



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

**LA CITOCININA BAP EN LA PRODUCCIÓN, SENESCENCIA Y  
DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE *Lolium perenne* L.**

**ANGEL HIROSHI SOTO URANO**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.**

2014

La presente tesis titulada: **La citocinina BAP en la producción, senescencia y degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L.** realizada por el alumno: **Angel Hiroshi Soto Urano**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

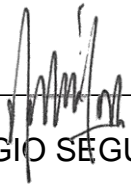
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

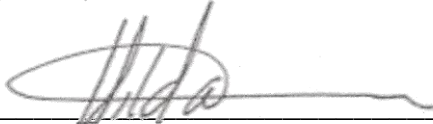
**GANADERÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ

DIRECTORA

  
\_\_\_\_\_  
DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA MANCERA

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. OMAR HERNÁNDEZ MENDO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2014.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de esta etapa en mi formación.

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad que me brindó para continuar con mi formación académica.

Al Programa Recursos Genéticos y Productividad Ganadería y a todo el personal que labora en él, por su apoyo y facilidades brindadas durante toda mi etapa en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Sergio Segundo González Muñoz por todo el apoyo y el conocimiento otorgado para la realización de la presente investigación.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por su acertada dirección, asesoría y apoyo para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Omar Hernández Mendo por sus valiosas contribuciones y asesoría.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galvan por el apoyo y asesoría brindada durante la fase de laboratorio de la presente investigación.

Al Dr. Víctor Conde Martínez, la Dra. María de los Ángeles y a Don Ángel por el apoyo durante el desarrollo de la investigación.

A los compañeros trabajadores del laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal y del laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería.

## DEDICATORIAS

A mis padres:

**Tomie Urano Mariano y Silvino Soto Valencia.**

De quienes siempre he tenido el cariño, apoyo y comprensión.

A mi hermanas **Susuki** y a su **familia** y **María Sugey.**

Por su gran cariño, apoyo constante y motivación.

A mi esposa **Oralia** por el cariño y apoyo durante estos tres años y durante la realización del trabajo.

A mis **amigos** y **compañeros** que he tenido el agrado de conocer desde el inicio de mi formación como Ingeniero Agrónomo Zootecnista.

**Angel Hiroshi Soto Urano.**

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Características botánicas de <i>Lolium perenne</i> L.....	4
2.2. Características agronómicas de <i>Lolium perenne</i> L. ....	5
2.3. Calidad nutritiva y producción de pastos .....	7
2.4. Senescencia foliar .....	9
2.5. Reguladores de crecimiento.....	11
2.6. Pigmentos fotosintéticos e índice de verdor .....	15
<b>3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
3.1. Objetivo general .....	16
3.2. Objetivos específicos .....	16
3.3. Hipótesis .....	16
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1. Localización, material biológico y duración del experimento .....	17
4.2. Diseño experimental, tratamientos, variables y análisis estadístico .....	18
4.2.1. Crecimiento y senescencia foliar de <i>Lolium perenne</i> L. ....	18
4.4.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos y proteínas solubles en hojas de <i>Lolium perenne</i> L. ....	19
4.4.3. Composición morfológica y composición química. ....	20
4.4.4. Degradación <i>in vitro</i> de <i>Lolium perenne</i> L. ....	20
4.4.5. Análisis estadístico. ....	20
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
5.1. Crecimiento y senescencia foliar de <i>Lolium perenne</i> L. ....	22
5.2. Pigmentos fotosintéticos. ....	28
5.3. Composición morfológica, composición química y degradación <i>in vitro</i> de <i>Lolium perenne</i> L.....	34
<b>CONCLUSION GENERAL .....</b>	<b>40</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Crecimiento foliar neto, senescencia y crecimiento foliar acumulado en <i>Lolium perenne</i> L. (mm tallo <sup>-1</sup> ) asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. ....	22
Cuadro 2. Contenido de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , xantofilas + carotenoides, clorofila total y proteína soluble en extracto de hojas de <i>Lolium perenne</i> L. (mg g <sup>-1</sup> PF) asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.....	29
Cuadro 3. Composición morfológica (%) y relación hoja: tallo y relación hoja: no hoja, en <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. ....	35
Cuadro 4. Contenido de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y nutrientes nitrogenados (NN) en <i>Lolium perenne</i> L. (%) asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.....	38
Cuadro 5. Degradación <i>in vitro</i> (6, 12, 24 y 48 h) de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.....	38
Cuadro 6. Degradación <i>in vitro</i> (6, 12, 24 y 48 h.) de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. En cuatro muestreos iniciando a los 30 DDC (días después del corte) y con intervalos de 30 días entre cada muestreo. Los datos son promedio de n= 3.....	39

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Elementos taxonómicos del ballico perenne <i>Lolium perenne</i> L.....	4
--	---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento foliar acumulado de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de $n=25 \pm$ SE. ....	23
Figura 2. Senescencia foliar acumulada de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de $n=25 \pm$ SE. ....	25
Figura 3. Crecimiento foliar neto de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3). y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de $n=25 \pm$ SE. ....	28
Figura 4. Contenido de clorofila <i>a</i> ( $\text{mg g}^{-1}$ PF) en hojas de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3). y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de $n=5 \pm$ SE.....	30
Figura 5. Contenido de clorofila <i>b</i> ( $\text{mg g}^{-1}$ PF) en hojas de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de $n=5 \pm$ SE.....	32
Figura 6. Contenido de xantofilas y carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}$ PF) en hojas de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de $n=5 \pm$ SE. ....	32
Figura 7. Contenido de clorofila total: clorofila <i>a</i> + clorofila <i>b</i> ( $\text{mg g}^{-1}$ PF) en hojas de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de $n=5 \pm$ SE.....	33
Figura 8. Índice relativo de verdor (clorofila total/xantofilas y carotenoides en hojas de <i>Lolium perenne</i> L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. ....	34

Figura 9. Cambios en la composición morfológica del pasto *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de n=5. .... 36



# LA CITOCININA BAP EN LA PRODUCCIÓN, SENESCENCIA Y DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE *Lolium perenne* L.

