión y solidaridad durante la realización de mis estudios**

**A mis hijos Dorothy, Bertha, Mayra, Ernesto y Alan, por representar la continuidad y fuerza de apoyo para terminar este proyecto y seguir avanzando**

**A mis hermanos Pedro, Elida, Estela, Juan, Ramón, Narciso, Abel, Armando, José Luis y Martha, por su cariño y buenos deseos para mí**

## CONTENIDO

Capítulo	Página
LISTA DE CUADROS . . . . .	viii
LISTA DE FIGURAS . . . . .	xi
LISTA DE CUADROS DEL APENDICE . . . . .	xiv
RESUMEN . . . . .	xvii
SUMMARY . . . . .	xviii
1. INTRODUCCION . . . . .	1
2. REVISION DE LITERATURA . . . . .	6
2.1. El zacate buffel . . . . .	6
2.1.1. Descripción e importancia del cultivo . . . . .	6
2.1.2. Comportamiento de la especie en condiciones salinas . . . . .	7
2.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> . . . . .	8
2.2. La salinidad y sus efectos en plantas, tejidos y células vegetales . . . . .	9
2.2.1. Efectos adversos . . . . .	9
2.2.2. Tipos de sales . . . . .	10
2.3. Respuesta adaptativa de las plantas, tejidos y células a la salinidad . . . . .	11
2.3.1. Tipos de plantas por su respuesta a salinidad . . . . .	11
2.3.2. Factores planta y ambiente en relación con la tolerancia a sal . . . . .	13
2.3.3. Mecanismos morfofisiológicos de tolerancia . . . . .	13
2.4. Criterios para la evaluación de la tolerancia de especies vegetales a la salinidad . . . . .	15
2.4.1. Evaluación <i>in vivo</i> . . . . .	15
2.4.2. Evaluación <i>in vitro</i> . . . . .	16

Capítulo	Página
2.5. Selección de líneas celulares por tolerancia a salinidad . . . . .	17
2.5.1. Caracterización de líneas celulares . . . . .	17
2.5.2. Metabolismo celular . . . . .	18
2.5.3. Selectividad de membranas y paredes celulares . . . . .	19
2.6. Variación somaclonal inducida a través del cultivo <i>in vitro</i> . . . . .	20
2.6.1. Origen de la variación somaclonal . . . . .	20
2.7. Mejoramiento de la tolerancia a salinidad . . . . .	22
2.7.1. Mejoramiento tradicional . . . . .	22
2.7.2. Aplicación del cultivo de tejidos y células . . . . .	22
3. MATERIALES Y METODOS . . . . .	25
3.1. Selección de germoplasma <i>in vivo</i> por tolerancia a salinidad . . . . .	25
3.2. Inducción de callo a partir de carióspside de genotipos seleccionados . . . . .	29
3.3. Establecimiento de suspensiones celulares a partir de subcultivos de callo friable . . . . .	32
3.4. Caracterización y selección de suspensiones celulares bajo estrés salino . . . . .	33
3.4.1. Caracterización . . . . .	33
3.4.2. Selección . . . . .	38
3.5. Evaluación de la estabilidad de agregados celulares en distintas concentra- ciones salinas . . . . .	41
4. RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	43
4.1. Validación de la primera hipótesis . . . . .	43
4.1.1. Respuesta a la salinidad en etapa de germinación . . . . .	43
4.1.2. Respuesta a la salinidad en planta . . . . .	45
4.2. Validación de la segunda hipótesis . . . . .	49
4.2.1. Inducción de callo y selección de medio de cultivo . . . . .	49

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
4.2.2. Establecimiento y caracterización de suspensiones celulares bajo estrés salino . . . . .	51
4.2.2.1. Caracterización por peso fresco . . . . .	52
4.2.2.2. Caracterización por peso seco . . . . .	65
4.2.3 Selección de suspensiones celulares . . . . .	73
4.2.3.1. Selección por peso fresco . . . . .	73
4.2.3.2. Selección por peso seco . . . . .	77
4.2.3.3. Selección por viabilidad . . . . .	79
4.3. Validación de la tercera hipótesis . . . . .	81
4.3.1. Estabilidad de la tolerancia a NaCl en agregados celulares de suspen- siones seleccionadas . . . . .	81
5. CONCLUSIONES . . . . .	87
6. RECOMENDACIONES . . . . .	89
7. BIBLIOGRAFIA . . . . .	91
8 APENDICE . . . . .	99

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Sales básicas componentes de los medios de cultivo MS y B5 (Mroginski, L. A. y W. M. Roca, 1991) . . . . .	30
2. Accesiones de zacate buffel ( <i>Cenchrus ciliaris</i> L.) preseleccionadas por mayor porcentaje relativo de germinación, entre 99 accesiones probadas con solución salina (100 mM de NaCl) y sin esta . . . . .	44
3. Medias para cuatro características de planta de dos genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo tres tratamientos de NaCl . . . . .	46
4. Porcentajes de reducción promedio de cuatro características de planta obtenidos en base a un testigo por genotipo (0 mM de NaCl), de dos genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., en dos concentraciones de NaCl . . . . .	48
5. Porcentajes de cariósides que presentaron inducción de callo y peso fresco de callo de tres genotipos en dos medios de cultivo y dos concentraciones de 2, 4-D. . . . .	51
6. Peso fresco observado de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	53
7. Peso fresco predicho de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	55



8. Tasa relativa de crecimiento de células en base a peso fresco predicho para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	57
9. Tiempos de duplicación de células en días en base a peso fresco predicho para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	59
10. Número de duplicaciones de células en base a peso fresco predicho para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	61
11. Indices de tolerancia a NaCl de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L. en distintos periodos de crecimiento . . . . .	62
12. Viabilidad de células (%) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	64
13. Peso seco observado de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	66
14. Relación (promedio) de Peso fresco/Peso seco de células para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	68
15. Valores promedio de Tasa Relativa de Crecimiento en base a peso seco predicho de suspensiones celulares de <i>C. Ciliaris</i> L. en cuatro tratamientos de NaCl. . . . .	70
16. Potencial hídrico observado (bars) de suspensiones celulares bajo cinco tratamientos de NaCl en distintos periodos del crecimiento (sin repeticiones). . . . .	72
17. Pesos frescos observados de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de <i>C. ciliaris</i> L., en una concentración de NaCl (180 mM), pretratadas previamente con NaCl en distintas concentraciones . . . . .	74

18. Pesos secos observados de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de <i>C. ciliaris</i> L.,-en una concentración de NaCl (180 mM) pretratadas previamente con NaCl en distintas concentraciones . . . . .	77
19. Porcentajes de viabilidad de células observados en suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L., pretratadas en distintos niveles de NaCl e inoculadas para selección en medio de cultivo con 180 mM de NaCl . . . . .	80
20. Peso fresco (g) y % de reducción de agregados celulares para tres líneas celulares de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro tratamientos de NaCl a seis semanas de la transferencia a cajas petri . . . . .	84
21. Medias de porcentaje de peso fresco (g) de agregados celulares, transformados a valores angulares, de dos líneas celulares seleccionadas, L1 y L2 respecto a una línea testigo L0 de <i>C. ciliaris</i> L., bajo cuatro niveles de NaCl . . . . .	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Diagrama del dispositivo utilizado para germinación de cariósides de zacate buffel. Método UNI-MARIN-FAUANL (Guzmán y Puente, 1993) . . . . .	27
2. Accesiones de <i>C. ciliaris</i> L., seleccionadas por mayor porcentaje de germinación relativa bajo tratamientos de 0 y 100 mM de NaCl . . . . .	44
3. Crecimiento en peso fresco observado de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L., para cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	53
4. Crecimiento en peso fresco predicho de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L., para cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	55
5. Tasa relativa de crecimiento de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L. para cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	57
6. Tiempo de duplicación de células de <i>C. ciliaris</i> L. para cuatro tratamientos de NaCl, en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	59
7. Número de duplicaciones de células de <i>C. ciliaris</i> L. para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	61

8. Índices de tolerancia a NaCl de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L., en distintos periodos de crecimiento . . . . .	63
9. Viabilidad de células de <i>C. ciliaris</i> L. para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión . . . . .	64
10. Crecimiento en peso seco observado de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L. en distintos tratamientos de NaCl . . . . .	66
11. Crecimiento en peso seco predicho de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	67
12. Relación peso fresco/peso seco de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L. bajo cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	69
13. Tasa relativa de crecimiento en base a peso seco de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	71
14. Potenciales hídricos de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L., en cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	73
15. Crecimiento en peso fresco observado de suspensiones celulares de <i>C. ciliaris</i> L., en 180 mM de NaCl, pretratadas con distintas concentraciones de NaCl . . . . .	76
16. Crecimiento en peso seco observado de células de <i>C. ciliaris</i> L., en 180 mM de NaCl, pretratadas con distintas concentraciones de NaCl durante su ciclo de cultivo en suspensión . . . . .	78
17. Viabilidad observada de células de <i>C. ciliaris</i> L. en 180 mM de NaCl, pretratadas con distintas concentraciones de NaCl durante su crecimiento en suspensión . . . . .	81

18. Comportamiento de líneas celulares seleccionadas por tolerancia a salinidad (NaCl) de *C. ciliaris* L., bajo distintos tratamientos de NaCl *in vitro*. . . . . 85



## LISTA DE CUADROS DEL APENDICE

Cuadro	Página
1A. Análisis de varianza para número de tallos por planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	100
2A. Análisis de varianza para altura de planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	100
3A. Análisis de varianza para peso fresco de planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	100
4A. Análisis de varianza para peso seco por planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	101
5A. Análisis de varianza para % de tallos por planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo dos concentraciones de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	101
6A. Análisis de varianza para % de altura de planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo dos concentraciones de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	101
7A. Análisis de varianza para % de peso fresco de planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo dos concentraciones de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	102

8A. Análisis de varianza para % de peso seco de planta de tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., bajo dos concentraciones de NaCl (Marín, N. L., 1996) . . . . .	102
9A. Análisis de varianza para % de carióspside que formó callo en tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., en dos medios de cultivo y dos concentraciones de ácido 2,4-D. . . . .	102
10A. Análisis de varianza para peso fresco de callo (g) inducido en tres genotipos de <i>C. ciliaris</i> L., y dos concentraciones de ácido 2,4-D . . . . .	103
11A. Análisis de varianza para peso fresco de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de <i>C. ciliaris</i> L. en seis períodos de muestreo y cuatro tratamientos de NaCl. . . . .	103
12A. Análisis de varianza para viabilidad de células ( $\text{g } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de <i>C. ciliaris</i> L., en seis períodos de muestreo y cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	103
13A. Análisis de varianza para peso seco de células ( $\text{g } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de <i>C. ciliaris</i> L., en seis períodos de muestreo y cuatro tratamientos de NaCl, para selección . . . . .	104
14A. Análisis de varianza para peso fresco de células ( $\text{g } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro períodos de muestreo y cinco pretratamientos de NaCl, para selección . . . . .	104
15A. Análisis de varianza para peso seco de células ( $\text{g } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro períodos de muestreo y cinco pretratamientos de NaCl, para selección . . . . .	104
16A. Análisis de varianza para % de viabilidad de células de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro períodos de muestreo y cinco pretratamientos de NaCl, para selección. . . . .	105
17A. Análisis de varianza para peso fresco de agregados celulares (g) de tres líneas celulares de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro tratamientos de NaCl. . . . .	105

18A. Análisis de varianza para porcentajes de peso fresco (g) transformados a valores angulares de agregados celulares de tres líneas celulares de <i>C. ciliaris</i> L. en cuatro tratamientos de NaCl . . . . .	105
---	-----

## RESUMEN

Ernesto Ruiz Cerda

Fecha de graduación: Enero de 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Titulo del estudio: CARACTERIZACION Y SELECCION DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Cenchrus ciliaris* L. POR TOLERANCIA A SALINIDAD

Número de páginas: 105

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Ciencias Agrícolas

Area de estudio: Mejoramiento Genético de Plantas Forrajeras

**Propósito y Método del estudio:** El zacate buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), es un pasto apomístico perenne que tiene buenas características forrajeras y tolerancia a la sequía. Sin embargo, diversos cultivares estudiados tanto en México como en otros países no han presentado tolerancia a la salinidad, por lo que el objetivo del presente estudio fue identificar líneas celulares de ésta especie con tolerancia a NaCl, mediante el aprovechamiento de la variación somaclonal que se origina a través del cultivo *in vitro* de callo y suspensiones celulares. Para caracterizar y seleccionar las líneas celulares, a partir de callo de la accesión PI-240170, seleccionada por mayor tolerancia a NaCl en etapa de germinación, se establecieron suspensiones celulares en el medio de cultivo MS adicionado con 1.0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.3 mg l<sup>-1</sup> de AIA, 100 mg l<sup>-1</sup> de mioinositol, solución de vitaminas con 2.0 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina y 0.1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, además de 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 5 g l<sup>-1</sup> de agar-gel. Las suspensiones celulares fueron tratadas con 0, 60 120 y 180 mM de NaCl y caracterizadas por peso fresco, peso seco y viabilidad durante un periodo de 36 días, con muestreos cada 6 días y posteriormente subcultivadas en medio de cultivo con 180 mM de NaCl para su selección a los 49 días del subcultivo. Las suspensiones seleccionadas en 180 mM de NaCl por mejor crecimiento provinieron de los pretratamientos 60 y 120 mM de NaCl y se denominaron, respectivamente líneas L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, las cuales conjuntamente con una línea testigo L<sub>0</sub>, no seleccionada fueron evaluadas por estabilidad de la tolerancia a sal en crecimiento de agregados celulares.

**Contribuciones y conclusiones:** Se observó que las suspensiones celulares de la accesión PI-240170 mostraron mejor adaptación a la concentración de 60 mM de NaCl que sin ésta y que durante el proceso de selección, las suspensiones pretratadas con 60 y 120 mM de NaCl presentaron mejor crecimiento en peso fresco y peso seco que el testigo y la de 180 mM de NaCl, por lo que se consideró que durante el proceso de cultivo *in vitro* se generaron cambios epigenéticos en respuesta al cloruro de sodio aplicado.

Firma del asesor principal \_\_\_\_\_



## SUMMARY

Ernesto Ruiz Cerda

graduation Date: January 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Title of the study: CHARACTERIZATION AND CELLULAR SUSPENSIONS SELECTION OF *Cenchrus ciliaris* L. FOR TOLERANCE TO SALINITY

Number of pages: 105

Candidate for the Degree  
of Doctor in Sciences with  
Specialty in Agricultural  
Sciences

Area of study: Plants Forageing Genetic Improvement

**Purpose and Method of the study:** The buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.), is an apomictic perennial grass that has good characteristics as forage and tolerance to drought. However, several cultivars that they have been studied in Mexico as well as in other countries have not presented tolerance to the salinity, therefore the objective of the present study was identified cellular lines of this kind with tolerance to NaCl, throught the utilization of somaclonal variation that is originated through of tissue culture of cellular suspensions. To characterize and select cellular lines from PI 240170 accession, selected by greater tolerance to NaCl in germination stage, cellular suspensions were established in the MS media culture, added with 1.0 mg l<sup>-1</sup> of 2,4-D acid, 0.3 mg l<sup>-1</sup> of IAA, 100 mg l<sup>-1</sup> of myoinositol, solution of vitamins with 2.0 mg l<sup>-1</sup> of glicine, 0.5 mg l<sup>-1</sup> of nicotinic acid, 0.5 mg l<sup>-1</sup> of piridoxine and 0.1 mg l<sup>-1</sup> of tiamine, 30 g l<sup>-1</sup> of sucrose and 5 g l<sup>-1</sup> of agar-gel. The cellular suspensions were treated with 0, 60 120 and 180 mM of NaCl and characterized by fresh weight, dry weight and viability throught a 36 days period, with sampling each 6 days and thereafter subcultived in the culture media with 180 mM of NaCl for its selection to 49 days of the subcultive. The suspensions selected in 180 mM of NaCl by better growth originated of the pretrataments 60 and 120 mM of NaCl were designated, respectively lines L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub>. end these lines, along with a control line L<sub>0</sub>, (not selected) were evaluated by stability to tolerance to growing salt of cellular aggregates.

**Contributions and conclusions:** It was observed that the cellular suspensions of the PI-240170 accession showed better adaptation to the concentration of 60 mM of NaCl that without this and that during the selection process. the suspensions pretreated with 60 and 120 mM of NaCl presented better growth in fresh weight and dry weight that the control and 180 mM of NaCl, treatment: therefore is considered that during *in vitro* culture process were generated epigenetic changes in response to the sodium chloride.

Main advisor signature:





## 1. INTRODUCCION

La salinidad de los suelos y la desertificación son dos factores ambientales estrechamente ligados que afectan una parte importante de la tierra aprovechable en el mundo. Alrededor de una décima parte de la superficie continental, que abarca un promedio total de 954,834,000 hectáreas se encuentra afectada en algún grado por sales, correspondiendo a México y Centroamérica una extensión aproximada de 1,965,000 ha (Szabolcz, 1991). Toenniessen (1984) consideró que las tierras áridas y semiáridas conforman aproximadamente el 40 % de la superficie total de la tierra y que la mayoría de las aguas subterráneas y algunas aguas superficiales que pueden ser utilizadas para riego en dichas regiones se caracterizan por un alto grado de salinidad natural. Este mismo autor estima que aproximadamente un tercio de la tierra irrigada en el mundo está afectada en algún grado por exceso de sal. En México, por lo menos la mitad de la superficie terrestre, corresponde a tierras áridas o semiáridas (Velazco, 1991), gran parte de las cuales están afectadas por sales, a causa de una lixiviación limitada y localizada ocasionada por la escasez de lluvias. Las altas tasas de evaporación y transpiración características de los climas áridos contribuyen a que se de una mayor concentración de sales sobre la superficie de los suelos.

Las tierras agrícolas o aquellas con potencial para incorporarse al cultivo en un futuro y que se encuentran afectadas por la salinidad, enfrentan el problema de baja productividad para la mayoría de los cultivos de importancia económica que ahí pueden establecerse. De aquí la justificación de realizar estudios que puedan generar alternativas de solución y que permitan mejorar el aprovechamiento y propiciar un mayor desarrollo de este tipo de regiones.

Algunas de las opciones viables para enfrentar el problema de la salinización de los suelos son la desalinización del agua para reducir el nivel de sales potencialmente tóxicas para las plantas, y el lavado de los suelos para remover las sales en exceso (Croughan *et al.*, 1981). Sin embargo, dadas las limitaciones que se presentan, principalmente en regiones semidesérticas, para poner en práctica dichas opciones, recientemente se ha fomentado el interés por la selección y manipulación genética de las plantas, como estrategia para obtener una mejor adaptación de éstas a los ambientes salinos (Epstein, 1976).

El mejoramiento de la tolerancia a la salinidad, carácter considerado como poligénico en algunas plantas de interés agrícola, se ha llevado a cabo utilizando metodologías tradicionales de selección e hibridación, para aprovechar la variación genética que se presenta en un espectro continuo, en el que los extremos son representados por las glicófitas más sensibles por un lado y las holófitas más tolerantes por el otro. Otra opción que se ha seguido es el uso de germoplasma exótico de algunas plantas silvestres con resistencia a la salinidad, emparentadas con especies de plantas cultivadas sensibles, con la finalidad de incorporar a éstas el carácter a través de dichas metodologías (Tal, 1984; Blum, 1988).

Sin embargo, para algunas especies vegetales el mejoramiento tradicional puede encontrarse limitado por distintos factores, principalmente por el tipo de reproducción, que puede ser asexual en alguna de sus modalidades como por ejemplo la apomíxis, en la que aunque existe la formación de semilla, no es necesaria la unión de gametos, por lo que no puede haber la combinación alélica al azar, que es fuente de la variación genética. En este caso, los individuos generados a partir de semilla desarrollada de embriones formados sin fertilización, reproducen fielmente las características de las plantas progenitoras (Hatch y Hussey, 1991; Bashaw, 1962).

Recientemente la técnica del cultivo de tejidos se ha convertido en una alternativa útil para generar variabilidad genética dirigida a encontrar fuentes de resistencia a distintos factores de estrés en grandes poblaciones de células en suspensión o aglomeradas en callos, los cuales se obtienen al llevar los tejidos de explantes a un estado de dediferenciación, como consecuencia de desequilibrios en la regulación del crecimiento, al alterar artificialmente su balance endógeno de reguladores del crecimiento, principalmente en lo que respecta a auxinas y citocininas. En este estado se propicia el fenómeno denominado "variación somaclonal", que consiste en la variación fenotípica, de origen genético o epigenético, mostrada entre plantas derivadas de cualquier forma de cultivo de células somáticas o "somaclones" (Larkin y Scowcroft, 1981)

Este fenómeno ha sido aprovechado para la selección de líneas celulares y mejoramiento de algunas especies cultivadas con características de resistencia tanto a factores de estrés biótico como abiótico, entre estas se pueden considerar: caña de azúcar, papa, tabaco, arroz, maíz, cebada y sorgo (Larkin y Scowcroft, 1981). Selecciones específicas para tolerancia a salinidad se han realizado para distintas especies cultivadas, como: alfalfa y arroz (Croughan et al., 1981); trigo (Karadimova y Djambova, 1993); y tabaco (Watad et al., 1985)

La técnica de selección *in vitro* para resistencia a sales en términos generales consiste en someter las células a concentraciones de sal que son letales o inhibitorias del crecimiento para seleccionar las que hayan sobrevivido y mostrado mejor crecimiento (Rains, 1982)

El zacate buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) es una especie que se introdujo en 1954 a México y ha mostrado un amplio rango de adaptación a diferentes ambientes ecológicos, incluyendo las zonas semidesérticas, en las que ésta especie puede representar una alternativa de producción agrícola forrajera viable por su tolerancia a la sequía. Sin embargo, dicha especie es considerada

sensible a las condiciones de salinidad del suelo, limitando su cultivo y dispersión en áreas con suelos salinos, para favorecer el desarrollo de la ganadería en éstas áreas.

La opción que se planteó en este estudio, fue proponer una alternativa de solución a la problemática antes mencionada y consistió en aplicar técnicas de mejoramiento genético de plantas a esta especie a través del cultivo de tejidos de callo y células, considerando que es de reproducción apomictica, con el propósito de caracterizar y seleccionar variantes somaclonales con mayor grado de tolerancia a un medio salino.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, para este estudio se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

#### HIPÓTESIS:

1. La variabilidad genética ocasiona diferentes grados de respuesta a factores de estrés ambiental en la especie *Cenchrus ciliaris* L., por lo tanto es de esperarse una respuesta diferencial en el cultivo de distintos genotipos de esta especie bajo ambientes salinos
2. El cultivo de tejidos y células vegetales provoca variación somaclonal en respuesta a algún factor de estrés presente, lo cual implica diferencias en comportamiento de poblaciones celulares de un mismo origen, por lo que en suspensiones celulares de *Cenchrus ciliaris* L., bajo condiciones de salinidad se espera una respuesta variable.
3. La tolerancia de suspensiones celulares está en función del nivel de sal aplicado, por lo que es posible que ésta se mantenga después de la selección *in vitro* en agregados celulares de *Cenchrus ciliaris* L.

**OBJETIVOS:**

1. **Observar la variación en la germinación de cariósides y comportamiento de plantas de distintos genotipos de *Cenchrus ciliaris* L., bajo condiciones de estrés salino provocadas con NaCl.**
2. **Evaluar la existencia de variación somaclonal por tolerancia a NaCl, través de la respuesta en crecimiento y viabilidad de suspensiones celulares de *Cenchrus ciliaris* L. bajo condiciones de salinidad (NaCl)**
3. **Seleccionar suspensiones celulares de *Cenchrus ciliaris* L., por tolerancia a salinidad (NaCl) *in vitro* y evaluar su estabilidad para conservar dicho carácter**

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. El zacate buffel

#### 2.1.1. Descripción e importancia del cultivo

El zacate buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) es una planta perenne de aproximadamente 1.0 a 1.5 m de altura, de tallos geniculados que emergen de una corona nudosa; pertenece a la familia Gramineae, subfamilia Panicoideae y tribu Paniceae. En cuanto al género, éste se ubica en el correspondiente a *Cenchrus*, aunque se le ha considerado también dentro de *Pennisetum* (Hitchcock, 1971, 1951; Bashaw, 1962). Su tipo de reproducción es por apomixis, en la modalidad de aposporia y pseudogamia y su número de cromosomas es de  $2n = 36$  (Bashaw, 1962; Hatch y Hussey, 1991).

Esta especie es originaria del sur de Africa y fue introducida a América en 1917 y a México, del sur de Texas en 1954. Actualmente se ha extendido en nuestro país en una superficie aproximada de 1,412,000 has (Ibarra *et al.*, 1991), distribuidas en varios estados de la república, entre éstos Tamaulipas, con 500,000; Nuevo León con 300,000; Sonora, con 350,000; Sinaloa, con 32,000; Michoacán, con 70,000 y Yucatán con 60,000 que en conjunto ocupan aproximadamente el 90 por ciento de la superficie total establecida (Ibarra, *et al.*, 1991; Saldivar, 1991). Reconocida como muy tolerante a la sequía (Ayerza, 1981; Rogers *et al.*, 1993; Bashaw, 1962), se le considera como una buena alternativa de producción para el trópico seco de algunas

partes del mundo como Venezuela, donde se le ha probado y se considera con potencial suficiente para sustituir otras especies de pastizal establecidas en una región de bosque muy seco que abarca unas 600,000 ha (Clavero, 1991). Cox (1991) estimó que una amplia colonización por parte del zacate buffel se ha dado por lo menos en seis países, con una cobertura de alrededor de 25 a 30 millones de hectáreas de tierras de agostadero y cultivo.

En los estados de Texas y Norte de México, donde se cultiva en áreas de temporal, los principales propósitos de producción son la cría y engorda de ganado bovino en pastoreo, así como la cría de especies de fauna silvestre con potencial cinegético y el pastoreo de ganado bovino lechero, además de la producción de heno para los periodos críticos de escasez de forraje y la producción de semilla, principalmente bajo condiciones de riego (Hanselka y Johnson, 1991; Saldivar 1991). Esta especie posee un alto potencial productivo ya que puede producir entre 2 y 10 veces más que los agostaderos nativos y su forraje es de buena calidad nutritiva, bien aceptado por el ganado, y con resistencia al pastoreo (Hussey , citado por Ibarra *et al.*, 1991). En un estudio realizado para analizar su composición química, se observó que en estado joven e inmaduro contuvo mas proteína (hasta 13.35 %) que en estado maduro, en el cual presentó niveles mas altos de fibra (López, *et al.*, 1990)

#### 2.1.2. Comportamiento de la especie en condiciones salinas

El zacate buffel ha sido considerado sensible a la salinidad (Williamson y Piukerton, 1985; Ryan, *et al.* 1975b; Graham y Humphreys, 1970; Saldivar, 1991; Ibarra, *et al.*, 1991), siendo la etapa de germinación una de las mas afectadas. En un estudio realizado por Gutiérrez *et al.* (1990) los genotipos probados fueron fuertemente afectados en sus porcentajes de germinación en concentraciones superiores a 6000 ppm. Por otra parte, Graham y Humphreys

(1970) observaron una reducción del rendimiento potencial de las variedades American, Tarewinnabar, Gayndah, Biloela y Molopo en una proporción inversa al incremento de sal, con tratamientos de 28, 44, 66, 110 y 125 meq.l<sup>-1</sup> de NaCl, con lo que concluyeron que el zacate buffel es poco tolerante a este factor, considerando que los cultivos sensibles son aquellos que prosperan en niveles salinos de conductividad eléctrica entre 4 y 8 mmhos cm<sup>-1</sup>, equivalentes a 40-80 meq.l<sup>-1</sup> de NaCl (Richard, citado por Graham y Humpreys, 1970).

En los lugares de Texas y México donde se cultiva el buffel, el contenido de sales solubles totales fluctúa entre 200 y 1400 ppm (Ibarra *et al.*, 1991); al respecto, Saldivar (1991) señaló que una de las limitaciones mas importantes de la variedad Común (Texas 4464) de zacate buffel es su baja tolerancia a condiciones salinas y que ésta se agudiza en suelos arcillosos con mal drenaje, lo cual fue confirmado en otras variedades de la misma especie por Hanselka y Johnson (1991) e Ibarra *et al.* (1991), quienes consideraron que condiciones de elevada salinidad, así como arcilla compacta y drenaje lento inhiben severamente su establecimiento.

### 2.1.3. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de zacate buffel se ha llevado a cabo por algunos investigadores, entre ellos Rogers *et al.* (1993) quienes establecieron y caracterizaron cultivos de células en suspensión obtenidos a partir de dos tipos de callo inducidos de ápices de tallo de la accesión PI-409704. Dichos cultivos tuvieron un crecimiento de tipo sigmoidal con diferencias marcadas en tasa de crecimiento y apariencia (uno friable y otro mucilaginoso) y mostraron potencial embriogénico cuando se cultivaron en medio con carbón activado. Por otra parte, Manzano (1993) obtuvo regeneración de plantas del híbrido Higgins a partir de callo embriogénico



subcultivado inicialmente en medio básico MS adicionado con 0.02 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1.0 mg l<sup>-1</sup> de cinetina y 0.2 % de caseína hidrolizada y posteriormente aplicando distintas concentraciones de 2,4-D y 2,4,5-T.

## 2.2. La salinidad y sus efectos en las plantas, tejidos y células vegetales

### 2.2.1. Efectos adversos

Las sales contenidas en un medio de cultivo de plantas, tejidos o células se convierten en un factor limitante del crecimiento y el rendimiento cuando su concentración en dicho medio alcanza un nivel que provoca desequilibrios en las relaciones hídricas entre el medio y la planta o sus tejidos y células, así como en el metabolismo de las mismas, los cuales pueden ser alterados principalmente en aquellas plantas con mayor grado de sensibilidad a los efectos salinos (Binzel, 1994; Müller y Santarius, 1978). Los principales efectos adversos son provocados por la absorción de iones en exceso y el déficit hídrico (Greenway y Munns, 1980; Croughan et al., 1981; Shannon, 1985; Blum, 1988). En cuanto a la absorción de iones en exceso, éstos pueden afectar el metabolismo, al provocar una disminución en la fijación de CO<sub>2</sub> debido a una alta resistencia en el mesófilo o bien ocasionar desequilibrios en la nutrición de las plantas (Greenway y Munns, 1980). En este aspecto, también los efectos iónicos pueden atribuirse a alteraciones en la estructura de la pared celular (Müller y Santarius, 1978; Vazquez-Duhalt et al., 1991; Binzel, 1994) o efectos en la actividad de enzimas responsables del metabolismo celular (Lerner, 1985; Blum, 1988; Flowers et al., 1977). En este último caso se observó inhibición en 60 a 70 % de las enzimas glucosa-6-fosfato y malato deshidrogenasas de la especie halófila *Suaeda maritima* en presencia de 333 mM de NaCl y efectos similares se

presentaron *in vitro* en la actividad de las enzimas correspondientes de *Pisum sativum* considerada glicófita (Flowers *et al.*, 1977).

Respecto al déficit hídrico, este consiste en una condición en la que se presenta una sequía fisiológica intracelular, ocasionada por un gradiente de potenciales entre los medios de cultivo y radicular o inter e intracelular (Bernstein, 1961; Bernstein, 1971; Black, 1975). Para diferenciar los efectos iónicos e hídricos, se puede considerar el ejemplo en el que Greenway y Munns (1980) compararon el crecimiento de frijol y maíz bajo fuerte presión osmótica externa, el cual fue menos reducido cuando ésta fue provocada con polietilenglicol (PEG) que cuando fue inducida con soluciones de sal isosmóticas, ya que en 1.2 bars, el frijol creció 25 y 41 % en soluciones de NaCl y PEG, respectivamente, en relación al testigo, mientras que el maíz en 4.0 bars creció 63 y 74 %, respectivamente, en los mismos tipos de soluciones, lo cual evidenció los efectos por exceso de iones.

Por otra parte, en el crecimiento de cultivos de células en suspensión de distintas especies vegetales como *Nicotiana sp.* (Wataid, *et al.*, 1985), *Chenopodium quinoa* (Alvarado, 1990) y *Amaranthus hypochondriacus* (Trejo, 1992) sometidos a tratamientos relativamente elevados de sal, se ha observado, entre otras respuestas, un alargamiento de la fase de retraso y del ciclo de crecimiento.

### 2.2.2. Tipos de sales

En los ambientes salinos naturales frecuentemente predomina el NaCl, aunque pueden contener distintos tipos de sales entre las que se encuentran sulfato de sodio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio y carbonato de sodio (Flowers *et al.*, 1977). Respecto a lo anterior, en un ecosistema salino del estado de Nuevo León, se encontró que las

sales predominantes fueron los cloruros (de sodio, calcio, y magnesio), siendo relativamente escasos los sulfatos y bicarbonatos (Villarreal, 1976).

En distintos estudios de tolerancia a salinidad a nivel de planta, cultivo de tejidos y células, se ha utilizado como agente selectivo el NaCl. Algunos de estos incluyen los siguientes cultivos: quinoa (Alvarado *et al.*, 1991); arroz (Reddy y Vaidyanath, 1986; Binh *et al.*, 1992); alfalfa (Croughan *et al.*, 1978); zacate buffel (Gutierrez *et al.*, 1991; Graham y Humphreys, 1970); otros zacates (Glenn, 1987); *Coleus blumei* (Ibrahim *et al.*, 1992); trigo (Karadimova y Djambova, 1993); tabaco (Lerner, 1985); cebada (Müller y Santarius, 1978); sorgo (Yang *et al.*, 1990); naranjo (Ben-Hayyim, 1985), entre otros. Mozafar *et al.* (1970) encontraron que el crecimiento de *Atriplex halimus* fue mejor en medio salino conteniendo partes iguales de NaCl y KCl que en NaCl o KCl solas, por lo que estas últimas sales fueron consideradas buenos medios selectivos para pruebas de tolerancia.

### 2.3. Respuesta adaptativa de las plantas, tejidos y células a la salinidad

#### 2.3.1. Tipos de plantas por su respuesta a salinidad

Respecto a la tolerancia a salinidad se identifican dos tipos de plantas, uno que está constituido por las halófitas, las cuales son capaces de sobrevivir, completar su ciclo de vida e incluso expresar su máximo potencial de crecimiento y producción bajo condiciones de elevada salinidad; y las glicófitas, cuya sobrevivencia es afectada directamente bajo tales condiciones y su crecimiento y rendimiento pueden verse reducidos severamente en condiciones de relativamente baja salinidad (Maas y Nieman, 1978; Gorham *et al.*, 1985).

Los problemas que generalmente enfrentan las plantas expuestas a condiciones salinas son: el mantenimiento favorable intracelular de relaciones hídricas; la tolerancia específica a toxicidad de iones y el abastecimiento de iones de nutrientes esenciales, no obstante la predominancia de otros no esenciales (Croughan *et al.*, 1981). Desde este punto de vista, las respuestas de las plantas a las condiciones de agobio pueden ser múltiples, pero en términos generales se enfocan a amortiguar dichos problemas (Binzel, 1994)

Las halófitas se caracterizan principalmente por acumular altas concentraciones de iones en las células, lo cual favorece su ajuste osmótico en respuesta al medio salino en que se desarrollan, en cambio las glicófitas responden a salinidad principalmente por exclusión de iones (Flowers *et al.*, 1977; Greenway y Munns, 1980). Sobre el particular, en un estudio con distintos géneros de pastos, 14 sobrevivieron a una concentración de 540 mM de NaCl, mientras que 7 lo hicieron a 180 mM. Los primeros fueron considerados halófitos y los segundos glicófitos tolerantes a sal, aunque todos tendieron a tener altos contenidos de Na y bajos contenidos de K y agua en los tratamientos salinos, en comparación al control, de lo cual se concluyó que en estas plantas se presentó un proceso de coordinación entre la absorción de Na y la pérdida de agua, para mantener un gradiente de potencial osmótico entre los tejidos del tallo y la solución externa (Glenn, 1987)

Algunas características que se pueden presentar en las plantas para permitirles resistir a la salinidad incluyen la presencia de pocos estomas por unidad de superficie foliar, succulencia incrementada, engrosamiento de las hojas y superficie cubierta de ceras, reducida diferenciación de tejido vascular, temprana lignificación de raíces succulencia foliar, mayor proporción de crecimiento radicular en relación con el aéreo (Maas y Nieman, 1978).

### 2.3.2. Factores planta y ambiente en relación con la tolerancia a sal

Varios investigadores han coincidido en que existe variación en la tolerancia de las plantas a la salinidad en diferentes etapas de su desarrollo, presentándose en la mayor parte de los casos más tolerancia en las etapas más avanzadas de éstos (Kadda y Ghowail, 1964; Francois y Bernstein, 1964; Bernstein *et al.*, 1966; Kadda *et al.*, 1973). En el caso particular de la etapa de germinación, en algunos cultivos como tomate, trigo, arroz y cebada, se ha observado que ésta es menor después de la germinación (Nieman y Shanon, 1976; Torres *et al.*, 1973) y en *C. ciliaris* los porcentajes promedio de germinación de cinco genotipos probados fueron de 63.5, 65.7, 49.3 y 39.6 % para 0, 3000, 6000 y 9000 ppm, lo cual evidenció una reducción relativa no muy alta, si se considera el testigo (Gutiérrez *et al.*, 1991).

En relación con los factores del ambiente es importante considerar que los efectos salinos no son provocados por una sal específica, sino por la totalidad de sales solubles en el medio (Nieman y Shanon, 1976); además, la salinidad interactúa con distintos factores, por ejemplo, a medida que la temperatura se incrementa en el medio generalmente el efecto de las sales sobre las plantas es mayor (Francois y Goodin, 1972; Hoffman *et al.*, 1977) y al aumentar la humedad ambiental el efecto adverso de la sal sobre las plantas disminuye (Albregts y Howard, 1973; Nieman y Shanon, 1976; Hoffman *et al.*, 1977).

### 2.3.3. Mecanismos morfofisiológicos de tolerancia

Respecto a los mecanismos morfofisiológicos que se dan a nivel celular para tolerar la salinidad, Croughan *et al.* (1981) mencionaron que éstos pueden ser de varios tipos, como la

evasión a las sales, exclusión de las mismas y la verdadera tolerancia fisiológica que puede darse en el protoplasma por compartimentación de iones y el ajuste osmótico.

En cuanto a la evasión de absorción de iones, ésta repercutiría en un déficit hídrico en la planta, el cual podría ser eludido a través del mantenimiento de la turgencia celular mediante la síntesis de solutos orgánicos, incremento en la extensibilidad y elongación de las membranas, y por un incremento en la permeabilidad de la raíz al agua, y mejoramiento en la eficiencia del uso interno de ésta (Greenway y Munns, 1980).

En relación con la exclusión de las sales, se considera mas un mecanismo de tolerancia de glicófitas resistentes, en las cuales se mantiene un control de absorción y transporte de sales al follaje, en donde son excretadas por glándulas y vesículas, pudiéndose dar también reexportación de iones al floema e incremento en el volumen del follaje (Flower *et al.*, 1977; Gorham *et al.*, 1985; Greenway y Munns, 1980).

Respecto a la compartimentación, que se considera un mecanismo de tolerancia de halófitas; cuando se presenta alta concentración interna, la turgencia celular puede mantenerse con una alta concentración intracelular de iones, los cuales pueden estar distribuidos en vacuolas, además de solutos orgánicos como la glicinebetaina, prolina y sacarosa que se pueden distribuir en el citoplasma y contribuir al balance osmótico interno, desempeñando también un papel protector sobre las enzimas responsables del metabolismo a los posibles daños por exceso de iones (Lerner, 1985; Hasegawa *et al.*, 1986).

## 2.4. Criterios para la evaluación de la tolerancia de especies vegetales a la salinidad

### 2.4.1. Evaluación *in vivo*

En las plantas cultivadas, uno de los criterios más generalizados para evaluar la tolerancia a la salinidad, se basa en la reducción de su rendimiento relativo en suelos salinos en comparación con el correspondiente en suelos no salinos, considerando que los suelos salinos son aquellos cuya conductividad eléctrica del extracto de saturación es superior a  $4 \text{ mmhos cm}^{-1}$  (Personal del Laboratorio de Salinidad de los E.U.A., 1973). Otros criterios se basan en la respuesta a diferentes concentraciones salinas, a través de la regresión del rendimiento con datos tomados *in situ* (Shannon, 1985).

La mayoría de los métodos utilizados para evaluar la tolerancia a salinidad *in vivo* consideran la salinización artificial de sustratos, con uno o varios tipos de sales en estructuras de distinto tipo, que pueden incluir desde cajas germinadoras con arena, hasta parcelas de tamaño variable en las que se propagan las plantas sujetas a tratamientos (Nieman y Shannon, 1976; O'leary, 1984; Shannon, 1984).

McKimmie y Dobrenz (1987) probaron un método para evaluar un gran número de semillas y plántulas de alfalfa por su tolerancia a salinidad, el cual consistió en un dispositivo rectangular de fibra de vidrio con compartimientos para sembrar las semillas, montado sobre un depósito de plástico para la solución de nutrientes y sal que fueron bombeados por 10 y 6 minutos al inicio y cada día respectivamente al dispositivo y constantemente drenados al depósito, en el que fue posible medir el potencial osmótico de la solución irrigadora. Por otra parte, Guzmán y Puente (1993) diseñaron un método para la germinación de semillas pequeñas, mediante el cual es posible hacer pasar una solución por capilaridad a través de papel

absorbente constantemente, por un dispositivo rectangular en el que se colocan las semillas para germinación, el cual se adhiere a un depósito adyacente que contiene la solución que es constantemente drenada y colectada para su análisis. En germinación de semillas de zacate buffel, dicho método fue probado con éxito, considerando que favorece la lixiviación de inhibidores de la germinación.

#### 2.4.2. Evaluación *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales ofrece una buena alternativa para este tipo de estudios, ya que mediante esta técnica los tejidos pueden ser tratados uniformemente en un ambiente controlado y los experimentos pueden realizarse independientemente de las variaciones del clima durante el año, además de que pueden ser evaluadas una gran cantidad de células simultáneamente y no existe problema con morfología y etapas de desarrollo de las plantas (Croughan *et al.*, 1981; Tal, 1984; Shannon, 1984; Stavarek y Rains, 1984).

Rains (1982) señaló que la tolerancia a la salinidad de las plantas parece ser un carácter genéticamente controlado, ya que las plantas varían ampliamente en su respuesta a dicho factor en elevadas concentraciones de sal y recomienda la técnica del cultivo de células para propiciar variabilidad en éstas y obtener líneas celulares tolerantes a salinidad, proponiendo como estrategia selectiva general, someter cultivos de células de la especie deseada a concentraciones letales de sal en el medio de cultivo, de tal forma que las que logren sobrevivir y reproducirse en éstas condiciones, podrán ser consideradas para selección por tolerancia a dicho factor, después de confirmar su estabilidad de preferencia al llevarlas a regeneración de plantas y observar que el carácter fue transmitido genéticamente.



Respecto a la estabilidad de la tolerancia a sal en cultivos de células, ésta puede determinarse al transferir las células resistentes a medio sin sal, de preferencia por varias generaciones para después regresarlas a medio salino y observar el grado de retención de algún carácter asociado con tolerancia. En estudios con regenerantes pueden ser consideradas algunas mutaciones que se presenten a través de selecciones de corto plazo, las cuales podrían estar involucradas con exclusión de Na o Cl del follaje, carácter que puede utilizarse como un criterio efectivo de selección para evaluar la ganancia para tolerancia a la sal en distintas especies vegetales (Tal, 1994; Tal, 1990)

## 2.5. Selección de líneas celulares por tolerancia a salinidad

### 2.5.1. Caracterización de líneas celulares

*Siguiendo diferentes criterios, se han realizado selecciones de líneas celulares tolerantes a salinidad para distintas especies vegetales cultivadas, entre estas: arroz (Reddy y Vaidyanath, 1986; Ponsamuel y Weiler, 1994); naranja (Ben-Hayyim, 1985); trigo (Karadimova y Djambova, 1993); Alfalfa y arroz (Croughan et al., 1978; Croughan et al., 1981) y *Coleus blumei* (Ibrahim et al., 1992).*

En líneas celulares de alfalfa y arroz tolerantes a sal se realizaron observaciones de lo que se consideraron hábitos halofíticos, tales como mantenimiento de altos niveles de K en presencia de altos niveles de Na, altos niveles de NO<sub>3</sub> en bajos niveles de sal, pobre crecimiento en ausencia de sal y mejor crecimiento en presencia de ésta, además de que en líneas celulares seleccionadas de alfalfa se observó una mayor eficiencia en el consumo de energía a medida que se incrementó la sal en el medio de cultivo (Croughan et al., 1978; Croughan et al., 1981).

En este aspecto, Hasegawa *et al.* (1986) consideraron que bajo condiciones salinas, la presencia de células de menor tamaño puede representar una contribución significativa para la tolerancia a salinidad, ya que las células pequeñas podrían tener una menor demanda de energía para el metabolismo catabólico, necesario para el crecimiento de las células grandes no adaptadas a la salinidad.

Respecto al contenido de clorofila Varshney y Bajjal (1982) encontraron para varios zacates que la cantidad de clorofila a y b y el total de clorofila por gramo de tejido de hoja, se incrementó con incrementos de salinidad (NaCl) y sodicidad (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en varias etapas de desarrollo de planta y la relación de clorofila a/b decreció con tales incrementos de sal.

#### 2.5.2. Metabolismo celular

En células de tabaco seleccionadas bajo estrés salino, la acumulación de solutos orgánicos como glicinebetaine y prolina pueden proteger la actividad enzimática, ya que están altamente correlacionados con el ajuste osmótico (Binzel, 1994; Lerner, 1985), mientras que la acumulación de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> necesarios para este proceso es coordinada con compartimentación vacuolar en las células en condiciones de alta concentración de Na externa (Hasegawa *et al.*, 1990). Lo anterior coincide con resultados obtenidos en suspensiones celulares de quinua tratadas con 0, 68, 136 y 204 mM de NaCl, en las que se observó un incremento en la acumulación de Na, variaciones en el contenido de K y disminución en los potenciales hídrico y osmótico, a medida que aumentó el nivel de sal, con esto se llegó a la conclusión de que los cambios en estos parámetros, están asociados con la capacidad de osmorregulación de quinua en medio salino, hasta un nivel tolerable por la especie, sobre todos durante las primeras fases de crecimiento (Alvarado *et al.*, 1991)

### 2.5.2. Selectividad de membranas y paredes celulares

Lerner (1985) probó la selectividad de la membranas vacuolares de células de tabaco, encontrando que tuvieron selectividad para Na y K , además de que el contenido intracelular de prolina de células adaptadas a sal se incrementó exponencialmente con incrementos de NaCl, pero fue reversible cuando se disminuyó la concentración de ésta sal

Respecto al comportamiento de la membrana celular, en cloroplastos de plántulas de cebada, se sugirió que la disminución de galactolípidos en biomembranas fue un factor que causó resistencia de las plántulas a salinidad extrema, equivalente a 400 mM de NaCl (Müller y Santarius, 1978). En tabaco se encontró que las paredes celulares adaptadas a 428 mM de NaCl contenían aproximadamente la mitad de polisacáridos por gramo de peso seco, comparadas con células no adaptadas: la proporción de celulosa fue mas baja, mientras que los contenidos de hemicelulosa y proteínas fueron mayores (Iraki et al., citados por Binzel, 1994). En células de garbanzo, se dedujo que un incremento en la relación hexosa/fosfato en los lípidos de la membrana, se dio en respuesta a procesos de haloadaptación. Lo anterior, después de observar que el rendimiento de biomasa celular, así como el contenido de lípidos totales decreció con incrementos en la salinidad, y que membranas artificiales, preparadas con lípidos de células crecidas bajo estrés salino, fueron menos permeables a iones de Cl y Na comparadas con las preparadas con lípidos de células crecidas en medio sin sal. La permeabilidad de membranas preparadas con glicolípidos fue menor que la de aquellas preparadas con fosfolípidos y lípidos totales (Vázquez-Duhalt et al., 1991). Resultados similares fueron obtenidos para callos de limonero tolerantes a sal, los cuales presentaron igual tipo de estructura celular que callos testigo, con citoplasmas densos, abundantes mitocondrias, lípidos y vacuolas; sin embargo, en cuanto a la ultraestructura de los callos tolerantes, presentaron algunas diferencias,

observándose mayor número y área de cuerpos lípidos, mayor número de amiloplastos, retículo endoplásmico más abundante con membranas formando vesículas y paredes celulares más densas en comparación al callo testigo no tolerante (Piqueras et al., 1994).

## 2.6. Variación somaclonal inducida a través del cultivo *in vitro*

La variación somaclonal, propiciada a través del cultivo de tejidos y células, en términos generales representa una alternativa importante en el mejoramiento genético de las plantas cultivadas. De acuerdo con Larkin y Scowcroft (1981) ha sido aplicada con éxito en distintos cultivos, entre estos: caña de azúcar, papa, tabaco, arroz, avena, maíz, cebada, col, ajo, lechuga y algunas ornamentales. Roylance *et al.* (1994) observaron que la biomasa total y rendimiento de semillas de regenerantes de la especie *Festuca arundinacea*, fueron más consistentes para detectar variación somaclonal cuando utilizaron el cultivo de tejidos para introducir endófitos en la especie y evaluar la variación ocasionada por éstos y aquella atribuida a la variación somaclonal. En arroz se ha reportado variación somaclonal entre plantas regeneradas para distintas características, entre éstas, la aparición de plantas albinas, plantas torcidas o poliploidia (Oono, 1983).

### 2.6.1. Origen de la variación somaclonal

Respecto de los mecanismos por los que se presenta la variación somaclonal, de acuerdo con Tabares *et al.* (1991) se han propuesto dos hipótesis: la primera establece que la variación se da por diferencias genéticas preexistentes en las células del explante, mientras que la segunda estipula que dichas diferencias se deben a efectos ocasionados por los componentes

del medio de cultivo. Este último postulado es apoyado por Larkin y Scowcroft (1981), quienes consideran que entre los mecanismos que pueden propiciar variabilidad genética en las poblaciones de células cultivadas *in vitro*, se encuentran los cambios en ploidía y el cariotipo, así como cambios por rearrreglo de cromosomas, enmascaramiento o magnificación de ciertos genes y eliminación de algunos virus que en condiciones normales no se presentan. También, pueden presentarse cambios por modificaciones en los modelos de metilación del DNA (Kaeppeler y Phillips, 1993); o por mutaciones de tipo citoplásmico, genético o bien por efectos fisiológicos (Oono, 1983). De acuerdo con Arce-Montoya (1994), la principal fuente de variación genética en los sistemas de cultivo *in vitro* es la mutación, que produce cambios heredables a nivel del DNA. Las características que no son producidas por alguna modificación del DNA y por lo tanto no son heredables, se consideran caracteres epigenéticos. Al respecto, cuando una característica variante en plantas regenerantes es eliminada en la generación R1 o R2 puede considerarse como variante epigenética. Si la característica es estable por varias generaciones, se habla de una variante genética. Las causas que pueden influir para que se presente la variación somaclonal incluyen el acortamiento en el ciclo celular de cultivo *in vitro*, ocasionado por un incremento en la velocidad de división celular, que propicia una mayor probabilidad de ocurrencia de mutaciones; sin embargo también puede influir la presencia de auxinas y citocininas, a los cuales se les consideran efectos mutagénicos (Arce-Montoya, 1994).

Respecto a lo anterior, en cultivos de callo de fresa no fueron observadas variantes fenotípicas en concentraciones de reguladores de crecimiento en un rango de 1-10  $\mu\text{M}$  de BA y 2,4-D, combinados pero en una alta concentración de esta combinación (20  $\mu\text{M}$ ), se presentó una alta frecuencia de variantes, además de observarse un efecto derivado de la edad del callo, ya que las plantas regeneradas de callo de 8 semanas no presentaron variantes morfológicas, sin

embargo una proporción significativa de variantes de hojas deformes (6-13 %), hojas cloróticas (21-29 %) fueron obtenidas de callo de 16 y 24 semanas (Nehra *et al.*, 1992).

## 2.7. Mejoramiento para la tolerancia a la salinidad

### 2.7.1. Mejoramiento tradicional

Existen varios cultivos que han sido mejorados para su tolerancia a la salinidad, entre éstos el arroz, el trigo, algunos forrajes y frutales.

En forma tradicional, el método de selección por pedigree ha sido ampliamente utilizado en este aspecto, eligiendo los progenitores inicialmente, de manera que uno posea el carácter de tolerancia a sal y el otro características agronómicas deseables; los cuales se combinan en la descendencia y posteriormente se aprovecha la segregación para realizar la selección (Shannon, 1985). En el mejoramiento de plantas por tolerancia a salinidad, es importante tener en cuenta el germoplasma exótico, un ejemplo es la cruce realizada en tomate entre las especies *L. esculentum* y *L. cheesmanii*, ésta última de tipo silvestre colectada en Islas Galápagos y tolerante a salinidad; en la F<sub>2</sub> se obtuvieron frutos de tamaño mediano aceptables comercialmente y plantas tolerantes a la salinidad (Epstein, 1976).

### 2.7.2. Aplicación del cultivo de tejidos y células

Cuando se utiliza la vía del cultivo de células en el mejoramiento de plantas, se tiene la ventaja de poder llevar a cabo la selección por algún carácter deseado en grandes poblaciones de células, además de poder aplicar tratamientos de sal uniformemente y con precisión en

espacios reducidos y condiciones ambientales controladas (Spiegel-Roy y Ben-Hayyim, 1985; Croughan *et al.*, 1981; National Research Council, 1984)

Los métodos de evaluación de variantes, pueden ser específicos para las características que se esperan aunque se puede utilizar algún método general para detectar cambios a nivel bioquímico, citogenético o molecular.

Un método para diferenciar las variantes obtenidas a través del cultivo *in vitro* es el de marcadores genéticos, aunque este resulta difícil cuando se trata de características poligénicas como pueden ser la productividad o la tolerancia a salinidad (Chandler y Thorpe; y Evans, citados por Arce-Montoya, 1994)

En *B. napus* la variación gametoclinal y cultivo inducido *in vitro* no fueron suficientes para propósitos de selección, ya que no se obtuvieron plantas tolerantes a sal sin tratamientos mutagénicos (Rahman *et al.*, 1995). En papa se obtuvieron variantes somaclonales a partir de regeneración del explante directamente y también se generaron variantes con resistencia a algunas enfermedades a través del cultivo de cloroplastos. Entre los principales patógenos a los cuales se obtuvo resistencia están: *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Fusarium* y algunos nemátodos; se utilizó la técnica de colocar el callo de papa en medio con un elevado nivel de toxinas de cada patógeno y observar el que fuera resistente, para seleccionarlo y posteriormente regenerar plantas de papa cuya resistencia fue probada (Karp, 1990)

Por otra parte, también es importante considerar que la mayor parte de la variación inducida a través del cultivo de tejidos y células es de tipo epigenético y por tanto de aprovechamiento limitado en programas de mejoramiento genético (Pierik, 1990; Vasil y Vasil, 1994). Sin embargo, en comparación a otras técnicas como la mutación espontánea, se ha estimado que la frecuencia con que esta se presenta es de aproximadamente una por millón de plantas, la cual es mucho menor que la aparición de variantes somaclonales en plantas

regeneradas, que es de alrededor de un 15 % (Tabares *et al.*, 1991). Por lo demás, las metodologías tradicionales de mejoramiento genético se complementan con los métodos biotecnológicos que incluyen la selección de variantes somaclonales *in vitro* para mejorar las plantas de cultivo (Pohlman, 1987).



### 3. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Fisiología y Biotecnología Vegetal, así como en el invernadero y vivero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL), ubicada en el municipio de Marín, N. L. en las coordenadas geográficas correspondientes a los 25° 53' Latitud Norte y 100° 03' Longitud Oeste a 538 MSNM y condiciones de clima semiseco BS<sub>1</sub>(h')hw''(e), con precipitación promedio anual de 634.1 mm y temperatura media anual de 22.1° C (García, 1973).

La investigación se llevó a cabo en cinco etapas: 1). Selección de germoplasma *in vivo* por tolerancia a salinidad; 2). Inducción de callo a partir de carióspside de genotipos seleccionados; 3). Establecimiento de suspensiones celulares a partir de subcultivos de callo friable; 4). Caracterización y selección de suspensiones celulares bajo estrés salino; 5). Evaluación de la estabilidad de agregados celulares en distintas concentraciones salinas. Los procedimientos para cada etapa se presentan a continuación.

#### 3.1. Selección de germoplasma *in vivo* por tolerancia a salinidad

El germoplasma de zacate buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) consistió en semilla de 99 accesiones existente en la colección mundial de la Unidad de Recursos Genéticos de la FAUANL.

Se procedió a evaluar el porcentaje de germinación de las 99 accesiones en medio libre de sal y medio salinizado. Lo anterior se llevó a cabo a través de un ensayo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la FAUANL, el cual consistió en utilizar el método Uni-Marín-FAUANL (Guzmán y Puente, 1993). Mediante éste método se colocaron cariósides en condiciones de germinación en dispositivos tipo “charola de rodillo”, de plástico de forma rectangular, con 35 cm de largo por 25 cm de ancho y 1 a 5 cm de profundidad de un extremo a otro sobre su longitud, en las cuales se colocó papel secante sobre su superficie. Sobre éste, se “sembraron” en hileras de 20 cariósides por accesión, 10 accesiones por cada charola drenable en posición inclinada, con abastecimiento permanente de agua mediante un recipiente con capacidad para 9 litros; en éste se introdujo un extremo del papel secante para facilitar el flujo del agua por capilaridad hacia la superficie germinadora (Figura 1). Dichos dispositivos fueron tratados con solución salina, considerando sus respectivos testigos libres de sal. Los niveles de salinidad utilizados en el agua de los recipientes fueron 0 y 100 mM (0 y 5.85 g.l<sup>-1</sup> de NaCl, respectivamente).

Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación y la altura de plántula germinada. Con la primera de éstas se calculó el porcentaje de germinación relativa de la siguiente forma:

$$\% \text{ de germinación relativa} = \frac{\text{No. de cariósides germinados en medio salino}}{\text{No. de cariósides germinados en medio no salino}} \times 100$$

Por otra parte, se llevó a cabo un experimento para evaluar la tolerancia a NaCl directamente en planta de las accesiones PI-240170 y “Común” de *C. ciliaris* L. La metodología empleada en éste caso consistió en propagar plantas de zacate buffel de las accesiones mencionadas, en charolas propagadoras de poliuretano en invernadero. Las plantas posteriormente fueron transferidas a bolsas de polietileno negro de 40 cm de alto por 40 cm de

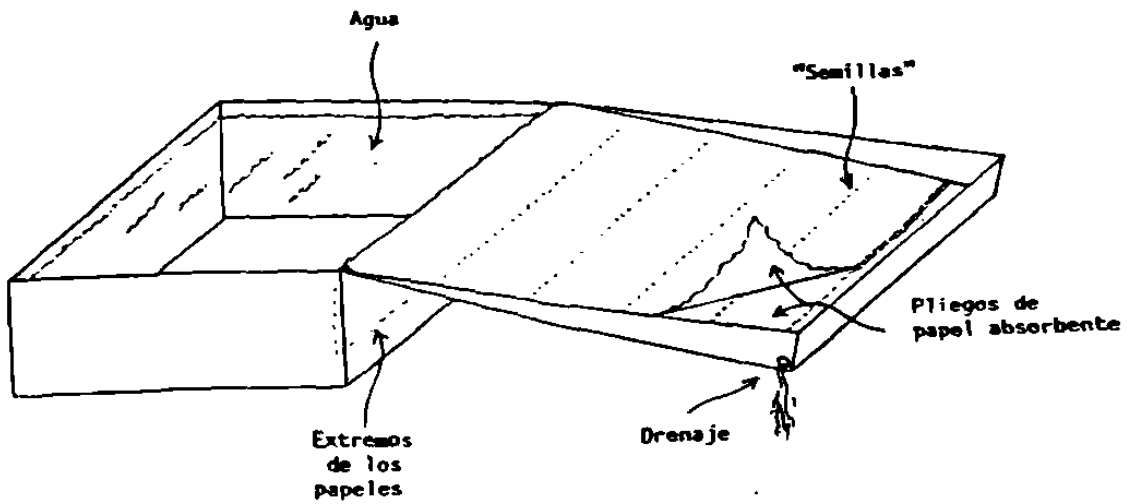


Figura 1. Diagrama del dispositivo utilizado para germinación de cariósides de zacate buffel. Método UNI-MARIN FAUANL (Guzmán y Puente, 1993)

diámetro, el sustrato fue a base de  $\frac{3}{4}$  de suelo de la localidad y  $\frac{1}{4}$  de materia orgánica que fueron manejados en vivero. Una vez que las plantas superaron la etapa de preacondicionamiento a las condiciones de vivero y presentaron un aspecto normal de desarrollo, se aplicaron los tratamientos, que consistieron en cuatro riegos consecutivos con agua natural como testigo y dos soluciones salinas, una con 120 mM y la otra con 240 mM de NaCl. Se aplicó un exceso de agua para mantener las sales en solución y se realizó el drenado de esta inmediatamente después del riego por la parte inferior y laterales de las bolsas, en las que se hicieron orificios de salida con la finalidad de evitar efectos secundarios por saturación del suelo.

El diseño de tratamientos para este experimento se conformó como un factorial con la combinación de los dos genotipos y los tres niveles de NaCl, con un total de seis tratamientos. El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con cuatro repeticiones y la unidad experimental quedó constituida por una hilera de tres plantas en sus respectivas macetas.

Se midieron la variables correspondientes a número de tallos por planta, altura de planta en cm, peso fresco y peso seco de la parte aérea de la planta en g. Con estas variables se llevaron a cabo los análisis de varianza correspondientes de acuerdo con el modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + (S_j) + (GS)_{ij} + \epsilon(ijk)$$

Para:  $G_i$  = Genotipos: 1,2

$S_j$  = Niveles de sal (NaCl): 1, 2, 3

Donde:  $\mu$  = Media general

$G_i$  = Efecto del i-ésimo genotipo

$S_j$  = Efecto del j-ésimo nivel de sal (NaCl)

(GS)<sub>ij</sub> = Efecto de la interacción entre el *i*-ésimo genotipo y el *j*-ésimo nivel de sal (NaCl)

$\epsilon$ (*ijk*) = Error experimental de la *ijk*-ésima observación

Las hipótesis estadísticas probadas fueron:

$$\begin{array}{lll} H_{01}: \sigma_G^2 = 0 & \text{Vs.} & H_{A1}: \sigma_G^2 \neq 0 \\ H_{02}: \sigma_S^2 = 0 & \text{Vs.} & H_{A2}: \sigma_S^2 \neq 0 \\ H_{03}: \sigma_{GS}^2 = 0 & \text{Vs.} & H_{A3}: \sigma_{GS}^2 \neq 0 \end{array}$$

### 3.2. Inducción de callo a partir de carióspside de genotipos seleccionados.

Se estableció un bioensayo con los genotipos PI-365661, PI-240170 y “Común” o Texas 4464 (G1, G2 y G3 respectivamente), seleccionados a partir de las pruebas de germinación bajo estrés salino. Se utilizaron dos medios de cultivo y dos niveles de ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético (2, 4- D), con el objeto de seleccionar el medio mas adecuado para la inducción y mantenimiento del cultivo de callo.

Los medios de cultivo fueron formulados a partir del medio básico de Murashige-Skoog (1962), adicionado con 1 y 3 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y del medio básico B5 de Gamborg, *et al* (1968), adicionado también con 1 y 3 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D (Cuadro 1). En todos los casos se adicionó la solución de vitaminas para el medio MS, constituida por: glicina (2.0 mg.l<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0.5 mg.l<sup>-1</sup>), piridoxina (0.5 mg.l<sup>-1</sup>) y tiamina (0.1 mg.l<sup>-1</sup>), 0.3 mg.l<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), 100 mg.l<sup>-1</sup> de mioinositol, 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y se utilizó como agente gelificante agar-gel (5 g.l<sup>-1</sup>).

La siembra se realizó sometiendo el carióspside a desinfección en alcohol etílico al 70 % por 30 segundos e hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.6 % por 15 minutos, lavando posteriormente en tres ocasiones con agua bidestilada esterilizada. Cinco carióspsides se colocaron en cada frasco de vidrio con 25 ml de medio de cultivo. Los frasco con capacidad de 75 ml fueron previamente esterilizados en autoclave a temperatura de 120<sup>0</sup> C y presión de 15 lbpulg<sup>-2</sup> por 15 minutos (Cárdenas, 1994). Los cultivos se incubaron en condiciones controladas de temperatura (25 ± 2<sup>0</sup> C) y luz (16/8 hrs).

Cuadro 1. Sales básicas componentes de los medios de cultivo MS y B5 (Mroginski, L. A. y W. M. Roca, 1991)

<i>Nutrientes</i>	<i>MS</i> <i>mg l<sup>-1</sup></i>	<i>B5</i> <i>mg l<sup>-1</sup></i>
NH <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	1650	--
KNO <sub>3</sub>	1900	2500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	--
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	--	150
KI	0.83	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	--
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	--	10
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	2.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8

El diseño de tratamientos se conformó por un factorial de 12 tratamientos y el diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con cuatro repeticiones, en el que la unidad experimental quedo representada por cinco cariósides por frasco con 25 ml de medio de cultivo, bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + M_j + D_k + (GM)_{ij} + (GD)_{ik} + (MD)_{jk} + (GMD)_{ijk} + \epsilon_{(ijkl)}$$

para: G = Genotipos: 1, 2, 3

M = Medios básicos: 1, 2

D = Concentraciones de 2,4-D: 1, 3  $\text{mg l}^{-1}$

Donde:

$\mu$  = Media general

$G_i$  = Efecto del i-ésimo genotipo

$M_j$  = Efecto del j-ésimo medio de cultivo

$D_k$  = Efecto del k-ésimo nivel de 2,4-D

$(GM)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre el i-ésimo genotipo y el j-ésimo medio de cultivo

$(GD)_{ik}$  = Efecto de la interacción entre el i-ésimo genotipo y el k-ésimo nivel de 2,4-D

$(MD)_{jk}$  = Efecto de la interacción entre el j-ésimo medio de cultivo y el k-ésimo nivel de 2,4-D

$(GMD)_{ijk}$  = Efecto de la interacción de segundo orden entre los tres factores

$\epsilon_{(ijkl)}$  = Error experimental de la ijkl-ésima observación

Las hipótesis estadísticas probadas fueron:

$$H_{01}: \sigma^2_G = \sigma \quad \text{Vs.} \quad H_{A1}: \sigma^2_G \neq 0$$

$H_{02}: \sigma^2_M = 0$	Vs.	$H_{A2}: \sigma^2_M \neq 0$
$H_{03}: \sigma^2_D = 0$	Vs.	$H_{A3}: \sigma^2_D \neq 0$
$H_{04}: \sigma^2_{GM} = 0$	Vs.	$H_{A4}: \sigma^2_{GM} \neq 0$
$H_{05}: \sigma^2_{GD} = 0$	Vs.	$H_{A5}: \sigma^2_{GD} \neq 0$
$H_{06}: \sigma^2_{MD} = 0$	Vs.	$H_{A6}: \sigma^2_{MD} \neq 0$
$H_{07}: \sigma^2_{GMD} = 0$	Vs.	$H_{A7}: \sigma^2_{GMD} \neq 0$

Las variables evaluadas en este caso fueron el número y porcentaje de cariósides que formaron callo y el peso fresco de callo, en mg que se obtuvo por diferencia entre el peso del frasco con callo y sin este, después de seis semanas de la siembra. Posterior a esto, se subcultivó el callo en medio de cultivo fresco para incremento del mismo.

### 3.3. Establecimiento de suspensiones celulares a partir de subcultivos de callo friable

Con la finalidad de determinar el tiempo de incubación específico, se inició el establecimiento de cultivos de células en suspensión a partir de callo friable de la accesión PI-240170 (G2). Para lo anterior, se transfirieron 0.5 g de dicho callo a matraces de 125 ml con 25 ml de medio de cultivo líquido MS adicionado con 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.3 mg.l<sup>-1</sup> de AIA y los constituyentes orgánicos utilizados en el ensayo anterior. En este caso, se realizaron observaciones preliminares para determinar el tiempo necesario para llevar a cabo el primer subcultivo y los subsiguientes.

Después de llevar a cabo la transferencia aséptica del callo a los matraces, éstos fueron colocados en un agitador rotatorio a 130 rpm en el cuarto de incubación bajo condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 2^0$  C) y fotoperíodo (16/8 hrs) por un período de dos semanas.



Posteriormente, 25 ml de cada suspensión celular fueron transferidos a matraces de 125 ml conteniendo 25 ml de medio fresco. Para realizar la transferencia se utilizó tela de gasa esteril para filtrar las suspensiones y eliminar agregados grandes no disociados de callo. Los cultivos se colocaron en las mismas condiciones de agitación e incubación que en el caso anterior.

Las suspensiones celulares se subcultivaron en tres ocasiones en medio fresco cada dos semanas para su mantenimiento e incremento. Dos semanas después del último subcultivo, se determinó la densidad celular ( $g \cdot 30 \text{ ml}^{-1}$  de suspensión) y el peso fresco de los subcultivos celulares (g). Lo anterior se consiguió al coleccionar alícuotas de 20 ml (2 muestras por repetición) en la campana de flujo laminar de suspensión celular en papel filtro Whatman # 1 colocado sobre un embudo y este sobre un matraz kitazato con tapón sellador de caucho, conectado a una bomba de vacío. El filtrado se pesó inmediatamente en una balanza analítica para obtener el peso fresco de células.

### 3.4. Caracterización y selección de suspensiones celulares bajo estrés salino

#### 3.4.1. Caracterización

Se utilizaron subcultivos de las suspensiones celulares establecidas a partir de callo de la accesión PI-240170. El medio de cultivo utilizado tanto para el establecimiento como para el mantenimiento e incremento de las suspensiones celulares fue el de Murashige-Skoog, 1962 adicionado con la solución de vitaminas probada para la inducción de callo,  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de mioinositol,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de 2.4-D,  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de AIA y 3.0 % de sacarosa.

En matraces de 125 ml conteniendo 30 ml de medio fresco, se aplicaron los tratamientos 0, 60, 120 y 180 mM de NaCl. Una vez establecidos los tratamientos, se llevó a

cabo la transferencia al medio de cultivo bajo condiciones asépticas de 0.5 g de células de la suspensión madre. La alicuota de suspensión celular necesaria para adicionar los 0.5 g de células por matraz, se obtuvo en función de la densidad celular de cada matraz de suspensión madre, en base a la ecuación utilizada por Alvarado (1990).

$$V_1 = V_m D_2 / (D_1 - D_2)$$

Donde:

$V_1$  = Volumen requerido del cultivo madre para transferir a medio fresco

$V_m$  = Volumen del medio fresco

$D_1$  = Densidad del cultivo madre

$D_2$  = Densidad deseada en el nuevo cultivo

Los matraces con la suspensión celular y los cuatro tratamientos fueron colocados en condiciones de incubación a temperatura de  $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$  y fotoperíodo de 16/8 hrs, en constante agitación a 130 rpm en un agitador Termolyne Orbital Shaker modelo M49235.

Para este bioensayo, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones; se realizaron muestreos cada seis días durante un período de 36 días, por lo que el diseño de tratamientos quedó constituido por un factorial conformado entre los cuatro niveles de salinidad y los seis períodos de muestreo, dando un total de 24 tratamientos. Las muestras se sometieron a filtración por vacío sobre papel filtro Whatman # 1 y se determinó el peso fresco de células en  $\text{g} \cdot 30\text{ml}^{-1}$  de suspensión. Así mismo, se obtuvo el peso seco de dichas muestras, una vez que éstas fueron deshidratadas hasta peso constante en horno de microondas.

Mediante una prueba de exclusión de colorante por parte de las células vivas, se determinó el porcentaje de viabilidad de las suspensiones celulares, por conteo directo de células al microscopio teñidas o no con azul de Evan diluido al 0.5 % (López, 1984; Alvarado et al., 1991)

Con los datos de peso fresco, peso seco y viabilidad se llevaron a cabo los análisis de varianza correspondientes utilizando el paquete computacional de diseños experimentales FAUANL (Olivares, 1994), a través del cual también se realizó la comparación de medias por el método de Tukey en los casos en que se detectó significancia estadística.

Lo anterior, de acuerdo con el modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + S_j + (DS)_{ij} + \epsilon(ijk)$$

Para:  $D_i$  = Días de muestreo: 1, 2, 3, 4, 5, 6

$S_j$  = Niveles de salinidad (NaCl): 1, 2, 3, 4

Donde:  $\mu$  = Media general

$D_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima fecha de muestreo

$S_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo nivel de sal (NaCl)

$(DS)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre la  $j$ -ésima fecha de muestreo y el  $i$ -ésimo nivel de sal

$\epsilon(ijk)$  = Error experimental de la  $ijk$ -ésima observación

Las hipótesis estadísticas probadas fueron:

$$H_{01}: \sigma_D^2 = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A1}: \sigma_D^2 \neq 0$$

$$H_{02}: \sigma_S^2 = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A2}: \sigma_S^2 \neq 0$$

$$H_{03}: \sigma^2_{DS} = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A3}: \sigma^2_{DS} \neq 0$$

Para estimar la eficiencia del crecimiento, así como la tolerancia de las suspensiones celulares a la salinidad en distintos periodos durante su ciclo, con los datos de peso fresco y peso seco predichos se obtuvieron los siguientes parámetros:

**Relación Peso fresco/Peso seco (PF/PS).**- Se refiere a la cantidad de peso fresco por unidad de peso seco.

**Tasa relativa de crecimiento (TRC).**- Es el crecimiento de las suspensiones celulares por unidad de tiempo y se obtuvo con la ecuación:

$$TRC = \frac{\ln C2 - \ln C1}{t2-t1} \quad (\text{Causton y Venus, 1981})$$

Donde:

ln.- es el logaritmo natural

C1.- es el peso fresco predicho para el muestreo inmediato anterior

C2.- es el peso fresco predicho para el muestreo inmediato posterior

t1 y t2.- son los días anterior y posterior de muestreo respectivamente

**Tiempo de duplicación (T.D.).**- Se refiere al tiempo promedio necesario para que se lleve a cabo una duplicación celular y se obtuvo con la ecuación:

$$T.D. = \frac{\ln 2}{TRC} \quad (\text{Richards, 1969})$$

Número de duplicaciones (N.D.)- Es la cantidad de duplicaciones que se llevaron a cabo durante el tiempo de cultivo en suspensión y se obtuvo con la ecuación:

$$N.D. = \frac{\ln C2 - \ln C1}{\ln 2}$$

Índice de tolerancia (IT).- Es un parámetro indicador de la tolerancia relativa de las suspensiones celulares a la salinidad (NaCl) y se obtuvo con la ecuación:

$$IT = \frac{P_i}{P_{oi}} \times (100 - y_i) \quad (\text{López, 1984})$$

Donde:

$P_i$  = Es la diferencia entre el peso final y el peso inicial ( $\text{mg } 30\text{ml}^{-1}$ ) de células creciendo en medio salino (NaCl)

$P_{oi}$  = Es la diferencia entre el peso final y el peso inicial ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) de células creciendo en medio libre de sal

$y_i$  = Es la concentración de NaCl ( $\text{g.l}^{-1}$ ), en la que:  $i_1 = 3.5 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $i_2 = 7.0 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $i_3 = 10.5 \text{ g.l}^{-1}$ .

Para la predicción del crecimiento en lo que se refiere a peso fresco y peso seco, se procedió a seleccionar los modelos de mejor ajuste por regresión (paquete computacional Jandel Scientific-Curve) con los datos observados, de tal forma que por su coeficiente de determinación y mayor acercamiento a los datos reales, el modelo más adecuado fue:

Para peso fresco:

$$Z = (a + bx^2 + cx^2 + dy + ey^2)/(1 + fx + gx^2 + hx^3 + iy + jy^2)$$

y para el peso seco:

$$Z = (a + bx + cx^2 + dy + ey^2 + fy^3)/(1 + gx + hx^2 + iy + jy^2 + ky^3).$$

Donde: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, son los parámetros estadísticos del modelo.

Por otra parte, fue también determinado el potencial hidrico de las suspensiones celulares sometidas a distintos tratamientos de NaCl durante las fechas de muestreo consideradas. Este se llevó a cabo con muestras de células después de haber sido filtradas en una repetición, con un psicrómetro de termopar de 10 cámaras (SC-10A Thermocouple Psychrometer. Decagon Devices, Inc. USA), calibrado con soluciones standard de NaCl de potencial conocido en el cuarto de incubación, estabilizándolo a una temperatura de  $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$  para obtener lecturas de microvoltaje con microvoltímetro (NT-3 Nanovoltmeter Thermometer, Decagon Devices Inc. USA)

#### 3.4.2. Selección

Para realizar la selección de suspensiones celulares para tolerancia a NaCl, se procedió a preparar subcultivos provenientes de los tratamientos 0, 60, 120 y 180 mM de NaCl en medio de cultivo fresco igual al utilizado para la caracterización, pero adicionado con la concentración

de 180 mM de NaCl. En este caso, también se incluyó una suspensión testigo que consistió en el subcultivo de la suspensión celular en medio sin sal al medio de cultivo fresco libre también de sal. De esta forma, se subcultivaron cinco tipos de suspensiones que se denominaron 0/0, 0/180, 60/180, 120/180 y 180/180. Los subcultivos se mantuvieron en observación por siete semanas con muestreos iniciales a 7, 14 y 21 días. Una vez que éstos alcanzaron la fase estacionaria a los 49 días, se obtuvo, para cada subcultivo pretratado con un nivel de sal, su densidad celular y crecimiento final, en función de lo cual se seleccionaron aquellos de mejor comportamiento promedio por nivel de pretratamiento de sal y dentro de éstos se eligieron los matraces de mayor densidad celular para llevar a cabo el plaqueo posteriormente, consistente en el cultivo de las suspensiones celulares en medio sólido para la formación de agregados celulares.

El diseño de tratamientos para este ensayo, consistió en un factorial conformado por las combinaciones de los cinco niveles de pretratamientos de sal y las cuatro fechas de muestreo, para sumar un total de 20 tratamientos. El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con cuatro repeticiones, quedando representada la unidad experimental por un matraz de 125 ml con 30 ml de suspensión celular

Las variables que se midieron fueron el peso fresco y peso seco en  $\text{mg } 30\text{ml}^{-1}$  y el % de viabilidad celular, siguiendo el procedimiento ya descrito para el ensayo de caracterización de células. Con los datos de estas variables, se realizaron los análisis de varianza correspondientes, de acuerdo con el modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + S_j + (DS)_{ij} + \epsilon(ijk)$$

Para:  $D_i$  = Días de muestreo: 1, 2, 3, 4

$S_j$  = pretratamientos de salinidad y testigo (NaCl): 1, 2, 3, 4, 5

Donde:  $\mu$  = Media general

$D_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima fecha de muestreo

$S_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo pretratamiento sal (NaCl)

$(SD)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$ -ésima fecha de muestreo y el  $j$ -ésimo pretratamiento de sal y

$\xi(ijk)$  = Error experimental de la  $ijk$ -ésima observación

Las hipótesis estadísticas probadas fueron:

$$H_{01}: \sigma^2_D = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A1}: \sigma^2_D \neq 0$$

$$H_{02}: \sigma^2_S = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A2}: \sigma^2_S \neq 0$$

$$H_{03}: \sigma^2_{DS} = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A3}: \sigma^2_{DS} \neq 0$$

Simultáneamente con la realización de la cosecha de suspensiones celulares seleccionadas, se llevó a cabo el plaqueo de las mismas bajo condiciones asépticas en cajas petri de plástico (10 x 15 mm) esterilizadas, aplicando una alícuota de 2 ml de suspensión por caja petri conteniendo 25 ml del mismo medio de cultivo fresco, gelificado con 5  $gl^{-1}$  de agar-gel y cubierto con papel filtro Whatman # 4.

Una vez selladas las cajas fueron colocadas en el cuarto de incubación a una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ} C$  en obscuridad. Ocho semanas después se realizó la transferencia de los agregados celulares formados a medio de cultivo fresco y posteriormente se realizaron subcultivos mediante los cuales se establecieron ensayos de regeneración de planta.



### 3.5. Evaluación de la estabilidad de agregados celulares en distintas concentraciones salinas.

Este bioensayo se llevó a cabo a partir de agregados celulares originados de suspensiones seleccionadas por mayor crecimiento en peso fresco y peso seco bajo una concentración de 180 mM de NaCl; éstas provenían de suspensiones cultivadas en concentraciones de 60 y 120 mM de NaCl. Se consideró además un testigo proveniente de suspensiones celulares cultivadas libres de sal. Dichas suspensiones celulares seleccionadas se consideraron líneas celulares  $L_1$  y  $L_2$ , respectivamente, al testigo se le denominó  $L_0$ . Los niveles de salinidad utilizados fueron 0, 80, 160 y 240 mM de NaCl, de tal forma que se formaron 12 tratamientos con la combinación de las tres líneas celulares y cuatro niveles de salinidad, en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. La unidad experimental fue representada por 0.5 g de subcultivo de agregado celular por caja petri.

Se utilizó el mismo medio de cultivo descrito ya anteriormente para la caracterización de suspensiones celulares. La siembra se realizó en cajas petri de 100 x 15 mm en la campana de flujo laminar, donde se vertieron 25 ml de medio de cultivo por caja petri. Una vez que el medio solidificó fue cubierto con papel filtro Whatman # 4, sobre el cual se colocaron 0.5 g de agregados celulares provenientes del plaqueo en el que no se aplicó sal, los cuales fueron pesados directamente en la caja petri con el medio en balanza analítica electrónica.

Una vez selladas y etiquetadas las cajas petri, los subcultivos fueron colocados en el cuarto de incubación a  $25 \pm 2^{\circ}$  C de temperatura y en obscuridad por seis semanas. Al cabo de dicho periodo se determinó el peso fresco final en balanza analítica alcanzado por los agregados celulares. Con los datos obtenidos se llevó a cabo el análisis de varianza para un factorial en diseño completamente al azar con cinco repeticiones, bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + S_j + (LS)_{ij} + \epsilon(ijk)$$

Para:  $L_i$  = Líneas celulares: 1, 2 3

$S_j$  = Niveles de salinidad (NaCl): 1, 2, 3, 4

Donde:  $\mu$  = Media general

$L_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima línea celular

$S_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo nivel de sal (NaCl)

$(LS)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$ -ésima línea celular y el  $j$ -ésimo nivel de sal (NaCl)

$\epsilon(ijk)$  = Error experimental de la  $ijk$ -ésima observación

Las hipótesis estadísticas probadas fueron:

$$H_{01}: \sigma^2_L = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A1}: \sigma^2_L \neq 0$$

$$H_{02}: \sigma^2_S = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A2}: \sigma^2_S \neq 0$$

$$H_{03}: \sigma^2_{LS} = 0 \quad \text{Vs.} \quad H_{A3}: \sigma^2_{LS} \neq 0$$

Los análisis de varianza y comparación de medias de tratamientos por el método de Tukey para cada variable de los ensayos realizados, se llevaron a cabo mediante el paquete computacional de diseños experimentales FAUANL (Olivares, 1994).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Validación de la primera hipótesis

#### 4.1.1. Respuesta a la salinidad en etapa de germinación

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la prueba de germinación, los cuales mostraron que mientras en el tratamiento salino el 21.2 % de los genotipos no presentó germinación, en el tratamiento libre de sal el 100 % de las accesiones presentó germinación. Así mismo, se presentó variación entre las accesiones en ambos tratamientos, puesto que en el tratamiento con sal la germinación fluctuó entre 0 y 45 % y en aquel sin sal esta estuvo entre 10 y 90 %. Se obtuvo el porcentaje de germinación relativa para cada accesión probada. En las 20 accesiones de mayor germinación relativa preseleccionadas la germinación fluctuó entre 20 y 75 % en el tratamiento libre de sal, mientras que en el tratamiento salino esta estuvo entre el 10 y 45 %. Datos presentados por Gutiérrez *et al.* (1991) respecto al porcentaje de germinación de cinco genotipos de *C. ciliaris* L., sometidos a distintas concentraciones de sal, confirmaron la variabilidad existente en este aspecto, ya que los porcentajes promedio de germinación de los genotipos probados fueron de 63.5, 65.7, 49.3 y 39.6 % para concentraciones de 0, 3000, 6000 y 9000 ppm de NaCl, que equivalen a 0, 51.3, 102.6 y 153.8 mM de la misma sal, respectivamente. Su conclusión fue en el sentido de que los genotipos fueron fuertemente afectados en su porcentaje de germinación a una concentración superior de 6000 ppm (102.6

mM) de NaCl: una concentración similar a la utilizada como tratamiento intermedio en el presente trabajo.

Bajo el concepto de germinación relativa, en la Figura 2 se aprecia que del grupo de accesiones preseleccionadas, en las dos primeras que fueron PI-365661 y PI-240170 no hubo reducción en el número de cariopsides germinados en condiciones salinas en relación con sus respectivos testigos libres de sal, ya que presentaron el 100 % de germinación relativa; 16 accesiones mostraron entre el 50 y 87 % de germinación relativa y las dos restantes tuvieron un 40 %.

Cuadro 2. Accesiones de zacate buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) preseleccionadas por mayor porcentaje relativo de germinación, entre 99 accesiones probadas con solución salina (100 mM de NaCl) y sin esta.

ACCESION	LOTE FAUANL (En campo)	GERMINACION DE CARIOPSIDES				GERM. RELAT.
		0 mM NaCl		100 mM NaCl		
		(Ptas.)	(%)	(Ptas.)	(%)	
PI-365661	32	5	25	5	25	100
PI-240170	180	6	30	6	30	100
PI-345976	96	8	40	7	35	87
PI-218095	188	11	55	9	45	82
PI-284837	11	10	50	8	40	80
PI-442090	157	5	25	4	20	80
PI-384427	148	10	50	8	40	80
PI-243199	769	10	50	7	35	70
PI-193445	7	11	55	7	35	64
PI-161636	197	8	40	5	25	62
PI-315681	103	8	40	5	25	62
PI-307622 Nunbank	19	14	70	8	40	57
PI-442085	152	11	55	6	30	54
PI-365654	27	6	30	3	15	50
PI-294596	15	8	40	4	20	50
PI-365697	52	4	20	2	10	50
PI-226087 K56B	168	10	50	5	25	50
PI-339893	24	4	20	2	10	50
SDE-128	783	5	25	2	10	40
PI-323415	93	15	75	6	30	40

Estos resultados sugieren que existe variación entre accesiones de zacate buffel en cuanto a su tolerancia a la salinidad, de aquí que se preseleccionaron las accesiones de mayor porcentaje de germinación relativa, que fueron PI-365661 y PI-240170 identificadas con los números 32 y 180 respectivamente en el lote de propagación de la unidad de recursos genéticos de la FAUANL.

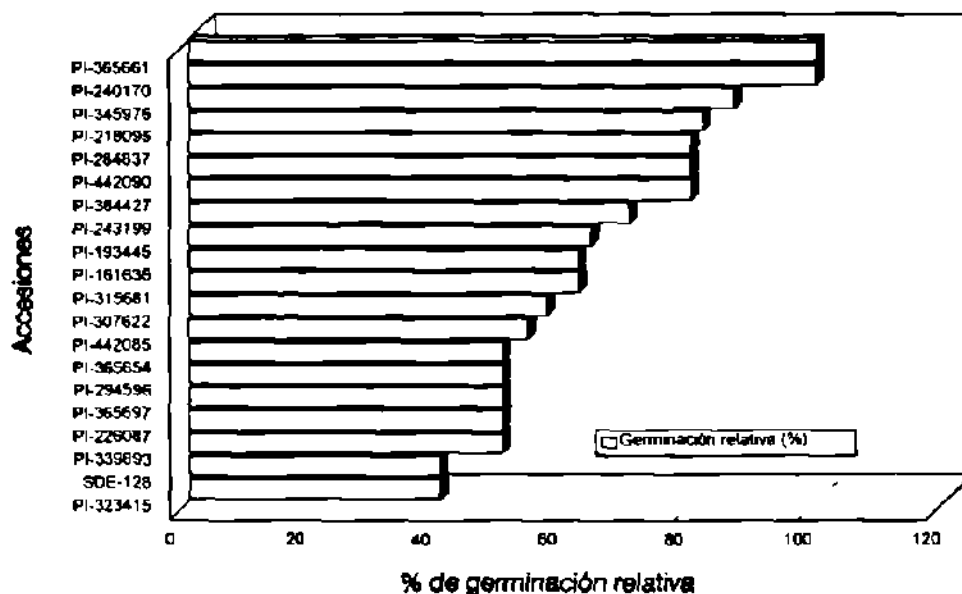


Figura 2. Accesiones de *C. ciliaris* L., seleccionadas por mayor porcentaje de germinación relativa bajo tratamientos de 0 y 100 mM de NaCl

#### 4.1.2. Respuesta a la salinidad en planta

Respecto a los tratamientos de 0, 120 y 240 mM de NaCl aplicados a plantas, los promedios correspondientes a número de tallos por planta, altura de planta, peso fresco de planta y peso seco de planta presentaron diferencias significativas (Cuadros 1A, 2A, 3A y 4A). Al hacer la comparación de medias, los valores mas altos en cada caso correspondieron al testigo (sin sal), seguidos por los tratamientos de 120 y 240 mM de NaCl (Cuadro 3).

Cuadro 3. Medias para cuatro características de planta de dos genotipos de *C. ciliaris* L. bajo tres tratamientos de NaCl.

VARIABLE	NaCl (mM)	GENOTIPOS		$\bar{X}$
		PI-240170	“Común”	
No. de tallos/planta	0	80.575	51.325	65.950a
	120	72.825	44.325	58.575ab
	240	69.000	38.250	53.625 b
$\bar{X}$		74.133	44.633	
Altura de planta (cm)	0	93.475	115.425	104.450a
	120	83.325	108.000	95.662 b
	240	66.350	96.325	81.337 c
$\bar{X}$		81.050	106.583	
Peso fresco/planta (g)	0	321.675a	365.825a	343.750a
	120	265.000 b	283.750 b	274.375 b
	240	184.175 c	137.900 c	161.037 c
$\bar{X}$		256.949	262.491	
Peso seco/planta (g)	0	132.500	138.350	135.425a
	120	115.000	113.350	114.175 b
	240	79.175	60.425	69.800 c
$\bar{X}$		108.891	104.041	

Valores con letra distintas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.05)

Lo anterior evidenció la sensibilidad de ésta especie a la salinidad, presentada en los genotipos PI-240170 y "Común". Estos resultados coinciden con los obtenidos para otros genotipos reportados por distintos investigadores entre ellos Graham y Humphreys (1970) y Gutiérrez et al. (1990).

Para los dos genotipos probados, los datos en porcentaje promedio de reducción de las variables evaluadas, obtenidos en base al tratamiento testigo de cada genotipo, no presentaron significancia estadística (Cuadros 5A, 6A, 7A y 8A), sin embargo, mostraron una tendencia mejor para la accesión PI-240170 en las variables correspondientes a número de tallos por planta, peso fresco de planta y peso seco de planta con valores de 11.38, 30.01 y 26.23 %, respectivamente. En relación a los valores de la accesión "Común" para las mismas características, éstos fueron de 19.16, 40.60 y 37.08 %, respectivamente. En cambio, para la altura de planta, el porcentaje promedio de reducción mas bajo fue para la accesión "común" con 10.61 % en relación con 19.89 % de PI-240170 (Cuadro 4).

Respecto a las medias en porcentaje de reducción obtenidas para las dos concentraciones de NaCl aplicadas sobre genotipos, se detectaron diferencias altamente significativas entre dichos tratamientos para altura de planta, peso fresco y peso seco de planta. En este aspecto, los porcentajes de reducción mas altos correspondieron a la concentración de 240 mM de NaCl, con 22.21, 50.79 y 48.01 % del testigo, respectivamente para altura de planta, peso fresco y peso seco de planta; mientras que para 120 mM de NaCl las mismas variables mostraron 8.31, 19.81 y 15.30 %, respecto al testigo. En cuanto al número de tallos por planta, los valores promedio de reducción en porcentaje fueron de 11.05 y 19.49 % para 120 y 240 mM de NaCl, respectivamente.

De lo anterior se dedujo que la accesión PI-240170 mostró mayor grado de tolerancia a salinidad (NaCl), en relación con la accesión "Común", aunque en promedio la reducción en

biomasa fue considerable (50.79 %) cuando se aplicó el tratamiento de 240 mM de NaCl, lo cual confirma la sensibilidad de la especie a la salinidad considerada por otros investigadores (Williamson y Pinkerton, 1985; Ryan et al., 1975b; Graham y Humphreys, 1970; Saldivar, 1971; Ibarra et al. 1991)

Cuadro 4. Porcentajes de reducción promedio de cuatro características de planta obtenidos en base a un testigo por genotipo (0 mM de NaCl), de dos genotipos de *C. ciliaris* L. en dos concentraciones de NaCl.

VARIABLE	GENOTIPOS	CONC. DE NaCl (mM)		$\bar{X}$
		120	240	
Tallos por planta	PI-240170	8.69	14.07	11.38
	"Común"	13.40	24.91	19.16
	$\bar{X}$	11.05	19.49	15.27
Altura de planta	PI-240170	10.82	28.98	19.89
	"Común"	5.79	15.43	10.61
	$\bar{X}$	8.31 b	22.21a	15.25
Peso fresco de planta	PI-240170	17.26	42.76	30.01
	"Común"	22.37	58.82	40.60
	$\bar{X}$	19.81 b	50.79a	35.30
Peso seco de planta	PI-240170	12.58	39.87	26.23
	"Común"	18.01	56.15	37.08
	$\bar{X}$	15.30 b	48.01a	31.65

Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.01).



Los resultados obtenidos, hasta aquí, tanto de germinación como de comportamiento en planta permiten concluir que la hipótesis uno, respecto a que se esperaba una respuesta diferencial en el cultivo de distintos genotipos de zacate buffel bajo ambientes salinos es considerada como válida.

#### 4.2. Validación de la segunda hipótesis

##### 4.2.1. Inducción de callo y selección de medio de cultivo

El análisis de varianza del cuadro 9A mostró significancia estadística para genotipos y la interacción genotipos por medios de cultivo para la variable porciento de cariósides que formaron callo. De acuerdo con la comparación de medias (Cuadro 5), la accesión "Común" presentó la mayor respuesta, ya que 80.33 % de sus cariósides formaron callo, seguida por las accesiones PI-365661 (G1) y PI-240170 (G2), con 54.16 y 25 %, respectivamente. Al considerar la interacción genotipos por medios y hacer la prueba de comparación de medias, se pudo establecer que para inducir el mayor número de cariósides a formación de callo, se requiere un medio particular para cada genotipo, así, en el "Común" se logró la mayor inducción en ambos medios, con tendencia a ser superior en el medio MS, la cual resultó estadísticamente igual que la obtenida para PI-365661 en el medio B5 y distinta a las combinaciones restantes.

En lo que respecta a los medios de cultivo y concentraciones de 2, 4-D, no se observó significancia estadística y se pudo apreciar mucha proximidad en los valores promedio de porcentaje entre los niveles de cada uno de estos factores para la variable considerada.

Respecto a la variable peso fresco de callo, en el cuadro 10A se observa que se detectaron diferencias significativas entre las medias de tratamientos correspondientes a medios de cultivo y la media más alta correspondió a MS con 369 mg de callo, mientras que para las concentraciones de 2, 4-D, la tendencia de los datos mostró que la media más alta fue para 1  $\text{mg l}^{-1}$  con 341 mg de callo. Considerando la significancia estadística observada para la interacción de segundo orden, en esta variable, se llevó a cabo la comparación de medias de todos los tratamientos y se detectó que los valores de las combinaciones correspondientes a las accesiones PI-365661 y PI-240170 en el medio MS y 1  $\text{mg l}^{-1}$  de 2,4-D fueron los más altos, resultando la combinación conformada con el primero de los dos genotipos mencionados estadísticamente igual a la del segundo y distinta a las restantes.

En general, en éste ensayo, en el medio básico MS combinado con 2,4-D se lograron condiciones favorables para tener buena respuesta en la inducción de callo de zacate buffel, lo que coincide con diversos investigadores que han utilizado con éxito éste medio adicionado también con el 2,4-D; en distintas gramíneas para inducción de callo, entre otros, se puede mencionar a Hanzel *et al.* (1985) en cebada; McDonnell y Conger, (1984) en Kentucky bluegrass; Tiburcio *et al.* (1991) en maíz; Rogers *et al.* (1993) y Manzano (1993) en zacate buffel; Osuna *et al.* (1995) en mijo cola de zorra.

Adicionalmente, en el presente estudio se obtuvo una respuesta favorable, al utilizar el medio B5 combinado con 2,4-D, sobre todo en lo que respecta a la variable porcentaje de carióspsides que formaron callo; no obstante, considerando la mayor proliferación de callo, de acuerdo con los datos de peso fresco se seleccionó el medio de cultivo MS y la concentración de 1  $\text{mg l}^{-1}$  de 2,4-D, tomando en cuenta que fue en el que se generó relativamente mayor cantidad de callo con la dosis menor de auxina. Dicho medio fue utilizado posteriormente para el

mantenimiento e incremento de callo así como en el cultivo de células en suspensión, sin el agente gelificante.

**Cuadro 5. Porcentajes de cariósides que presentaron inducción de callo y peso fresco de callo de tres genotipos en dos medios de cultivo y dos concentraciones de 2, 4-D.**

FACTORES	NIVELES DE FACTORES	IND. CALLO	P. F. CALLO
		(% carióp.)	(mg)
GENOTIPOS	PI-365661	54.16 b	358
	PI-240170	25.00 c	204
	“Común”	80.83a	304
MEDIOS	MS	51.66	369a
	B5	55.00	208 b
2,4-D	1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	51.66	341
	3 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	55.00	236

Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.05)

P. F. = Peso fresco

#### 4.2.2). Establecimiento y caracterización de suspensiones celulares bajo estrés salino

Respecto al establecimiento de las suspensiones celulares, inicialmente se observó el crecimiento de éstas y se realizaron varios subcultivos que permitieron el incremento y la homogenización de las que se denominaron “suspensiones celulares madre”, cuyo ciclo de crecimiento para la accesión PI-240170 se estableció entre 24 y 30 días, mientras que en las dos

aciones restantes, no se alcanzó a definir en este período, observándose sólo el inicio de cultivos mucilaginosos que no alcanzaron a formar la "suspensión madre" para su caracterización bajo el estrés salino. Al respecto, Rogers *et al.* (1993) identificaron dos tipos de callo de la accesión PI-409704 de *C. ciliaris* L., uno friable de color blanquecino y otro mucilaginoso de coloración café, de los que obtuvo subcultivos de suspensiones celulares, en las que observó que aquellas provenientes del primero crecieron a una tasa diez veces mayor que las segundas. En el presente estudio, para obtener la sincronización de etapas de crecimiento de las suspensiones celulares se optó por llevar a cabo la caracterización bajo estrés salino de la accesión PI-240170 que presentó suspensiones celulares friables y más uniformes que los otros genotipos.

#### 4.2.2.1. Caracterización por peso fresco

En cuanto a la caracterización de las suspensiones celulares bajo los diferentes niveles de estrés salino, en el análisis de varianza del Cuadro 11A sólo se detectó diferencia significativa entre los días de muestreo para el incremento en el peso fresco después de la transferencia celular a los medios de cultivo. En el Cuadro 6 se puede apreciar que de los 6 a los 24 días no hubo diferencia estadística en el incremento del peso fresco celular en las suspensiones y que para los 30 y 36 días después de la transferencia se obtuvieron los mayores pesos frescos

En el cuadro 11A se aprecia un nivel de significancia de "F" de 0.051 para las concentraciones de NaCl en peso fresco celular; no obstante que no hay diferencia estadística entre los niveles de NaCl, es evidente una tendencia que se aprecia en la Figura 3, en la que el incremento máximo de peso fresco de células se logró a los 30 días para las concentraciones de

Cuadro 6. Peso fresco observado de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos períodos de crecimiento en suspensión.

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)				$\bar{X}$
	0	60	120	180	
0	500	500	500	500	500.0
6	776	705	679	638	699.4 c
12	940	866	647	973	856.8 c
18	615	1394	979	671	915.0 c
24	1196	5454	2379	605	2408.6 bc
30	9784	9307	5020	4493	7142.1a
36	4600	5979	5615	2591	4696.6ab
$\bar{X}$	2630.1	3457.9	2259.9	1495.9	2459.8

Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.05)

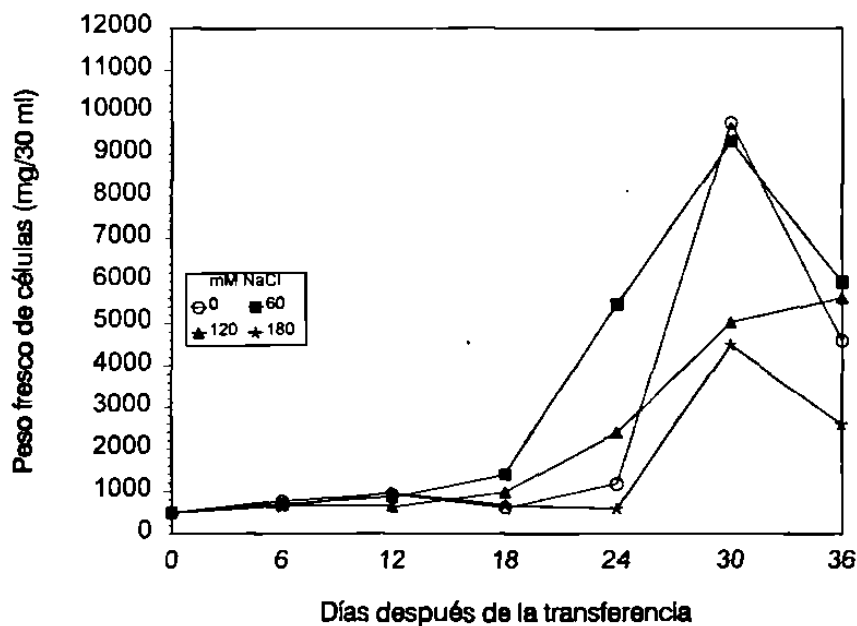


Figura 3. Crecimiento en peso fresco observado de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. para cuatro tratamientos de NaCl.

0, 60 y 180 mM de NaCl para luego disminuir a los 36 días después de la transferencia, en tanto que para la concentración de 120 mM de NaCl el máximo peso fresco celular se logró a los 36 días después de la transferencia, lo que se puede interpretar como un crecimiento continuo de las células bajo ésta concentración hasta ésta fecha de muestreo.

Por otra parte, fue notorio que para los tratamientos intermedios de 60 y 120 mM de NaCl la primera fase de crecimiento celular se dio hasta los 18 días, mientras que para el testigo libre de sal y el nivel alto (180 mM) ésta se prolongó hasta los 24 días después de la transferencia de células al medio y a partir de éstos periodos las curvas de crecimiento mostraron una fase exponencial (Figura 3).

Tomando en consideración el crecimiento predicho a través de los datos de peso fresco ajustados (Cuadro 7), la tendencia a partir del tercer muestreo colocó a las suspensiones celulares del nivel de 60 mM como las de mayor crecimiento, seguidas por las del testigo sin sal, el nivel de 120 mM, y el nivel de 180 mM, respectivamente (Figura 4).

Respecto a lo anterior, Croughan *et al.* (1981) observaron en líneas celulares de arroz y alfalfa un mejor crecimiento en presencia de cantidades moderadas de sal, en comparación con el crecimiento en ausencia de esta, por lo que concluyeron que dichas líneas presentaban hábitos halofíticos. Así mismo, en trabajos de investigación con otros cultivos, también se ha presentado este tipo de respuesta, en particular en trigo, para el cual regenerantes (R1) provenientes de callos seleccionados en distintas concentraciones salinas (0.3, 0.5 y 0.7 % de NaCl) presentaron tolerancia a salinidad, pero aquellas generadas a partir de callos sometidos a 0.7 % de NaCl presentaron el mayor grado de tolerancia a sal cuando fueron evaluadas en medio de cultivo líquido por seis semanas (Karadimova y Djambova, 1993). Los resultados de dichos trabajos coinciden con los del presente estudio, en el que suspensiones celulares de *C.*

*ciliaris* L. sometidas al nivel de 60 mM de NaCl, presentaron mejor crecimiento inicial en una concentración baja de sal que en ausencia de ésta o en concentraciones mayores.

Cuadro 7. Peso fresco predicho de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión:

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)			
	0	60	120	180
0	523.658	509.408	504.420	508.762
6	673.175	644.201	634.983	645.843
12	940.241	864.804	844.744	882.834
18	1597.231	1232.701	1165.075	1508.741
24	1752.481	3194.326	2769.096	1774.598
30	9813.177	10510.000	6985.548	4067.662
36	4713.651	5821.953	4576.107	2942.205

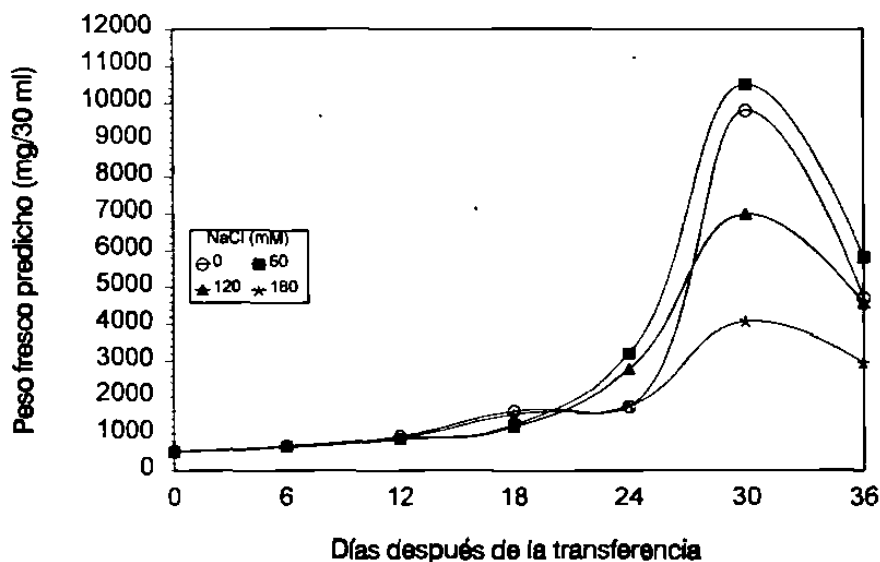


Figura 4. Crecimiento en peso fresco predicho de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. para cuatro tratamientos de NaCl

Respecto a la tasa relativa de crecimiento de las suspensiones celulares en base al peso fresco predicho, ésta tendió a disminuir conforme se incrementó la concentración de NaCl y a aumentar con el tiempo de cultivo a partir de la transferencia de células al medio, hasta los 30 días en que el tratamiento testigo presentó la media mas alta, con 0.287, seguido por los tratamientos correspondientes a las concentraciones de 60, 120 y 180 mM de NaCl, con valores promedio de 0.198, 0.154 y 0.138, respectivamente. A partir de éste período el crecimiento se redujo, por lo que en el Cuadro 8 aparecen valores negativos a los 36 días.

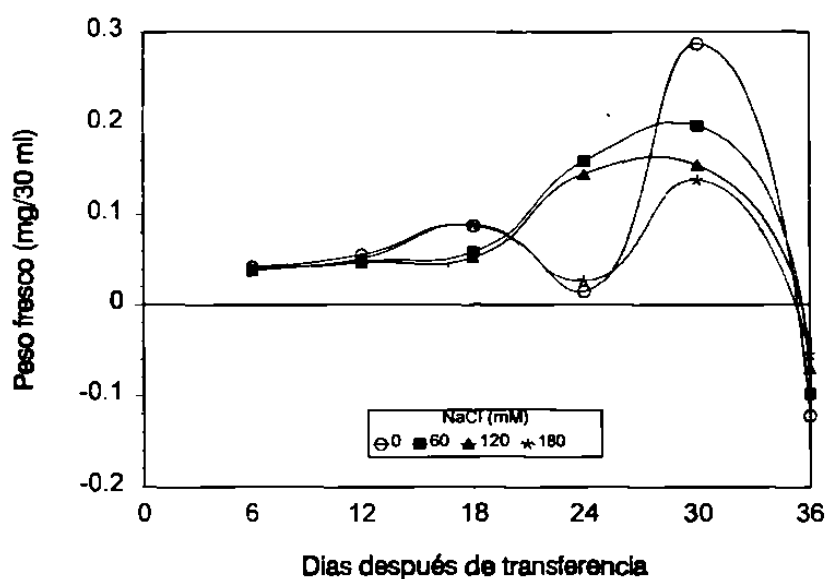
Puesto que la tasa relativa de crecimiento es un indicador de la velocidad promedio de crecimiento por unidad de masa inicial y por unidad de tiempo (Alvarado, 1990), se dedujo que el nivel de concentración de NaCl afectó adversamente el crecimiento de las suspensiones celulares. En la Figura 5 se puede apreciar en las curvas para la tasa relativa de crecimiento de las suspensiones bajo distintos tratamientos, que aquellas tratadas con 60 y 120 mM de NaCl iniciaron su incremento a los 18 días después de la transferencia al medio, en contraste, con el testigo y la concentración con 180 mM de NaCl, en los que la menor tasa relativa de crecimiento se presentó a los 24 días, período en el que también dio inició el crecimiento mas intenso. Lo anterior podría ser atribuido a la actividad enzimática intracelular y de protección en la función de las membranas a causa de la acumulación de algunos solutos orgánicos como glicinebtaína, prolina y azúcares en respuesta a concentraciones de NaCl relativamente elevadas dentro de un nivel tolerable para el genotipo PI-240170, de *Cenchrus ciliaris* L. Esto bajo la consideración de los resultados reportado por Lerner (1985) y Binzel (1994) en células de tabaco adaptadas a elevadas concentraciones de NaCl y Vázquez-Duhalt et al. (1991) en células de garbanzo, quienes encontraron distintos mecanismos de protección de las membranas celulares, en elevadas concentraciones de NaCl, algunos de éstos relacionados con una menor



permeabilidad al incrementarse la relación hexosa/fosfato en los lípidos de las membranas, de lo cual se dedujo que dichos mecanismos se dieron en respuesta a procesos de haloadaptación.

**Cuadro 8.** Tasa relativa de crecimiento de células en base a peso fresco predicho para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión.

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)			
	0	60	120	180
6	0.042	0.039	0.038	0.039
12	0.056	0.049	0.047	0.052
18	0.088	0.059	0.053	0.089
24	0.015	0.158	0.144	0.027
30	0.287	0.198	0.154	0.138
36	-0.122	-0.098	-0.070	-0.054



**Figura 5.** Tasa relativa de crecimiento de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. para cuatro tratamientos de NaCl.

Para estimar la eficiencia del crecimiento, se calculó el tiempo de duplicación de células con base en los pesos frescos predichos de las suspensiones celulares bajo tratamientos de NaCl. Como se puede observar en el Cuadro 9, de los 6 a los 18 días después de la transferencia al medio de cultivo, las suspensiones para los tratamientos de NaCl, incluyendo el testigo presentaron una reducción gradual de los tiempos de duplicación de células. A los 6 días, éstos fueron relativamente altos, entre 16.5 y 18.2 días debido a la fase de retraso del crecimiento. Posteriormente se incrementaron a los 24 días, para declinar nuevamente a los 30 días. A los 24 días después de la transferencia al medio, los tratamientos intermedios correspondientes a 60 y 120 mM de NaCl tuvieron una considerable disminución, con promedios de 4.4 y 4.8 días, respectivamente por cada duplicación. En el muestreo, a los 30 días todos los tratamientos presentaron su menor tiempo de duplicación, el cual fluctuó entre 2.4 y 5 días, para luego entrar en una fase en la que prácticamente no hubo duplicación de células, por lo que en el último muestreo a los 36 días se tuvieron valores negativos en la tasa relativa de crecimiento, a la cual se ha hecho referencia anteriormente.

En la Figura 6 puede apreciarse el paralelismo existente entre las curvas de tiempo de duplicación celular, correspondientes a los tratamientos intermedios de sal (60 y 120 mM), en contraste con los tratamientos extremos (0 y 180 mM) a los 24 días de inoculación de las suspensiones celulares.

Lo anterior evidencia la respuesta adaptativa de las suspensiones celulares de PI-240170 de *C. ciliaris* L., la cual bajo niveles tolerables de NaCl, mostró buen comportamiento en su capacidad de multiplicación celular, lo que corrobora el hecho de haber seleccionado ésta accesión para la realización de los trabajos de selección de suspensiones celulares por tolerancia a NaCl.

Cuadro 9. Tiempos de duplicación de células en días en base a peso fresco predicho para cuatro tratamientos de NaCl en distintos períodos de crecimiento en suspensión.

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)			
	0	60	120	180
6	16.5	17.8	18.2	17.8
12	12.4	14.1	14.7	13.3
18	7.9	11.7	13.1	7.8
24	46.2	4.4	4.8	25.7
30	2.4	3.5	4.5	5.0
36	-----	-----	-----	-----

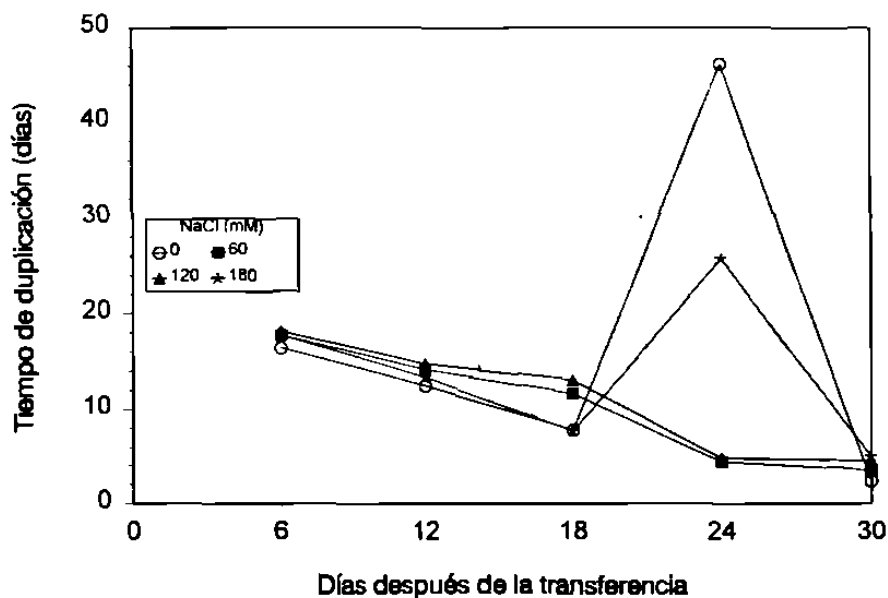


Figura 6. Tiempo de duplicación de células de *C. ciliaris* L. para cuatro tratamientos de NaCl, en distintos períodos de crecimiento en suspensión.

En el Cuadro 10 y la Figura 7 se presentan, respectivamente el número de duplicaciones celulares y sus tendencias por tratamiento de NaCl a través del ciclo de cultivo de las suspensiones celulares. Los números de duplicaciones celulares y sus tendencias, son acordes con el comportamiento de los parámetros anteriormente mencionados; al inicio el número de duplicaciones fue bajo en todos los tratamientos, fluctuando entre 0.33 y 0.36 duplicaciones, indicando la fase de retraso, después se incrementó hasta los 18 días fluctuando entre 0.46 y 0.77 duplicaciones y a partir de este tiempo hasta los 24 días tuvo una baja en los tratamientos testigo y de 180 mM de NaCl con 0.13 y 0.23 duplicaciones, respectivamente y un incremento en los tratamientos intermedios correspondientes a 60 y 120 mM a 1.37 y 1.25 duplicaciones, respectivamente. Posteriormente, en el tratamiento testigo alcanzó su mayor valor a los 30 días, con 2.48 duplicaciones seguido por 1.72, 1.33 y 1.20 duplicaciones para aquellos correspondientes a 60, 120 y 180 mM, respectivamente.

Lo anterior permite explicar que el peso fresco acumulado de células haya sido mayor para los tratamientos 60 y 120 mM de NaCl, ya que en éstos se dio por un período más amplio una mayor duplicación celular y en consecuencia, un mayor crecimiento de las suspensiones celulares en relación con los otros tratamientos. Al respecto, se ha considerado que bajo ciertos rangos de tolerancia de especies vegetales a la sal, se dan mecanismos que además del ajuste osmótico, permiten un incremento en la actividad de algunas enzimas, como en el zacate halófito *Distichlis spicata*, en el que la actividad de la enzima Leucina aminopeptidasa se incrementó bajo concentraciones de 180 mM de NaCl (Lerner, 1985). Aunque en ausencia total, o bajo concentraciones relativamente altas de NaCl en especies glicófitas con tendencia a manifestar hábitos halofíticos en algunos genotipos, el metabolismo de algunas enzimas puede verse limitado ocasionando con esto que una respuesta favorable bajo concentraciones moderadas de sal, se convierta en desfavorable cuando los límites de la tolerancia a este factor

de la especie que pueden ser determinados genéticamente son rebasados (Binzel, 1994; Lerner, 1985)

Cuadro 10. Número de duplicaciones de células en base a peso fresco predicho para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión.

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)			
	0	60	120	180
6	0.36	0.34	0.33	0.34
12	0.48	0.42	0.41	0.45
18	0.76	0.51	0.46	0.77
24	0.13	1.37	1.25	0.23
30	2.48	1.72	1.33	1.20
36	-----	-----	-----	-----

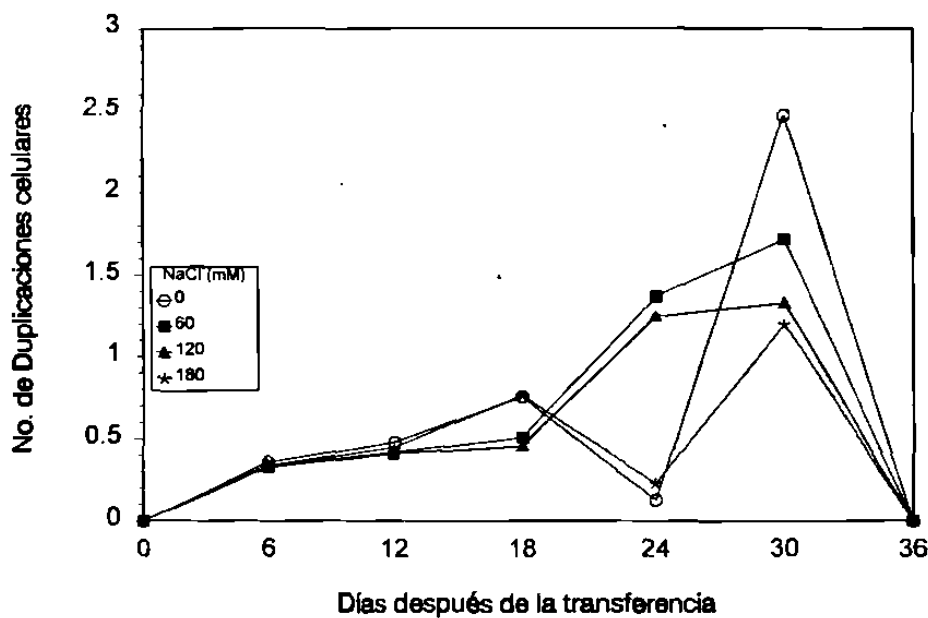


Figura 7. Número de duplicaciones de células de *C. ciliaris* L. para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión

En el Cuadro 11 se presentan los datos del índice de tolerancia (IT), durante el periodo de cultivo en suspensión de células, mediante el cual se determinó la respuesta de los cultivos celulares bajo condiciones de medio de cultivo salino en relación al testigo con medio de cultivo normal básico. El valor más alto de este índice fue alcanzado a los 24 días después de la transferencia celular, con 3136.4 y el más bajo a los 30 días con 1267.4.

CUADRO 11. Índices de tolerancia a NaCl de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. en distintos periodos de crecimiento

DIAS	6	12	18	24	30	36
IT	1889.5	1813.3	1644.6	3136.4	1267.4	1733.8

En la Figura 8 se puede apreciar que hasta los 18 días después de la inoculación, el índice de tolerancia a NaCl se mantuvo con poca variación en un rango de 1644.6 y 1889.5, elevándose a 3136.4 a los 24 días y disminuyendo posteriormente a 1267.4 y 1733.8 a 30 y 36 días, respectivamente. De acuerdo con dicho comportamiento, existe alguna similitud con los trabajos de Watad *et al.* (1985) en cultivos celulares de tabaco tratados con NaCl, quienes encontraron que el mayor grado de tolerancia, expresado como porcentaje del crecimiento del testigo sin sal se presentó en la fase exponencial, aunque con la diferencia que ésta se dio entre 9 y 12 días después de la transferencia celular al medio de cultivo en NaCl.

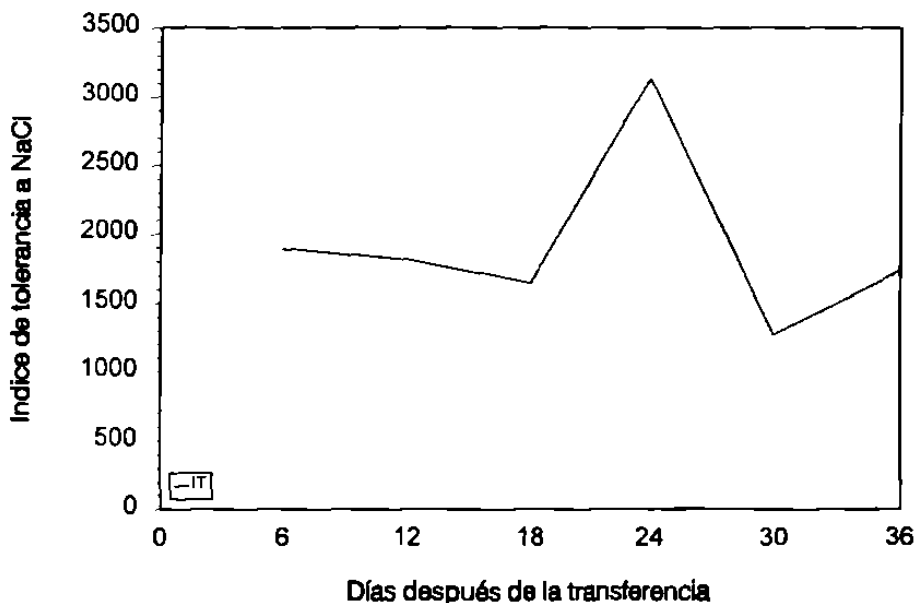


Figura 8. Índices de tolerancia a NaCl de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. en distintos períodos de crecimiento.

En el Cuadro 12 y la Figura 9 se presentan, respectivamente los resultados y tendencias para la variable porcentaje de viabilidad celular. Estos muestran que al inicio del ciclo de cultivo, durante la fase de retraso del crecimiento, el porcentaje tendió a disminuir hasta los 12 días después de la transferencia celular a los medios de cultivo, excepto para el tratamiento correspondiente a 180 mM de NaCl en el que dicha disminución se prolongó hasta los 18 días. A partir de estos períodos de muestreo dicha variable tendió a incrementarse hasta los 30 días en los tratamientos testigo y 60 mM de NaCl y posteriormente disminuyó. En cambio en los tratamientos de 120 y 180 mM el incremento del porcentaje de viabilidad celular continuó.

El análisis de varianza para esta variable se presenta en el Cuadro 12A, en el cual se observan diferencias significativas entre los días de muestreo. Al efectuar la comparación de medias, en el Cuadro 12 se observan valores mas altos de 66.4 y 69.9 %, para 30 y 36 días, después de la transferencia a los medios de cultivo, respectivamente, siguiendo en el mismo orden las medias a los 24, 18, 6 y 12 días, con 57.4, 53.6, 48.8 y 41.6 %, respectivamente.

Cuadro 12. Viabilidad de células (%) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)				$\bar{X}$
	0	60	120	180	
6	42.7	53.1	48.9	50.4	48.8cd
12	35.8	38.1	48.3	44.4	41.6d
18	65.4	56.9	55.9	36.2	53.6c
24	64.8	57.1	50.9	59.9	57.4bc
30	72.2	72.2	60.2	61.2	66.4ab
36	68.2	69.0	68.6	73.8	69.9a
$\bar{X}$	58.2	57.7	55.5	53.8	56.3

Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.05)

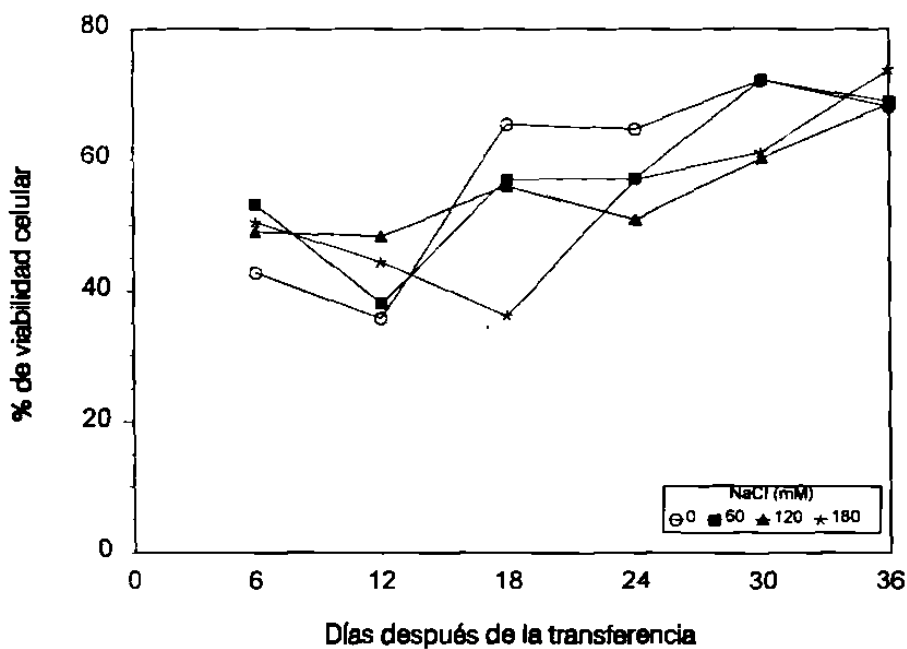


Figura 9. Viabilidad de células de *C. ciliaris* L. para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión.



#### 4.2.2.2. Caracterización por peso seco

De acuerdo con los datos de peso seco observados en el Cuadro 13, la fase de retraso en todos los tratamientos se prolongó hasta los 24 días, y a partir de entonces se presentó la fase exponencial. en la cual las suspensiones celulares correspondientes a los tratamientos testigo, 60 y 180 mM alcanzaron su máximo crecimiento, con 1285, 882 y 589 mg  $30\text{ml}^{-1}$ , respectivamente; en cambio el tratamiento correspondiente a 120 mM de NaCl continuó en la fase exponencial hasta los 36 días en que alcanzó un peso seco de 1098 mg  $30\text{ml}^{-1}$ .

En el Cuadro 13A se observan diferencias significativas entre los días de muestreo para el peso seco de células (mg  $30\text{ml}^{-1}$ ). La comparación de medias para ésta variable se da en el Cuadro 13, en el cual se definió que los valores significativamente mas altos se presentaron a los 30 y 36 días, con 846.3 y 765.0 mg  $30\text{ml}^{-1}$  de peso seco, respectivamente.

En las Figuras 10 y 11 puede apreciarse el comportamiento de las suspensiones celulares bajo los tratamientos de NaCl, para el peso seco observado y predicho, respectivamente. donde el paralelismo de las curvas que representan los tratamientos de NaCl es evidente en la fase de retraso, para continuar con la fase exponencial, a una tasa de crecimiento distinta, lo cual podría atribuirse a que dicha fase se caracteriza por una alta división celular. Sin embargo, las tendencias de incremento en peso fresco a partir de los 18 días para los tratamientos intermedios de sal que se observaron en las Figuras 3 y 4 no se manifestaron para peso seco, como se aprecia en las Figuras 10 y 11, lo cual indica por una parte la presencia del mecanismo de ajuste osmótico en dichas suspensiones, como resultado de la ganancia en peso fresco por hidratación y por otra parte, a que al inicio de la multiplicación, un alto porcentaje de las células nuevas está constituido por agua, que al perderse por efecto del secado permite obtener solamente el peso de los sólidos, el cual representa el crecimiento celular real que

efectivamente se dio a partir de los 24 días y no a partir de los 18, como se podría interpretar con los datos de peso fresco.

Cuadro 13. Peso seco observado de células ( $\text{mg } 30 \text{ ml}^{-1}$ ) para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)				$\bar{X}$
	0	60	120	180	
6	91	44	75	58	67.2b
12	126	126	150	219	155.2b
18	63	101	117	66	86.8b
24	66	76	58	36	59.2b
30	1285	882	629	589	846.3a
36	920	793	1098	249	765.0a
$\bar{X}$	425.2	337.2	354.6	202.9	33.0

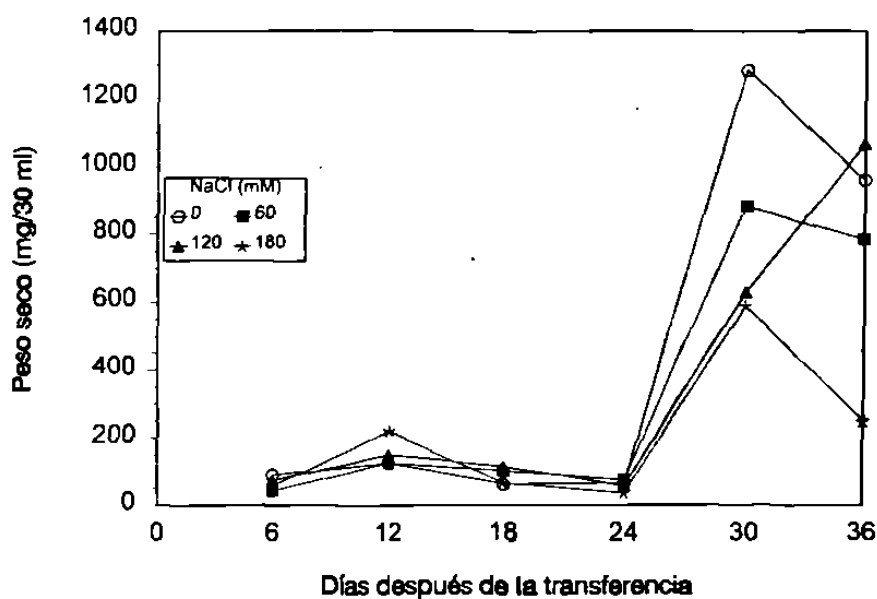


Figura 10. Comportamiento del crecimiento en peso seco observado de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. en distintos tratamientos de NaCl.

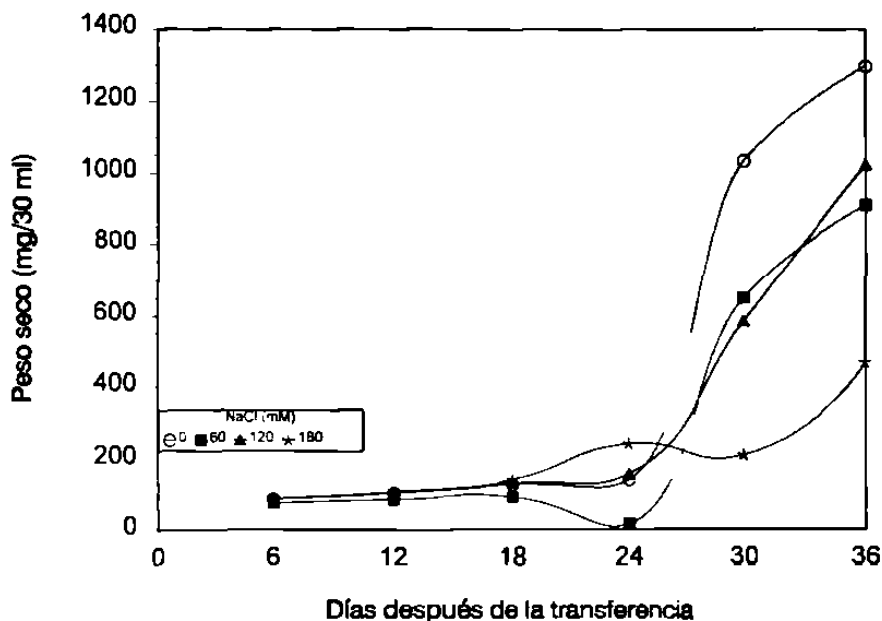


Figura 11. Crecimiento en peso seco predicho de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. en cuatro tratamientos de NaCl.

En el Cuadro 14 se presentan los valores promedio de la relación peso fresco/peso seco. Se puede observar que de 6 a 12 días después de la transferencia de células a los medios de cultivo disminuyó en valores promedio de 11.151 a 5.772, para posteriormente incrementarse a 23.469 a los 24 días y declinar a 7.017 a los 30 días. En el muestreo a los 24 días después de la transferencia, el tratamiento correspondiente a 120 mM de NaCl mostró el valor promedio más alto con 41.02 mg de peso fresco por mg de peso seco, seguido en este orden por 18.12, 17.93 y 16.81 mg de PF  $\text{mg}^{-1}$  de PS para 0, 60 y 180 mM de NaCl, respectivamente, lo cual es indicativo de la etapa de mayor intensidad multiplicativa de células, así como una mayor acumulación de agua dentro de las mismas por efecto del proceso de osmorregulación. Con excepción del tratamiento correspondiente a 120 mM, el comportamiento de los tratamientos para este parámetro fue muy similar durante el transcurso del cultivo en suspensión. En general, en la Figura 12 se aprecia que después de los 24 días de inoculación fue notoria una disminución en la relación PF/PS, posiblemente a causa de una disminución en la multiplicación de células y en

consecuencia, un incremento en el tamaño de las mismas, acompañado de un incremento de los sólidos intracelulares que podrían marcar el inicio de una fase de desaceleración progresiva.

Respecto a los valores promedio para las niveles de NaCl, los más altos fueron para 60 mM y 120 mM, con 12.133 y 12.665, respectivamente, mientras que el testigo y 180 mM de NaCl tuvieron 9.374 y 10.075 unidades de peso fresco por unidad de peso seco.

Cuadro 14. Relación (promedio) de Peso fresco/Peso seco de células para cuatro tratamientos de NaCl en distintos periodos de crecimiento en suspensión.

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)				$\bar{X}$
	0	60	120	180	
6	8.527	16.023	9.053	11.000	11.151
12	7.460	6.873	4.313	4.443	5.772
18	9.762	13.802	8.367	10.167	10.525
24	18.121	17.934	41.017	16.805	23.469
30	7.586	10.552	7.981	7.628	8.437
36	4.786	7.616	5.262	10.406	7.017
$\bar{X}$	9.374	12.133	12.665	10.075	

Alvarado *et al.* (1991) observaron resultados similares en cultivos de células en suspensión de quinua, sometidos a tratamientos de NaCl en un rango de 0 a 204 mM. Al respecto, estos autores propusieron que la reducción de PF/PS en la primera fase de la curva de crecimiento pudo ser a causa de la deshidratación de las células ocasionada por los gradientes de potencial osmótico entre las células y el medio de cultivo al momento de la siembra, en tanto que los valores máximos alcanzados en la fase exponencial en el tratamiento correspondiente a 68 mM de NaCl aplicado por estos autores, se dieron por una mayor capacidad de osmorregulación. La quinua, por otra parte, es una especie que presenta algún grado de

tolerancia a la salinidad según estos autores, por lo que al comparar los patrones de las suspensiones celulares de ésta especie, con los correspondientes a los del genotipo de zacate buffel de este estudio, sería factible concluir que también presenta hábitos de haloadaptación.

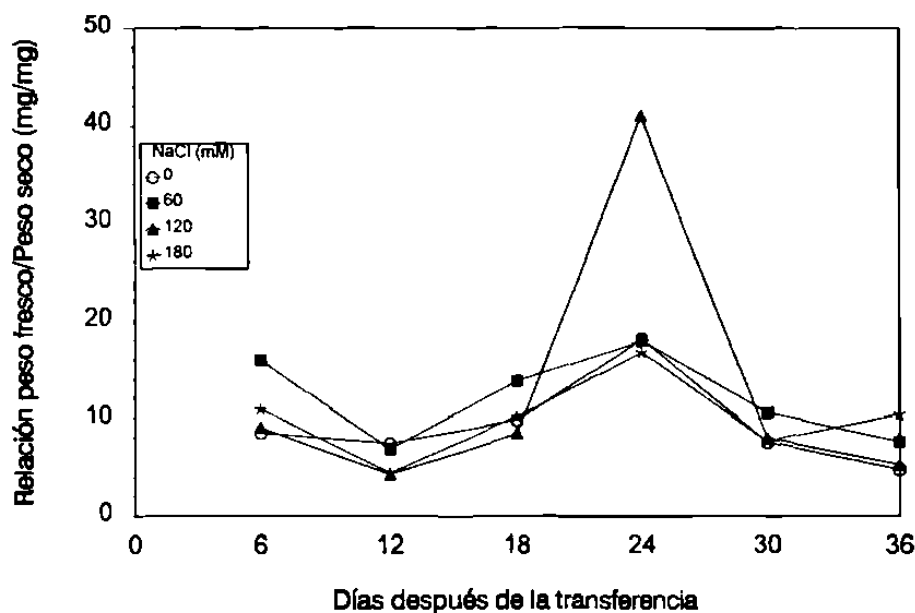


Figura 12. Relación peso fresco/peso seco de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. bajo cuatro tratamientos de NaCl.

En el Cuadro 15 se observa que la mayor variación en las tasas relativas de crecimiento de las suspensiones celulares en base a peso seco a través de los muestreos se presentó para el tratamiento correspondiente a 60 mM de NaCl, en el que a los 24 días fue negativa, alcanzando el valor mínimo de -0.297 y posteriormente alcanzando el valor máximo promedio de 0.625 a los 30 días. En el resto de los tratamientos éste parámetro presentó mas uniformidad, ya que de los 12 hasta los 24 días la fluctuación fue de 0.018 a 0.033, 0.030 a 0.036 y 0.034 a 0.090 para las suspensiones en medios con 0, 120 y 180 mM, respectivamente. A partir de los 24 días, se dio un incremento para los tratamientos correspondientes al testigo y 120 mM de NaCl, los cuales alcanzaron los valores promedio máximos de 0.333 y 0.219, respectivamente. en cambio,

para el tratamiento de 180 mM dicho parámetro se mantuvo con tasas de crecimiento bajas, las cuales tendieron a disminuir aun más a partir de los 24 días después de la transferencia celular al medio.

En lo que respecta a los valores promedio para fechas de muestreo, se alcanzó el valor máximo a los 30 días después de la transferencia celular a los medios de cultivo y para los tratamientos de NaCl, incluyendo el testigo los valores presentaron poca variación.

Cuadro 15. Valores promedio de Tasa Relativa de Crecimiento en base a peso seco predicho de suspensiones celulares de *C. Ciliaris* L. en cuatro tratamientos de NaCl.

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl				$\bar{X}$
	0	60	120	180	
6					
12	0.030	0.022	0.032	0.034	0.029
18	0.033	0.011	0.036	0.045	0.031
24	0.018	-0.297	0.030	0.090	-0.040
30	0.333	0.625	0.219	-0.022	0.289
36	0.038	0.056	0.094	0.133	0.080
$\bar{X}$	0.090	0.083	0.082	0.056	

En la Figura 13 se presenta el comportamiento de las tasas relativas de crecimiento en base al peso seco en los distintos tratamientos; con excepción del correspondiente a 60 mM de NaCl, estas tasas arrojan resultados similares a los obtenidos para peso fresco y los parámetros derivados de éste. Respecto al tratamiento de 60 mM de NaCl, es probable que el período inicial de estrés, haya propiciado la manifestación del carácter de tolerancia a bajas concentraciones de sal del genotipo estudiado, lo cual se reflejó en una rápida división celular y la más alta tasa

relativa de crecimiento poco antes de finalizar su ciclo de crecimiento en suspensión, esto es, entre los 24 y 30 días después de la transferencia celular a los medios de cultivo.

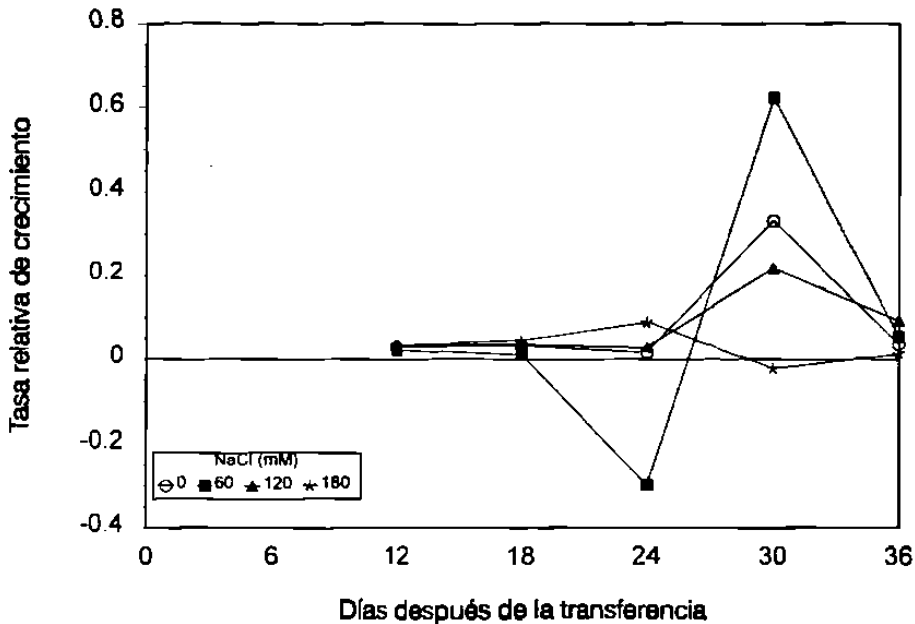


Figura 13. Tasa relativa de crecimiento en base a peso seco de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. en cuatro tratamientos de NaCl.

En el Cuadro 16, se puede observar para los valores promedio generales de potencial hídrico correspondientes a las fechas de muestreo, que a los 6 días después de la transferencia celular a los medios de cultivo se observó el valor más alto de potencial hídrico con -12.04 bars, disminuyendo a los 12 días y manteniéndose con poca variación posteriormente y para los niveles de NaCl este parámetro disminuyó conforme se incrementó la concentración de NaCl, de tal forma que para el testigo se observó el promedio menos negativo con -7.75, en tanto que el nivel de 180 mM de NaCl presentó el más negativo

**Cuadro 16. Potencial hídrico observado (bars) de suspensiones celulares bajo cinco cinco tratamientos de NaCl en distintos períodos del crecimiento (sin repeticiones)**

DIAS	CONCENTRACION DE NaCl (mM)				$\bar{X}$
	0	60	120	180	
6	-8.59	-10.42	-13.54	-15.62	-12.04
12	-8.07	-9.63	-9.89	-11.46	-9.76
18	-8.33	-9.37	-14.06	-9.37	-10.28
24	-11.46	-13.02	-14.32	-16.66	-13.87
30	-5.30	-9.63	-12.85	-14.57	-10.59
36	-4.75	-7.16	-10.35	-12.15	-8.60
$\bar{X}$	-7.75	-9.87	-12.50	-13.31	

En la Figura 14 se observa que los valores más bajos de potencial hídrico para todos los tratamientos se dieron a los 24 días después de la transferencia celular a los medios de cultivo.

Se puede observar una relación del potencial hídrico en la Figura 14, con el crecimiento, expresado como peso seco en la Figura 10 antes considerada, ya que hasta los 24 días en que se registró un mayor estrés hídrico, las suspensiones celulares se mantuvieron en la fase de retraso y a partir de ésta fecha de muestreo dio inicio la fase exponencial del crecimiento. De acuerdo con López (1984), quien trabajó con suspensiones celulares de distintos genotipos de tomate bajo tratamientos de NaCl (0, 4, 8 y 12  $g\ l^{-1}$ ), los patrones observados en cuanto al comportamiento del potencial hídrico durante un período de 24 días, mostraron un incremento a medida que avanzó el tiempo, de tal forma que al inicio del cultivo se dieron los valores menores y al final de éste los mayores. Lo anterior, tiene similitud con los resultados obtenidos para el genotipo de zacate buffel estudiado en este caso, con la diferencia que en éste último, se presentó una marcada disminución en los valores de dicho potencial a los 24 días, la cual podría



estar influenciada por el término de la fase de retraso, en que pudo haberse llevado a cabo un *preacondicionamiento* de las células al medio salino; durante ésta etapa pudo haberse dado poca absorción de iones al interior de las células, para posteriormente en la fase intensiva de multiplicación de éstas, llevarse a cabo la absorción de iones para iniciar la osmorregulación. El testigo mostró los valores menos negativos de potencial hídrico durante todo el período de cultivo en suspensión.

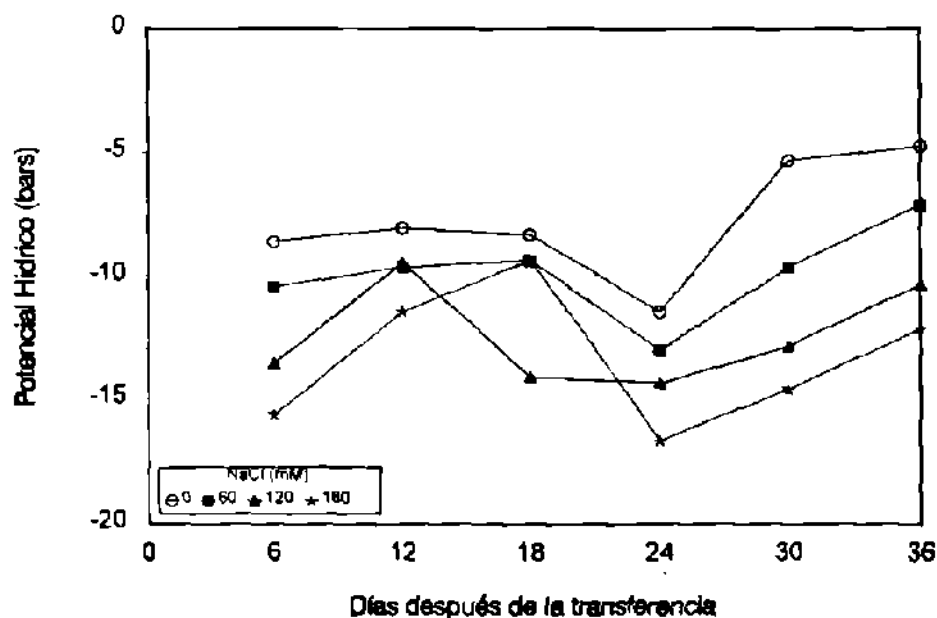


Figura 14. Potenciales hídricos de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. en cuatro tratamientos de NaCl.

#### 4.2.3. Selección de suspensiones celulares

##### 4.2.3.1. Selección por peso fresco

Bajo la consideración de que los pretratamientos de 0, 60, 120 y 180 mM de NaCl, ejercerían una presión de selección creciente para obtener tolerancia a salinidad, medida a

través del crecimiento celular durante 36 días y que estas suspensiones celulares en subcultivo posterior en el medio de cultivo salino de mayor concentración (180 mM de NaCl) permitiría la selección final de aquellas suspensiones celulares tolerantes a NaCl, se procedió en consecuencia al respecto.

En el Cuadro 14A, se presenta el análisis de varianza para peso fresco de células (g 30ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L. en cuatro periodos de muestreo y cinco pretratamientos de NaCl, para selección, se puede apreciar que se detectó diferencia significativa para las fechas de muestreo, niveles de NaCl y la interacción correspondiente, por lo que. se procedió a hacer la comparación de medias, la cual se da en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Pesos frescos observados de células (mg 30 ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L. en una concentración de NaCl (180 mM). pretratadas previamente con NaCl en distintas concentraciones

Tratamiento	DIAS DESPUES DEL SUBCULTIVO				$\bar{X}$
	7	14	21	49	
0/0	730	679	1012	1786 b	1052.0bc
0/180	811	348	739	1666 b	891.2c
60/180	574	613	1282	4059a	1632.4ab
120/180	998	1052	1920	3924a	1973.6a
180/180	565	456	486	678 b	546.4c
$\bar{X}$	736.0b	629.7b	1087.9b	2422.8a	1219.1

Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.05)

En virtud de que la interacción entre días de muestreo y pretratamientos fue significativa, se procedió a la comparación de las 20 medias de tratamientos resultantes de la combinación entre los cinco pretratamientos de NaCl y los cuatro periodos de muestreo. Se puede apreciar que los pretratamientos de 60/180 y 120/180 a los 49 días de crecimiento celular,

presentaron estadísticamente los valores más altos de peso fresco, respecto al resto de los pretratamientos, siendo estadísticamente iguales entre sí. Esto puede interpretarse en el sentido de que estos pretratamientos permitieron la mayor selección de la variación somaclonal presente en las suspensiones celulares, originada durante el cultivo *in vitro*. Tomando en cuenta que la media del pretratamiento 60/180 sobre los días de muestreo fue estadísticamente igual al testigo, por lo que se asumiría que no hubo selección, se puede establecer que el valor de  $1632.4 \text{ mg } 30\text{ml}^{-1}$  de peso fresco del pretratamiento 60/180 fue reducido al considerar el promedio de éste pretratamiento a través de los muestreos; sin embargo, al considerar éste pretratamiento con el peso fresco acumulado hasta el último muestreo a 49 días del subcultivo celular, se pudo observar que presentó el valor más alto de peso fresco, con  $4059 \text{ mg } 30\text{ml}^{-1}$ , el cual presentó diferencia respecto al peso fresco del testigo, con  $1786 \text{ mg } 30\text{ml}^{-1}$  en la misma fecha de muestreo. Dicha diferencia fue de  $2273 \text{ mg } 30\text{ml}^{-1}$ , la cual fue significativa, representando este valor la máxima ganancia genética o epigenética para la tolerancia a NaCl por selección *in vitro*, respecto de la ganancia de  $2183 \text{ mg } 30\text{ml}^{-1}$  de peso fresco obtenida al comparar el pretratamiento de 120/180 respecto al testigo a los 49 días después del subcultivo.

En la Figura 15 se puede apreciar que hasta los 49 días, las suspensiones celulares, con excepción de aquella correspondiente al tratamiento 180/180 presentaron crecimiento en peso fresco, observándose que los pretratamientos de 60/180 y 120/180 fueron los que presentaron los valores máximos de ésta variable a los 49 días; sin embargo, el pretratamiento de 60/180 a partir de los 14 días después del subcultivo presentó una respuesta de tipo lineal, lo cual no ocurrió para el pretratamiento de 120/180, esto implica que el peso fresco de 60/180 pudo haberse incrementado aun más en un muestreo posterior, ocasionando una mayor diferencia con 120/180. Los resultados en crecimiento de las suspensiones celulares pretratadas con distintos niveles de NaCl y suspensiones sin pretratamiento, subcultivadas después en medio salino

uniforme que se han discutido en base al Cuadro 17 y la Figura 15, coinciden con los obtenidos en estudios realizados por diversos investigadores; por ejemplo, Croughan *et al.* (1981) observaron en líneas celulares de alfalfa y arroz seleccionadas por tolerancia a salinidad, pobre crecimiento en ausencia de sal y mejor crecimiento en presencia de ésta. En alfalfa, Croughan *et al.* (1978) obtuvieron un crecimiento cuatro veces mayor para líneas seleccionadas, en comparación con aquellas no seleccionadas; Por su parte, Watad *et al.* (1985) también encontraron en tabaco, que líneas adaptadas a la salinidad (NaCl) cultivadas gradualmente en medios menos salinos tuvieron mejor crecimiento y rendimiento que líneas originales no seleccionadas.

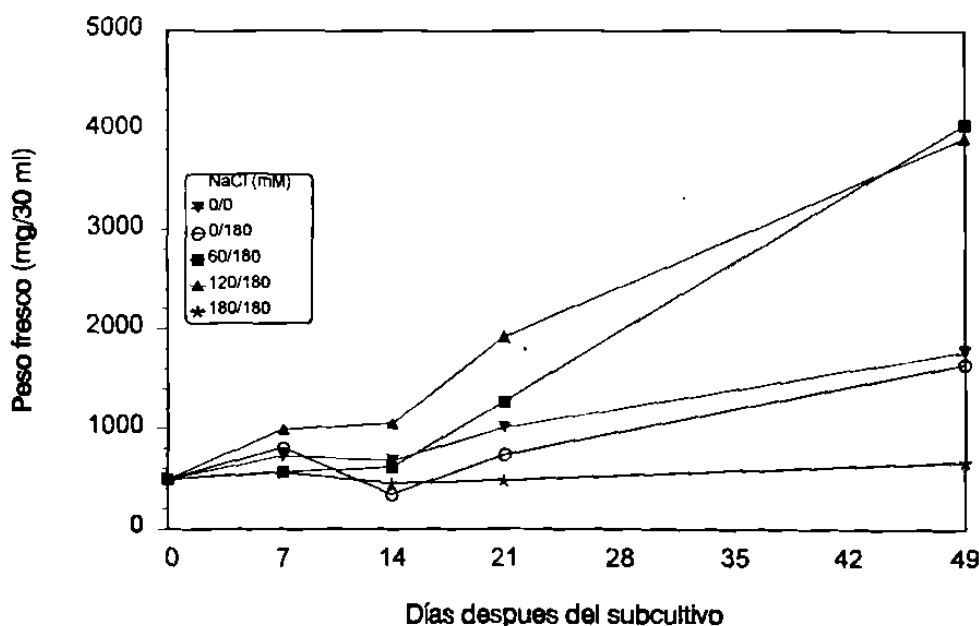


Figura 15. Crecimiento en peso fresco observado de suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. en 180 mM de NaCl, pretratadas con distintas concentraciones de NaCl.

#### 4.2.2.2. Selección por peso seco

En el Cuadro 18 se presentan los resultados para la variable peso seco de las suspensiones celulares pretratadas en distintos niveles de NaCl y posteriormente sometidas a la concentración más alta de los pretratamientos aplicados (180 mM de NaCl). Se observó que el testigo (no pretratado y libre de sal) a los siete días después del subcultivo presentó el valor promedio más alto, mientras que las suspensiones pretratadas con 60 y 120 mM presentaron durante el resto del período de cultivo un mayor crecimiento, especialmente las del tratamiento de 120 mM, en el que a los 21 días después de la inoculación se presentó el valor promedio más alto que fue de 442 mg 30ml<sup>-1</sup> de peso seco. Se detectaron diferencias altamente significativas (Cuadro 15A) entre medias correspondientes a los pretratamientos de NaCl, días de muestro y la interacción. En cuanto a los pretratamientos considerados para este ensayo las medias más altas correspondieron a 60/180 y 120/180 mM de NaCl, con 209.1 y 267.6 mg 30ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

Cuadro 18. Pesos secos observados de células (mg 30 ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L. en una concentración de NaCl (180 mM) pretratadas previamente con NaCl en distintas concentraciones.

Tratamiento	DIAS DESPUES DEL SUBCULTIVO				$\bar{X}$
	7	14	21	49	
NaCl (mM)					
0/0	133	175	118	198	156.0bc
0/180	56	155	72	163	111.7c
60/180	70	203	231	331	209.1ab
120/180	79	289	442	258	267.6a
180/180	41	124	39	135	84.7c
$\bar{X}$	76.2b	189.3a	180.5a	217.4a	

Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.05)

Con respecto a los resultados fechas de muestreo, los valores más altos fueron los que correspondieron a 49, 14 y 21 días con 217.4, 189.3 y 180.5 mg 30ml<sup>-1</sup>, respectivamente, resultando iguales entre éstos, pero diferentes al correspondiente a los 7 días después de inoculación, con 76.2 mg.30 ml<sup>-1</sup> de peso seco.

Por otra parte se puede apreciar en la Figura 16 que para los tratamientos testigo, 0/180 y 180/180, se presentó un corto período de acumulación de biomasa, ya que las curvas para éstos muestran ganancia en peso hasta los 14 días. Después de los cuales hubo una disminución en biomasa hasta los 21 días, para seguir con una tendencia lineal con baja tasa de crecimiento, posiblemente a causa de deficiencias en el ajuste osmótico de las suspensiones. En el tratamiento 120/180 el incremento continuó hasta los 21 días a partir del cual disminuyó su comportamiento a los 49 días, en lo que se puede considerar el término de su ciclo de cultivo en suspensión. Para el caso del tratamiento 60/180, el incremento continuó hasta los 49 días,

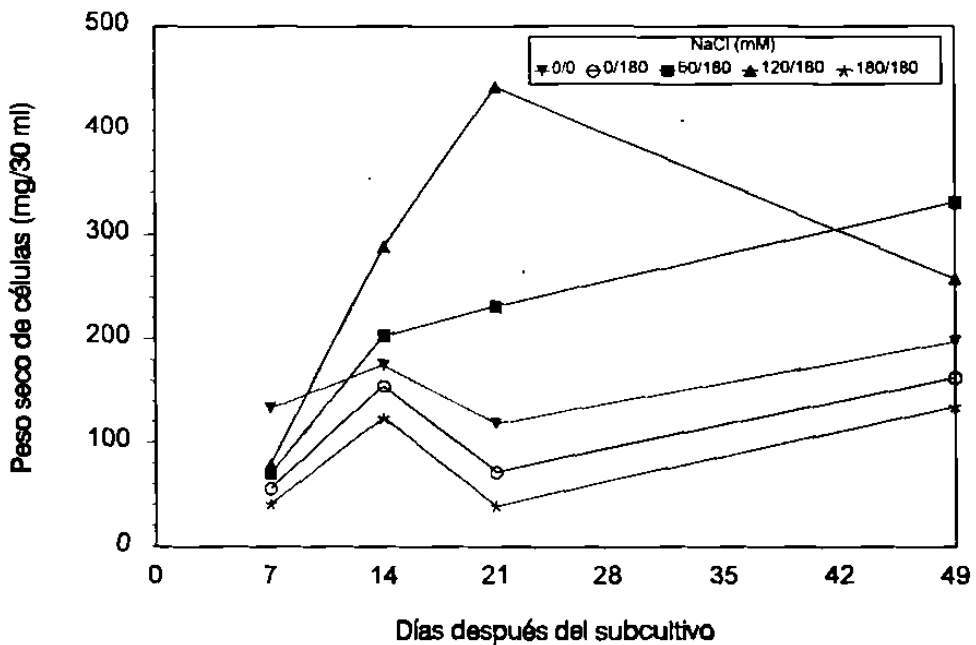


Figura 16. Comportamiento del crecimiento en peso seco observado de células de *C. ciliaris* L. en 180 mM de NaCl, pretratadas con distintas concentraciones de NaCl durante su ciclo de cultivo en suspensión

cuando se realizó la cosecha y el **plaqueo de las suspensiones seleccionadas, que se eligieron por mayor densidad celular de entre las correspondientes a los matraces con tratamientos de 60/180 y 120/180, a las que se consideró como líneas celulares 1 y 2, respectivamente.**

#### 4.2.2.3. Selección por viabilidad

En cuanto a la viabilidad observada, en el Cuadro 16A se aprecia que no se detectaron diferencias estadísticas entre las medias de los factores correspondientes a **fechas de muestreo y pretratamientos de NaCl aplicados en este ensayo. En el Cuadro 19 puede observarse en las medias para las fechas de muestreo, que la viabilidad presentó un incremento de 44.8 a 52.0 % de 7 a 14 días, respectivamente, después del subcultivo, para después disminuir a 49.8 % a los 21 días e incrementarse nuevamente a 54.7 % a los 49 días. Respecto a los pretratamientos, tendió a tener un porcentaje mayor en el testigo (no pretratado y libre de sal), alcanzando un valor promedio de 58.0% y para los niveles restantes tuvo una mínima fluctuación, entre 45.5 y 50.7 %. En la Figura 17 se aprecia que en todos los tratamientos se presentó una tendencia inicial de incremento hasta los 14 días. Los tratamientos testigo, 60/180 y 120/180, presentaron una disminución a partir de esta fecha de muestreo hasta los 21 días. Posteriormente volvieron a incrementar los valores a los 49 días, mientras que en los tratamientos 0/180 y 180/180) el incremento inicial de viabilidad se prolongó a 21 días, a partir de lo cual el primero permaneció prácticamente sin cambio hasta el término del periodo considerado y el segundo tendió a disminuir.**

Aparentemente, la viabilidad observada en este caso no fue factor importante en las variaciones de peso fresco y peso seco de las suspensiones celulares bajo un alto nivel de NaCl, ya que mientras ésta se mantuvo relativamente estable, los pesos seco y fresco para los

tratamientos 0/180 y 180/180 fueron los más bajos a los 21 días del subcultivo. De lo anterior se puede deducir que el factor que más pudo haber influido sobre dichas variables fue el tamaño celular observado que en células sin precondicionamiento en ambiente salino (tratamiento 0/180) fue menor que en aquellas con dicho precondicionamiento. Por otro lado el tratamiento 180/180 tuvo un comportamiento muy similar al 0/180 tanto en peso fresco como en peso seco y viabilidad, lo cual podría hacer suponer que las suspensiones que fueron pretratadas con 180 mM de NaCl no recuperaron su capacidad de crecimiento.

En observaciones realizadas al microscopio, fue notorio el predominio de células de forma esférica y tamaño relativamente pequeño para las suspensiones celulares cultivadas en medios con las mayores concentraciones de NaCl, en contraste con células de forma alargada y mayor tamaño en las suspensiones del testigo no pretratado y libre de sal. Al Respecto, Hasegawa (1986) considera que la presencia de células de menor tamaño bajo condiciones salinas, puede representar una contribución para la tolerancia a la salinidad, ya que éstas podrían tener menor demanda de energía que las células de mayor tamaño.

Cuadro 19. Porcentajes de Viabilidad de células observados en suspensiones celulares de *C. ciliaris* L. pretratadas en distintos niveles de NaCl y subcultivadas para selección en medio de cultivo con 180 mM de NaCl.

Tratamiento	DIAS DESPUES DEL SUBCULTIVO				$\bar{X}$
	7	14	21	49	
NaCl (mM)					
0/0	59.0	62.4	48.8	61.8	58.0
0/180	37.3	47.6	53.7	53.6	48.0
60/180	39.6	46.9	37.9	57.8	45.5
120/180	40.7	51.0	48.7	56.9	49.3
180/180	47.4	51.8	60.2	43.6	50.7
$\bar{X}$	44.8	52.0	49.8	54.7	50.3



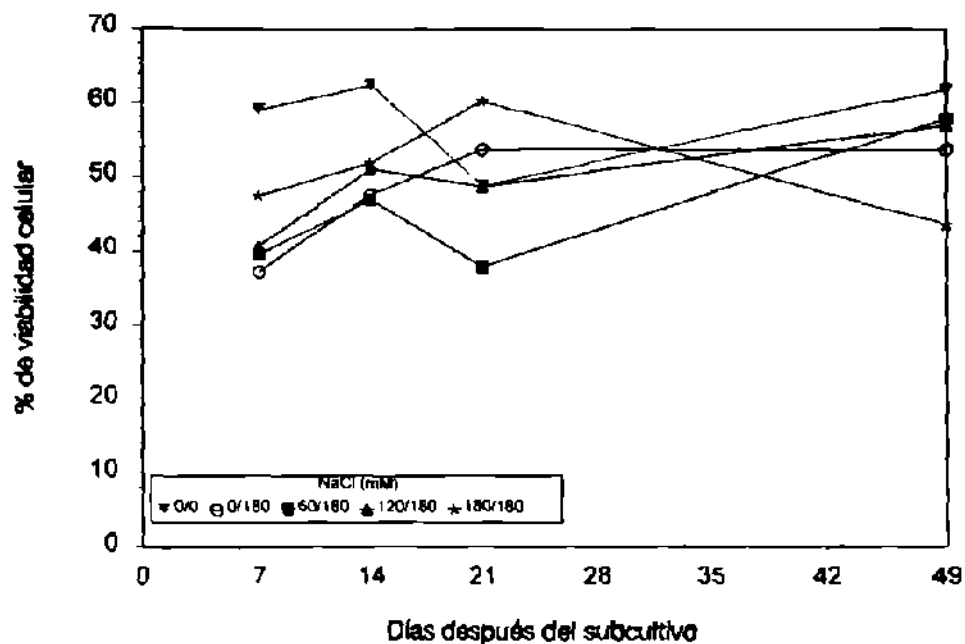


Figura 17. Comportamiento de la viabilidad observada de células de *C. ciliaris* L. en 180 mM de NaCl, pretratadas con distintas concentraciones de NaCl durante su crecimiento en suspensión.

Por lo anterior, puede considerarse para el presente estudio que el porcentaje de viabilidad no tuvo efecto en el progreso logrado por selección. en los pretratamientos de 60/180 y 120/180, tanto para peso fresco como para peso seco, por lo que en la selección final de las líneas celulares, fue posible proceder con los resultados de peso fresco, peso seco y los parámetros derivados de éstos

#### 4.3. Validación de la tercera hipótesis

##### 4.3.1. Estabilidad de la tolerancia a NaCl en agregados celulares de suspensiones seleccionadas

Los resultados obtenidos, permitieron establecer las líneas celulares denominadas  $L_1$ ,  $L_2$  y  $L_0$ , respectivamente, para subcultivos seleccionados de las suspensiones celulares

correspondientes a los pretratamientos 60/180 y 120/180 y el testigo (0/0), las cuales se sembraron en medio sólido con 0, 80, 160 y 240 mM de NaCl para evaluar la estabilidad para tolerancia a la sal en cuanto a peso fresco, después de un período de crecimiento de agregados celulares de seis semanas.

En el Cuadro 17A se presenta el análisis de varianza para el peso fresco de agregados celulares, en el que se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos probados constituidos por las combinaciones de las líneas celulares y las distintas concentraciones salinas.

En cuanto al efecto de los factores, en el Cuadro 20 se pueden observar los valores promedio tanto para las líneas celulares, como para los niveles de NaCl aplicados. En cuanto a las líneas celulares, el testigo ( $L_0$ ) proveniente de suspensiones y agregados celulares cultivados en medio libre de sal, fue superior estadísticamente a las líneas  $L_1$  y  $L_2$ , seleccionadas de suspensiones celulares cultivadas en medio con 60 y 120 mM de NaCl. Las medias de peso fresco a seis semanas después del subcultivo con 0.5 g de agregados celulares para  $L_0$ ,  $L_1$  y  $L_2$  fueron 2.903, 0.832 y 0.956 g, respectivamente. Las líneas  $L_1$  y  $L_2$  fueron estadísticamente iguales. Respecto a los niveles de salinidad, también se detectaron diferencias altamente significativas entre las medias de tratamientos y en este caso, el testigo con 2.503 g de peso fresco superó a los restantes con medias de 1.877, 1.117 y 0.758 g de callo respectivamente para 80, 160 y 240 mM de NaCl (Cuadro 20)

Se detectaron también diferencias estadísticas para la línea  $L_0$  en los diferentes niveles de salinidad, de manera que el testigo (0 mM de NaCl) mostró el promedio de peso fresco mas alto con 5.068 g, reduciéndose proporcionalmente conforme se incrementó la salinidad. Para  $L_1$  y  $L_2$  no se detectaron diferencias significativas a medida que variaron los niveles de sal. Respecto a la variación entre líneas por nivel de sal probado, se detectaron diferencias altamente

significativas para el testigo (sin sal) y el correspondiente a 80 mM de NaCl, en las diferentes líneas, de forma que  $L_0$  mostró superioridad sobre las dos restantes que resultaron iguales entre sí estadísticamente. Para el nivel de 160 mM de NaCl se detectaron diferencias significativas, con superioridad también de la línea testigo sobre las restantes y para el nivel de 240 mM de NaCl no hubo diferencias estadísticas entre líneas.

De lo anteriormente expuesto, puede deducirse que existe la tendencia de las líneas seleccionadas ( $L_1$  y  $L_2$ ) a mostrar mayor estabilidad de rendimiento en peso fresco de callo en distintos niveles de NaCl, ya que mientras que la línea testigo ( $L_0$ ), no cultivada previamente en medio salino, manifestó un alto potencial de rendimiento en condiciones normales y presentó un rendimiento inversamente proporcional al incremento en la concentración de sal, el crecimiento de las líneas seleccionadas  $L_1$  y  $L_2$  fue relativamente bajo en ausencia de sal, pero prácticamente no presentaron variación al incrementarse los niveles de NaCl. Esto coincide con los resultados obtenidos por Croughan *et al.* (1981), quienes observaron mejor crecimiento en presencia de sal que en ausencia de ésta para líneas de alfalfa y arroz seleccionadas por tolerancia a NaCl; así como también con los obtenidos por Watad *et al.* (1985), respecto a que el crecimiento de líneas celulares de tabaco adaptadas a salinidad, fue 20 % menor a aquellas no adaptadas, cuando ambas se cultivaron en medio libre de sal, pero después de un ciclo de cultivarlas en medio salino nuevamente recuperaron su crecimiento y las diferencias observadas desaparecieron.

Cuadro 20. Peso fresco de agregados celulares (g) para tres líneas celulares de *C. ciliaris* L. en cuatro tratamientos de NaCl a seis semanas de la transferencia a cajas petri.

Líneas Celulares	Variable	CONCENTRACIONES DE NaCl (mM)				$\bar{X}$
		0	80	160	240	
L0	P. F.	5.068	3.394	2.132	1.020	2.903a
	% RED	0	33.03	57.93	79.87	42.71
L1	P. F.	1.048	1.014	0.602	0.664	0.832b
	% RED	0	3.24	42.56	36.64	20.61
L2	P. F.	1.392	1.224	0.618	0.592	0.956b
	% RED	0	12.07	55.60	57.47	31.28
$\bar{X}$	P. F.	2.503a	1.877ab	1.117bc	0.758c	
	% RED	0	16.11	52.03	57.99	

En el Cuadro 20 se presentan los porcentajes de reducción de peso fresco de agregados celulares, calculados con las medias que aparecen en el interior de este cuadro con base en un testigo por línea en medio de cultivo sin sal (0 mM de NaCl), con la finalidad de evidenciar el hecho de que la línea testigo redujo en mayor proporción el peso fresco de agregados celulares a medida que se incrementó el nivel de NaCl en los medios de cultivo, reflejándose en su promedio obtenido sobre los niveles de sal que fue de 42.71 % de reducción, en relación con 20.61 y 31.28 % para las líneas L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>.

En la Figura 18 se puede apreciar la tendencia de reducción en peso fresco de la línea L<sub>0</sub> a medida que se incrementó la concentración de NaCl, lo anterior en comparación con las líneas L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, en las que se observó una mayor estabilidad de rendimiento en el peso fresco de agregados celulares.

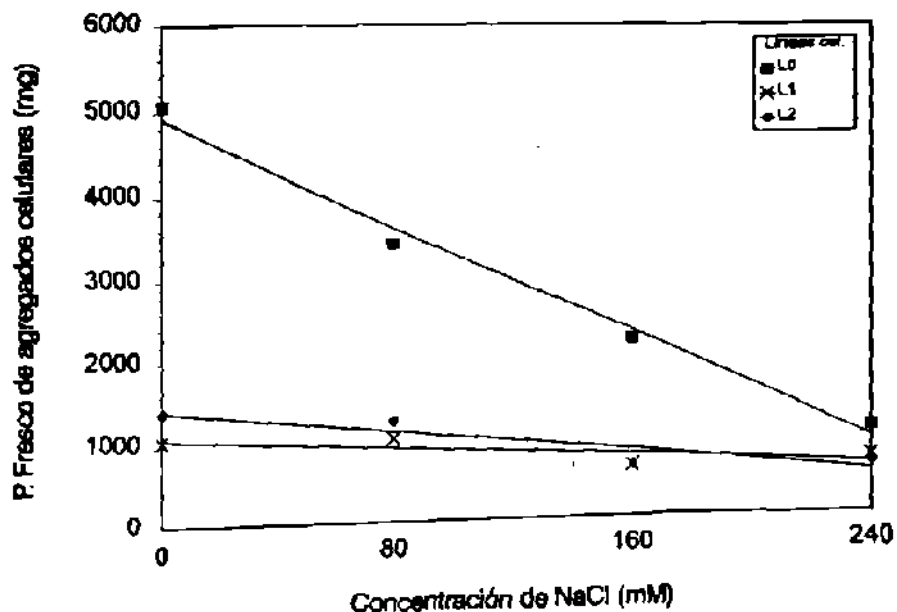


Figura 18. Comportamiento de líneas celulares seleccionadas por tolerancia a salinidad (NaCl) de *C. ciliaris* L., bajo distintos tratamientos de NaCl *in vitro*.

En el Cuadro 18A se observa que la interacción correspondiente a líneas celulares por concentraciones de NaCl para porcentajes de peso fresco de agregados celulares en valores angulares respecto al testigo ( $L_0$  en 0 mM de NaCl), fue estadísticamente significativa, por tanto, en el Cuadro 21 se presenta la comparación de medias para cada nivel de NaCl dentro de cada línea celular, pudiendo observarse que para  $L_0$  estadísticamente el % de peso fresco de agregados celulares respecto al testigo se redujo, lo que no ocurrió con  $L_1$  y  $L_2$ .

Cuadro 21. Medias de Porcentajes de peso fresco (g) de agregados celulares, transformados a valores angulares, de dos líneas celulares seleccionadas, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> respecto a una línea testigo L<sub>0</sub> de *C. ciliaris* L., bajo cuatro niveles de NaCl.

Tratamiento NaCl (mM)	LINEAS CELULARES		
	L <sub>0</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>
0	90.00a	30.25a	37.80a
80	74.46ab	29.25a	32.47a
160	45.17 bc	23.58a	22.72a
240	30.66 c	22.87a	22.39a

Valores con letras diferentes en columnas son estadísticamente diferentes (Tukey: 0.05)

Considerando las tendencias de la figura 18 y la comparación de medias de porcentaje de peso fresco de agregados celulares en valores angulares del Cuadro 21 se puede concluir que en el presente estudio se logró ganancia genética o epigenética en respuesta al proceso de selección realizado, ya que las líneas obtenidas por selección *in vitro*, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, exhibieron menor sensibilidad a los cambios en concentraciones de NaCl que el testigo. De lograr la regeneración se esperaría que en ambientes salinos, las plantas que se obtuvieran de L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> fuesen más constantes en producción que las de L<sub>0</sub>. Resultados similares fueron encontrados para líneas celulares seleccionadas de arroz (Croughan *et al.*, 1981) y para líneas celulares de trigo (Karadimova y Djambova, 1993).

## 5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, para los genotipos de *Cenchrus ciliaris* L. considerados y las condiciones bajo las cuales se realizaron los ensayos del presente estudio, se presentan las siguientes conclusiones:

1. Existe variabilidad en la tolerancia a la salinidad dentro del grupo de accesiones de *Cenchrus ciliaris* L.. probadas en la etapa de germinación, en un espectro continuo que abarca desde genotipos muy sensibles hasta los que se pueden ubicar en el grupo de las glicófitas resistentes, observándose en este estudio un mayor grado de tolerancia para las accesiones PI-365661 y PI-240170.
2. La accesión PI-240170 presentó mayor grado de tolerancia a NaCl que la accesión "Común", en base al rendimiento en peso fresco, peso seco y al número de tallos por planta en distintas concentraciones de NaCl aplicadas.
3. Se presentó variabilidad en la respuesta de distintos genotipos a distintos medios de cultivo, Para lograr un mayor porcentaje de inducción de cariósides a formación de callo y el medio de cultivo MS adicionado con  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D fue mejor para la proliferación de callo inducido en peso fresco.

4. La accesión PI-240170, presentó variabilidad en su respuesta a distintos tratamientos de NaCl, *in vitro*, observándose un mejor comportamiento para las concentraciones de 60 y 120 mM de NaCl.
5. Las suspensiones celulares de la accesión PI-240170 mostraron mayor adaptación a medio de cultivo salinizado con 60 mM de NaCl que a medio de cultivo sin sal.
6. El medio de cultivo selectivo salinizado con 180 mM de NaCl ocasionó variabilidad genética o epigenética en suspensiones celulares de la accesión PI-240170 pretratadas en distintas concentraciones de NaCl, resultando mejores los subcultivos provenientes de los pretratamientos 60/180 y 120/180.
7. El crecimiento en peso fresco de agregados celulares de la línea celular testigo ( $L_0$ ) fue superior al de las líneas  $L_1$  y  $L_2$  seleccionadas; sin embargo, la reducción en peso de  $L_0$  fue mayor a medida que se incrementó la concentración de NaCl en comparación a  $L_1$  y  $L_2$ , por lo que se concluye que las líneas celulares seleccionadas en suspensión por mejor comportamiento bajo estrés salino presentaron más estabilidad en la tolerancia a NaCl en su crecimiento de agregados celulares que aquella no seleccionada.
8. La concentración de 240 mM de NaCl rebasó el umbral de tolerancia a NaCl en el crecimiento de agregados celulares de la accesión PI-240170 de *Cenchrus ciliaris* L. en el presente estudio.



## 6. RECOMENDACIONES

En base a los resultados y conclusiones obtenidos en el presente estudio, se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Evaluar el comportamiento de suspensiones celulares bajo estrés salino de otros genotipos que mostraron alto porcentaje de germinación relativa como PI-365661, PI-345976 y genotipos con bajo porcentaje, como SDE-128 Cv. tabazimbi, PI-323415 y “Común” del grupo de accesiones probadas en etapa de germinación en éste estudio, para evaluar cambios genéticos o epigenéticos en respuesta al estrés por sal aplicado
2. Establecer ensayos de regeneración, a partir de selecciones celulares con mayor tolerancia a salinidad realizadas *in vitro*, bajo distintas concentraciones de NaCl, considerando medios selectivos entre 60 y 120 mM de NaCl para la accesión PI-240170 de *Cenchrus ciliaris* L. y evaluación de la tolerancia a salinidad de plantas regenerantes, en su caso.
3. Realizar trabajos complementarios al presente estudio mediante técnicas de marcadores moleculares para identificar diferencias en suspensiones celulares de la accesión PI-240170 de *Cenchrus ciliaris* L., sometidas a distintos tratamientos de NaCl, en un rango de concentración de 0 a 240 mM, así como estudios de cariotipo de células con buen comportamiento en elevadas concentraciones de sal.

4. **Aplicar tratamientos a base de agentes mutagénicos físicos o químicos en combinación con el cultivo de células en suspensión de la especie estudiada en el presente trabajo, con la finalidad de obtener mayor avance en la selección de líneas celulares para el mejoramiento de la tolerancia a la salinidad.**
  
5. **Evaluar la tolerancia de cultivos celulares de *Cenchrus ciliaris* L., a medios de cultivo salinizados con compuestos a base de distintos tipos de sales como sulfato de sodio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio y carbonato de sodio, para complementar los procesos de selección y mejoramiento de líneas celulares por tolerancia a salinidad.**

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Albregts, E. E. and C. M. Howard. 1973. Influence of temperature and moisture stress from sodium chloride salinization on okra emergence. *Agr. Jour.* 65:836-838.
- Alvarado G., O. G. 1990. Caracterización *in vitro* de la tolerancia de *Chenopodium quinoa* Willd. a la salinidad (NaCl). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. 112 p.
- Alvarado G., O. G., M. C. G. López P., V.A. González H. y J.L. Rodríguez O. 1991. Crecimiento y osmorregulación de células en suspensión de *Chenopodium quinoa* sometidas a NaCl. *Agrociencia* 2 (1):133-141.
- Arce-Montoya, M. 1994. Causas de la variación genética en el cultivo de tejidos vegetales. *Rev. de la Soc. Mex. de Biotecnología y Bioingeniería* 4(3-6):85-90.
- Arce-Montoya, M. 1994. Métodos, logros y perspectivas de la variación clonal. *Rev. de la Soc. Mex. de Biotecnología y Bioingeniería* 4(3-6):91-97.
- Ayerza, R. 1981. El Buffel grass: utilidad y manejo de una promisorio gramínea. Ed Hemisferio Sur, S.A Buenos Aires, Argentina. 139 p.
- Bashaw, E. C. 1962. Apomixis and sexuality in buffelgrass. *Crop Sci.* 2(5):412-415.
- Ben-Hayyim, G. 1985. Selection and breeding for salinity tolerance *in vitro*. *Plant and Soil* 89:243-252.
- Bernstein, L. 1961. Osmotic adjustment plants to saline media. I. steady state. *Amer. Jour. of Botany* 48:909-917
- Bernstein, L., L. E. Francois and R.A. Clark. 1966. Salt tolerance of N. Co. varieties of sugar cane. I Sprouting, growth and yield. *Agr. Jour.* 58:489-493.
- Binh, D.Q., L. E. Hezky, G. Gyulai and A. Csillag. 1992. Plant regeneration of NaCl-pretreated cells from long-term suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) in high saline conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 29: 75-82.
- Binzel, M.L. 1994. Cellular mechanisms of salt tolerance in plant cells. In Janick, J. 1994. *Horticultural Rev.* 16:33-69. Ed. John Wiley and Sons., inc. U.S.A.

- Black, C. A. 1975. Relaciones suelo-planta. Ed Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina. pp. 219-391
- Blum, A. 1988. Plant breeding for stress environments. CRC press, Inc. Boca Raton, Florida. USA pp. 163-169
- Cárdenas C., E. 1995. Selección de líneas celulares *in vitro*. Notas del curso de Cultivo de tejidos y métodos de mejora genética *in vitro*. Facultad de Agronomía U. A. N. L. , Marín, N. L. Méx.
- Causton, D. R. and J. C. Venus. 1981. The biometry of plant growth. Ed. Edward Arnold Pubs. London. 307 p.
- Clavero C., T. 1991. Alternativas de forraje para el bosque muy seco tropical en Venezuela. Potencialidad del pasto buffel, *leucaena* y/o sus asociaciones. *Simposium Internacional Aprovechamiento Integral del Zacate Buffel*. Soc. Méx. de Manejo de pastizales A. C. Memorias. Cd. Victoria, Tamps. México. pp. 67-79.
- Cox, J. R. 1991. El zacate buffel: Historia y establecimiento, un acercamiento internacional para seleccionar sitios de siembra e implicaciones en la agricultura del futuro. *Simposium Internacional Aprovechamiento Integral de Zacate Buffel*. Soc. Mex de Manejo de Pastizales. A. C. Memorias. Cd. Victoria, Tamps. pp. 60-66
- Croughan, T.P., S. J. Stavarek and D.W. Rains. 1978. Selection of NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. *Crop Sci.* 18:959-963.
- Croughan, T.P., S.J. Stavarek, and D.W. Rains. 1981. *In vitro* development of salt resistant plants. *Environ. Exp. Bot.* 21(3/4): 317-324.
- Epstein, E. 1976. Genetic potentials for solving problems of soil mineral stress: Adaptation of crops to salinity. In: M. J. Wright. 1976. *Plant adaptation to mineral stress in problem soil*. Off. Agr. Tec. Ass. Bureau. Washington, D. C. pp. 73-81.
- Flowers, T.J., P.F. Troke, and A.R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:89-121.
- Francois, L. E. and Bernstein, L. 1964. Salt tolerance of safflower. *Agr. Jour.* 56:38-40.
- Francois, L. E. and Goodin, J. R. 1972. Interaction of temperature and salinity on sugar beet germination. *Agr. Jour.* 64:272-273.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. 2a. edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

- Glenn, E. P. 1987. Relationship between cation accumulation and water content of salt tolerant grasses and a sedge. *Plant Cell and Env.* 10:205-212.
- Gorham, J., R.G. Wynjones and E. McDonnell. 1985. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil.* 89:15-40.
- Graham, T. W. G. and L. R. Humphreys. 1970. Salinity response of cultivars of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Aust. Jour. Exp. Agr. and Animal Husbandry.* 10:725-728.
- Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:149-190.
- Gutiérrez P., L., U. López D. y A. Durón A. 1991. Tolerancia a la salinidad artificial del zacate buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) durante su etapa de germinación. *Rev. Manejo de Pastizales.* 4(2):40-46.
- Guzmán F., C. y S. Puente T. 1993. El reposo en las semillas del buffel (*Cenchrus ciliaris* L.). Folleto. Facultad de Agronomía de la U. A. N. L., Marín, N. L., Mex. 24 p.
- Hanselka, C. W. y D. Johnson. 1991. Establecimiento y manejo de praderas de zacate buffel común en el sur de Texas y en México. Simposium internacional sobre el Aprovechamiento Integral del Zacate Buffel. Soc. Méx de Manejo de Pastizales A. C. Memorias. Cd. Victoria, Tamps. México. pp. 54-59.
- Hanzel, J.J., J.P. Miller, M.A. Brinkman and E. Fendos. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Sci.* 25:27-31.
- Hatch, S. L. y M. A. Hussey. 1991. Origen, taxonomía y oportunidades de mejora genética del zacate buffel y especies afines. Simposium Internacional sobre el Aprovechamiento Integral del Zacate Buffel. Soc. Méx. de Manejo de Pastizales, A. C. Memorias Cd. Victoria, Tamps. México. pp. 3-13.
- Hasegawa, P. M., M. L. Binzel, M. Reuveni, A. A. Watad and R. A. Bressan. 1990. Physiological and molecular mechanisms of ion accumulation and compartmentation contributing to salt adaptation of plant cells. *Horticultural Biotechnology.* Wiley-Liss, Inc. pp. 295-304.
- Hasegawa, P.M., R.A.Bressan, and A.K.Handa, 1986. Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hort. Science* 21(6):1317-1324.
- Hitchcock, A. S. 1971. Manual of the grasses of the United States. Second Ed. rev. by Agnes Chase. Dover Pub. New York. p. 24.
- Hoffman, G. J., J. A. Jobes, Z. Hanscom and E. V. Maas. 1978. Timing of environmental stress affects growth, water relations and salt tolerance of pinto bean. *Transaction of the Asae.* 76:713-718.
- Ibarra F., F., J. R. Cox y M. Martin R. 1991. Efecto del suelo y clima en el establecimiento y persistencia del zacate buffel en México y sur de Texas. Simposium Internacional sobre

- el Aprovechamiento Integral del Zacate Buffel. Soc. Méx. de Manejo de pastizales, A. C. Memorias Cd. Victoria, Tamps. México. pp. 14-28.
- Ibrahim, K. M., Collins, J.C., Collin, H.A. 1992. Characterization of progeny of *Coleus blumei* following an *in vitro* selection for salt tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 28:139-145.
- Kadda, M. T. and S. I Ghowail. 1964. Salinity effects on the growth of corn at different stages of development. *Agr. Jour.* 56:214-217.
- Kadda, M. T., W. F. Lehman and F. E. Robinson. 1973. Tolerance of rice (*Oriza sativa* L.) to salt during boot, flowering and grain filling stages. *Agr. Jour.* 65:845-847.
- Kaeppler, S. M. and R. L. Phillips. 1993. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 29P:125-130.
- Karadimova, M. and Djambova, G. 1993. Increased NaCl-tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf.) through *in vitro* selection. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 29P:180-182.
- Karp, A. 1990. Somaclonal variation in potato. *Biotechnology in agriculture and forestry* 11:379-399. In Bajaj, Y. P. S. 1990. *Somaclonal variation in crop improvement.* Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214
- Lerner, H.R. 1985. Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant Soil.* 89:6-14.
- López D., U., F. J. Cárdenas, G., A. Lerma H. y D. Becerra, G. 1990. Composición química de *Cenchrus ciliaris* L., *Acacia rigidula* Benth., y *Atriplex nummularia* Lindl. en el Noreste de México. *Ciencia Agropecuaria* 3(2):9-17. María, N.L., Méx.
- López P., M. C. G. 1984. Tolerance of tomato genotypes to osmotic stress *in vitro*. Thesis Doctor of Philosophy. Purdue University. 142 p.
- Maas, E. V. and R.H. Nieman. 1978. Physiology of plant tolerance to salinity. In: Jung G.A. *Crop tolerance to suboptimal land conditions.* Am. Soc. Agron. 32:277-299.
- McDonnell, R.E. and B.V. Conger. 1984. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of kentucky bluegrass. *Crop Sci.* 24:573-577.
- McKimmie, T. and A. K. Dobrenz. 1987. A method for evaluation of salt tolerance during germination, emergence, and seedling establishment. *Agr. Jour.* 79:943-945
- Manzano F., D.E. 1993. Regeneración de plantas *in vitro* del zacate Buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) var. Higgins. Tesis de Maestría en Ciencias. ITA No. 20 Aguascalientes, Ags. 94p.

- Mozafar, A., J. R. Goodin and J. J. Oertli. 1970. Na and K interactions in increasing the salt tolerance of *Atriplex halimus* L. I. yield characteristics and osmotic potential. *Agr. Jour.* 62:478-480
- Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En Roca, W. M. y L. A. Mroginski (De.). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali Colombia. pp. 19-40.
- Müller, M. and K.A. Santarius. 1978. Changes in chloroplast membrane lipids during adaptation of barley to extreme salinity. *Plant Physiol.* 62:326-329.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- National Research Council. 1984. Genetic engineering of plants. National Academy Press. Washington D. C. 80 p
- Nehra, N. S., K. K. Kartha, C. Stushnoff and K. L. Giles. 1992. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 29:257-268
- Nieman, R. H. and Shannon, M. C. 1976. Screening plants for salinity tolerance. Plant adaptation to mineral stress in problem soil. Office of Agriculture Technical Assistance Bureau. Washington, D. C. pp. 359-367.
- O'leary, J. W. 1984. The role of Halophytes in irrigated agriculture. In Staples, R. C. and G. H. Toenniessen. 1984. Salinity tolerance in plants. *Strategies for crop improvement*. Ed. John Wiley and Sons. New York. pp. 280-300.
- Olivares S., E. 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía, UANL, Marín, N. L., México.
- Oono, K. 1983. Genetic variability in rice plants regenerated from cell culture. In: *International Rice Res. Inst.* 1983. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science press, Beijing, China. pp. 95-104.
- Osuna A., P., A. Nava-C., A.E. Jofre-G. 1995. Plant regeneration from shoot apex explants of foxtail millet. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 40:33-35.
- Personal del laboratorio de salinidad de los Estados Unidos de América. 1973. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. Ed. Limusa, México, D. F. 173 p.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 181-225.
- Piqueras A., E. Olmos and E. Hellin. 1994. Cytological changes related with salt tolerance in embryogenic callus of *Citrus limon*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 39:13-18.

- Poehlman, J. M. 1987. *Plant breeding crops*. 3a. Ed. An. Avi Book. New York, U. S. A. pp. 149-334.
- Ponsamuel, J. and E. W. Weiler. 1994. *In vitro* selection for salt tolerance in cultivars of indica rice. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30A: p. 74.
- Rahman, M.H, S. Krishnaraj and T. A. Thorpe. 1995 Selection for salt tolerance *in vitro* using microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. topaz, and the characterization of putative tolerant plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31:116-121.
- Rains, D.W., 1982. Developing salt tolerance. *Cal Agric.* 36:30-31.
- Reddy, P.J. And K. Vaidyanath. 1986. *In vitro* characterization of salt stress effects and the selection of salt tolerant plants in rice (*Oriza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 71:757-760.
- Richards, F. J. 1969. The quantitative analysis of growth. In: Steward, F. C. (De.). 1969. *Plant Physiol.* vol Va. Academic Press. New York, USA. pp. 3-76.
- Rogers, Z.M.D., M.L. Dahamer and D.W. Stair. 1993. Characerization of Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) cell suspension cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29p:51-54.
- Roylance, J.T., N.S. Hill and W.A. Parrot. 1994. Detection of somaclonal variation in tissue cultures regenerants of tall fescue. *Crop Sci.* 34:1369-1372.
- Ryan, J. S. Miyamoto and J. L. Stroehlein. 1975b. Salt and specific ion effects on germination of four grasses. *J. Range Manage.* 28:61-64.
- Saldivar F., A. 1991. Ecosistemas del zacate buffel en Tamaulipas. *Simposium Internacional sobre el Aprovechamiento de Zacate buffel.* Soc. Mex. de Pastizales A. C. Memorias. Cd. Victoria, Tamps. pp. 42-51.
- Shannon, M. C. 1984. Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. In Staples, R. C. and G. H. Toenniessen. 1984. *Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement.* Ed. John Wiley and Sons, New York. pp. 231-253.
- Shannon, M.C. 1985. Principles and strategies in breeding for high salt tolerance. *Plant and Soil.* 89:227-241.
- Spiegel-Roy, P., G. Ben-Hayyim. 1985. Selection and breeding for salinity tolerance *in vitro*. *Plant and Soil* 89:243-252.
- Stavarek, S. J. and D. W. Rains. 1984. The development of tolerance to mineral stress. *Hort Sci.* 19(3):13-18.
- Szabolcs, I. 1989. Interrelations between desertification and salinization. *Research Institute for Soil Science and agricultural. Chemistry of the Hungarian. Academy of Sciences* H1022, Budapest. p. 6.



- Tabares, E., J. Pachon y W.M. Roca. 1991. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. En Roca W. M y L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali Colombia. pp. 339-358.
- Tal, M. 1984. Physiological genetics of salt resistance in higher plants: Studies on the level of the whole plant and isolated organs, tissues and cells. In Staples, R. C. and G. H. Toenniessen. 1984. Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement. Ed. John Wiley and Sons. New York. pp. 301-320.
- Tal, M. 1990. Somaclonal variation for salt resistance. In Bajaj, Y.P.S. (ed.) 1990. Biotechnology in Agriculture and forestry II. Somaclonal variation in crop improvement. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp. 236-257.
- Tal, M. 1994. In vitro selection for salt tolerance in crop plants: theoretical and practical considerations. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30P:175-180.
- Tiburcio, A.F., X. Figueroa, Y. Claparols, M. Santos and J.M. Torné. 1991. Improved plant regeneration in maize callus cultures after pretreatment with DL-alpha-difluoromethylarginine. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 27:27-32.
- Toenniessen, G. H. 1984. Review of the world food situation and the role of salt tolerant plants. In Staples R. C. and G. H. Toenniessen (Ed.), 1984. Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement. John Willey & Sons. New York. pp. 399-414.
- Torres, B. C., F. T. Bingham and J. Oertli. 1974. Salt tolerance of mexican wheat: II. relation to variable sodium chloride and length of growing season. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 38:777-780.
- Trejo C., R. 1992. Caracterización *in vitro* de la tolerancia al déficit hídrico y a salinidad en células de *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. pp. 61-120.
- Varshney A. C. and B.D. Bajjal. 1982. Impact of salt stress on chlorophyl contents of certains pasture grasses. Current Agriculture 6(3-4):151-154.
- Vasil, I.K. and V. Vasil. 1994. *In vitro* culture of cereals and grasses. In Y.K. Vasil and T.A. Thorpe. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London. pp 293-312.
- Vázquez-Duhalt, R., L. Alcaraz-Meléndez and H. Greppin. 1991. Variation in polar-group content in lipids of cowpea (*Vigna unguiculata*) cell cultures as a mechanism of haloadaptation. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 26:83-88.
- Velazco M., H. A. 1991. Las zonas áridas y semiáridas. Sus características y manejo. Ed. Limusa. México. D.F. 725 p.
- Villarreal, J. 1976. Estudio de un ecosistema salino en el sur de Nuevo León. Biblioteca , Facultad de Agronomía de la U. A. N. L. Marin N. L., México. 161 p.

- Watad, A.A., H. R. Lerner and L. Reinhold. 1985. Stability of the salt-resistance character in *Nicotiana* cell lines adapted to grow in high NaCl concentrations. *Physiol Veg.* 23:887-894.
- Williamson, J. and B. Pinkerton. 1985. Buffelgrass establishment. In E. C. A. Runge and J. L. Schuster (De.). *Buffelgrass: Adaptation, Management and Forage Quality Symposium*. Texas Agr. Exp. Sta. College Station. pp. 25-29.
- Yang, Y. W., R. J. Newton and F. R. Miller. 1990. Salinity tolerance in *Sorghum*. II. Cell culture response to sodium chloride in *S. bicolor* and *S. halepense*. *Crop Sci.* 30:781-784.

## 8. APENDICE

Cuadro 1A. Análisis de varianza para número de tallos por planta de tres genotipos de *C. Ciliaris* L. bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996)

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	5221.492188	5221.492188	72.5163	0.000
NIV. NaCl	2	615.445313	307.722656	4.2737	0.030
G x N	2	5.265625	2.632813	0.0366	0.965
ERROR	18	1296.078125	72.004341		
TOTAL	23	7138.281250			

C. V. = 14.29 %

Cuadro 2A. Análisis de varianza para altura de planta de tres genotipos de *C. ciliaris* L., bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996)

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	3911.687500	3911.687500	101.7629	0.0000
NIV. NaCl	2	2177.609375	1088.804688	28.3253	0.0000
G x N	2	66.640625	33.320313	0.8668	0.560
ERROR	18	691.906250	38.439236		
TOTAL	23	6847.843750			

C. V. = 6.61 %

Cuadro 3A. Análisis de varianza para peso fresco de planta de tres genotipos de *C. ciliaris* L. bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996)

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	184.625000	184.625000	0.2597	0.622
NIV. NaCl	2	136112.75000	68056.375000	95.7183	0.000
G x N	2	8699.75000	4349.875000	6.1179	0.009
ERROR	18	12798.125000	711.006958		
TOTAL	23	157795.25000			

C. V. = 10.27

Cuadro 4A. Análisis de varianza para peso seco por planta de tres genotipos de *C. ciliaris* L. bajo tres tratamientos de NaCl (Marín, N. L., 1996)

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	141.187500	141.187500	1.3979	0.251
NIV. NaCl	2	17939.656250	8969.828125	88.8117	0.000
G x N	2	635.812500	317.906250	3.1476	0.066
ERROR	18	1817.968750	100.998260		
TOTAL	23	20534.625000			

C. V. = 9.44

Cuadro 5A. Análisis de varianza para % de tallos por planta de tres genotipos de *C. ciliaris* L. bajo dos concentraciones de NaCl (Marín, N. L., 1996)

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	241.953125	241.953125	2.7690	0.119
CONC. NaCl	1	284.914063	284.914063	3.2606	0.093
G x N	1	37.515625	37.515625	0.4293	0.531
ERROR	12	1048.562500	87.380211		
TOTAL	15	1612.945313			

C. V. = 11.03 %

Cuadro 6A. Análisis de varianza para % de altura de planta de tres genotipos de *C. ciliaris* L. bajo dos concentraciones de NaCl (Marín, N. L., 1996)

CV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	344.937500	344.937500	4.5374	0.052
CONC. NaCl	1	772.687500	772.687500	10.1642	0.008
G x N	1	72.554688	72.554688	0.9544	0.650
ERROR	12	912.250000	76.020836		
TOTAL	15	2102.429688			

C. V. = 10.29

Cuadro 7A. Análisis de varianza para % de peso fresco de planta de tres genotipos de *C. ciliaris* L., bajo dos concentraciones de NaCl (Marín N. L., 1996)

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	448.179688	448.179688	3.5591	0.081
CONC. NaCl	1	3837.812500	3837.812500	30.4768	0.000
G x N	1	120.226563	120.226563	0.9547	0.650
ERROR	12	1511.109375	125.925781		
TOTAL	15	5917.328125			

C. V. = 17.34 %

Cuadro 8A. Análisis de varianza para % de peso seco de planta de tres genotipos de *C. ciliaris* L. bajo dos concentraciones de NaCl (Marín, N. L., 1996)

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	1	471.320313	471.320313	4.5870	0.051
CONC. NaCl	1	4279.765625	4279.765625	41.6520	0.000
G x N	1	117.945313	117.945313	1.1479	0.306
ERROR	12	1233.007813	102.750648		
TOTAL	15	6102.039063			

C. V. = 14.83 %

Cuadro 9A. Análisis de varianza para % de cariósida que formó callo en tres genotipos de *C. ciliaris* L., en dos medios de cultivo y dos concentraciones de ácido 2,4-D.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	P > F
GENOTIPOS	2	18716.664063	9358.332031	30.6273	0.000
MEDIOS	1	100.000000	100.000000	0.3273	0.579
2,4-D	1	100.000000	100.000000	0.3273	0.579
G x M	2	3750.007813	1875.003906	6.1364	0.007
G x D	2	349.992188	174.996094	0.5727	0.576
M x D	1	177.773438	177.773438	0.5818	0.541
G x M x D	2	72.226563	36.113281	0.1182	0.889
ERROR	24	7333.335938	305.555664		
TOTAL	35	30600.000000			

C. V. = 32.775284 %

Cuadro 10A. Análisis de varianza para peso fresco de callo (g) inducido en tres genotipos de *C. ciliaris* L. y dos concentraciones de ácido 2,4-D.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
GENOTIPOS	2	0.146806	0.073403	2.0725	0.146
MEDIOS	1	0.233612	0.233612	6.5961	0.016
2,4-D	1	0.100278	0.100278	2.8314	0.102
G x M	2	0.067638	0.033819	0.9549	0.599
G x D	2	0.210973	0.105486	2.9784	0.068
M x D	1	0.321110	0.321110	9.0666	0.006
G x M x D	2	0.450139	0.225069	6.3549	0.006
ERROR	24	0.850000	0.35417		
TOTAL	35	2.380556			

C. V. = 65.1438 %

Cuadro 11A. Análisis de varianza para peso fresco de células (mg 30 ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L. en seis periodos de muestreo y cuatro tratamientos de NaCl.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
DIAS	5	549.517212	109.903442	13.6808	0.000
NIV. NaCl	3	65.088257	21.696085	2.7007	0.051
D x S	15	112.467163	7.497811	0.9333	0.532
ERROR	72	578.405640	8.033412		
TOTAL	95	1305.478271			

C. V. = 101.72 %

Cuadro 12A. Análisis de varianza para viabilidad de células (g 30 ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L., en seis periodos de muestreo y cuatro tratamientos de NaCl.

FV	GL	SC	CM	F	P > F
DIAS	5	9087.750000	1817.550049	19.4894	0.000
NIV. NaCl	3	300.093750	100.031250	1.0726	0.367
D x S	15	3155.375000	210.358337	2.2557	0.012
ERROR	72	6714.593750	93.258247		
TOTAL	95	19257.812500			

C. V. = 17.15 %

Cuadro 13A. Análisis de varianza para peso seco de células (g 30 ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L., en seis períodos de muestreo y cuatro tratamientos de NaCl, para selección.

F V	GL	SC	CM	F	P > F
DIAS	5	8.253540	1.650708	14.0386	0.000
NIV. NaCl	3	0.465820	0.155273	1.3205	0.278
D x S	15	1.691652	0.112777	0.9591	0.510
ERROR	48	5.644014	0.117584		
TOTAL	71	16.055027			

C. V. = 103.92 %

Cuadro 14A. Análisis de varianza para peso fresco de células (g 30 ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L. en cuatro períodos de muestreo y cinco pretratamientos de NaCl, para selección

F V	GL	SC	CM	F	P > F
DIAS	3	40.936432	13.645477	36.2766	0.000
NIV. NaCl	4	21.249435	5.312359	14.1230	0.000
D x S	12	21.120499	1.760042	4.6791	0.000
ERROR	60	22.569031	0.376151		
TOTAL	79	105.875397			

C. V. = 50.31 %

Cuadro 15A. Análisis de varianza para peso seco de células (g 30 ml<sup>-1</sup>) de *C. ciliaris* L. en cuatro períodos de muestreo y cinco pretratamientos de NaCl, para selección.

F V	GL	SC	CM	F	P > F
DIAS	3	0.229228	0.076409	21.4149	0.000
NIV. NaCl	4	0.349129	0.087282	24.4622	0.000
D x S	12	0.261211	0.021768	6.1007	0.000
ERROR	60	0.214082	0.003568		
TOTAL	79	1.053650			

C. V. = 36.02 %



Cuadro 16A. Análisis de varianza para % de viabilidad de células de *C. ciliaris* L. en cuatro períodos de muestreo y cinco pretratamientos de NaCl, para selección.

F V	GL	SC	CM	F	P > F
DIAS	3	530.062500	176.687500	1.2937	0.304
NIV. NaCl	4	714.093750	178.523438	1.3072	0.301
D x S	12	1133.101563	94.425133	0.6914	0.742
ERROR	20	2731.453125	136.572662		
TOTAL	39	5108.710938			

C. V. = 23.20 %

Cuadro 17A. Análisis de varianza para peso fresco de agregados celulares (g) de tres líneas celulares de *C. ciliaris* L. en cuatro tratamientos de NaCl.

F V	GL	SC	CM	F	P > F
LINEAS CEL.	2	53.982788	26.991394	33.032	0.00
NIV. NaCl	3	27.410141	9.136714	11.2056	0.00
L x S	6	21.279831	3.546638	4.3497	0.002
ERROR	48	39.137833	0.815372		
TOTAL	59	141.810593			

C. V. = 57.74

Cuadro 18A. Análisis de varianza para porcentajes de peso fresco (g) transformados a valores angulares de agregados celulares de tres líneas celulares de *C. ciliaris* L. en cuatro tratamientos de NaCl.

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	P > F
LINEAS CEL.	2	14011.50781	7005.75391	20.4811	0.000
NIV. NaCl	3	7313.89062	2437.96362	7.1273	0.001
L x S	6	4732.35156	788.72528	2.3058	0.049
ERROR	48	16418.85937	342.05957		
TOTAL	59	42476.60937			

C. V. = 48.04 %

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ernesto Ruiz Cerda

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias Agrícolas

**Tesis:** CARACTERIZACION Y SELECCION DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Cenchrus ciliaris* L. POR TOLERANCIA A SALINIDAD

**Campo de estudio:** Ciencias Agrícolas (Mejoramiento Genético de Plantas Forrajeras)

### Biografía:

**Datos Personales:** Nacido en Doctor Arroyo, N. L., el 4 de Agosto de 1953, hijo de Ernesto Ruiz Leija y Dorotea Cerda Salinas.

### Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León; título obtenido, Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en 1978. Obtención del grado de Maestro en Ciencias en Producción Agrícola en la misma Universidad en 1988.

### Experiencia profesional:

Profesor Titular de tiempo completo de la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria, desempeñando los siguientes cargos:

Profesor de materias tecnológicas de nivel superior y medio superior en el ITA No. 8, CBT'a No. 9 de Comitancillo, Oaxaca; CBT'a No. 60 de Cd. Hidalgo, Chiapas y Centro de Desarrollo Profesional Agropecuario de la DGETA en México, D. F. (1976-1982)

Profesor de materias tecnológicas y jefe de las oficinas de sector agrícola e investigación del CBT'a No. 52 de Matehuala, S. L. P. (1982-1990)

Director del CBT'a No. 52 de Matehuala, S. L. P. (1990-1993)

Jefe del Departamento de producción y Experimentación del CBT'a No. 52 de Matehuala, S. L. P. (1997 a la fecha)