Angel Hiroshi Soto Urano, MC.  
Colegio de Postgraduados, 2014.

## RESUMEN

El pasto ballico (*Lolium perenne* L.) posee un alto potencial de producción en zonas templadas de México y su productividad puede ser influenciada usando técnicas agronómicas o reduciendo pérdidas por senescencia. La senescencia es la secuencia de eventos bioquímicos y estructurales que son afectados por factores externos e internos, como los reguladores de crecimiento. La citocinina 6-bencilaminopurina (BAP), clasificada como promotor de crecimiento, puede retrasar la senescencia y prolongar la actividad fotosintética de la hoja. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue conocer el efecto de BAP en la calidad, retraso del envejecimiento y degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L. Para ello, en las hojas de este pasto se evaluó el crecimiento y senescencia, el contenido de proteínas solubles y de pigmentos fotosintéticos, la composición química y morfológica y, además, la degradación *in vitro* de la pared celular. El experimento se realizó en el Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, Estado de México y se utilizaron 68 macetas con plantas de ocho meses de edad en un invernadero. El diseño experimental fue completamente al azar con tres tratamientos de BAP (0.1 mM, 0.01 mM y 0.001 mM) y un testigo sin la fitohormona. Al inicio del experimento se realizó un corte de homogenización de las plantas a 5 cm sobre el nivel del sustrato y 21 días después inició la aplicación semanal de BAP hasta la séptima semana. Los resultados se analizaron con el procedimiento MIXED (SAS 9.0, 2004) y la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). El efecto de citocinina BAP como promotor de crecimiento en *Lolium perenne* L. fue evidente porque aumentó el crecimiento foliar neto y acumulado y, además, con 0.1 mM de BAP el contenido de proteína se incrementó y la proporción de FDA se redujo con respecto al testigo. Sin embargo, la degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L. aumentó solamente con 0.001 mM de BAP aplicado a los 60 días después del corte de homogenización. La citocinina BAP no redujo la senescencia foliar ni tuvo efecto en el contenido de pigmentos fotosintéticos del pasto ballico.

**Palabras clave:** *Lolium perenne* L., 6-bencilaminopurina, senescencia.

**THE CYTOKININ BAP IN PRODUCTION, SENESCENCE AND *IN VITRO*  
DEGRADATION OF *Lolium perenne* L.**

**Angel Hiroshi Soto Urano, MSc.  
Colegio de Postgraduados, 2014.**

**SUMMARY**

Rye grass (*Lolium perenne* L.) shows high production potential in temperate areas of Mexico and its productivity may be influenced by using agronomic techniques or reducing senescence losses. Senescence is the sequence of structural and biochemical events which are affected by external and internal factors, such as growth regulators. Cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP), classified as growth promoter, can delay senescence and extend photosynthetic activity of leaves. Therefore, the objective of this study was to know the effect of BAP on quality, delay of senescence and *in vitro* degradation of *Lolium perenne* L. To this end, in the leaves of this grass we evaluated growth and senescence, content of soluble proteins and photosynthetic pigments, chemical and morphological composition and, besides, *in vitro* degradation of the cell wall. The experiment was carried out at the Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, Estado de Mexico, and 68 pots with eight month-old plants were utilized in a greenhouse. The experimental design was completely randomized with three treatments of BAP (0.1 mM, 0.01 mM and 0.001 mM) and a control without the phytohormone. At the start of the experiment, a uniformity cut of the plants was carried out at 5 cm above substrate level and 21 days afterwards we started a weekly application of BAP until the seventh week. Results were analyzed using MIXED procedure (SAS 9.0, 2004) and Tukey test ( $P < 0.05$ ). The effect of BAP as growth promoter in *Lolium perenne* L. was evident because it increased both accumulated and net leaf growth and, besides, when applying 0.1 mM BAP protein content was increased and ADF percentage was decreased, as compared to the control. However, *in vitro* degradation of *Lolium perenne* L. was increased only with 0.001 mM BAP applied 60 days after the uniformity cut. Cytokinin BAP did not reduce leaf senescence neither affected content of photosynthetic pigments of rye grass.

**Key words:** *Lolium perenne* L., 6-benzylaminopurine, senescence.

## 1. INTRODUCCIÓN

En praderas de zonas templadas de México se cultivan el ballico perenne (*Lolium perenne* L.) y el pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.), los cuales tienen un rendimiento y un efecto positivo en la productividad de bovinos y ovinos, en regiones templadas del hemisferio norte. El pasto *Lolium perenne* L. es una especie con un gran potencial, pero en México no lo manifiesta por completo debido a las condiciones ambientales. El ballico tiene un rápido crecimiento en invierno y primavera, y las siembras nuevas se pueden utilizar en pastoreo entre 45 y 90 días después de sembradas. Con ausencia de heladas el ballico perenne permanece verde en invierno, pero en verano su comportamiento depende mucho de la temperatura, y si ésta no es elevada utiliza bien el agua de lluvia; sin embargo, entra en reposo al empezar el incremento de temperaturas. Lo ideal sería que el pasto se conserve en buen estado, con buena calidad y mayor rendimiento por más tiempo; por lo general es conveniente aprovechar el pasto de manera intensiva, pues esto mantiene la planta suculenta. En México el ballico se produce principalmente en los estados de Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Durango, donde las temperaturas del invierno son relativamente moderadas, y puede progresar con temperaturas mínimas de 2 °C (Ramos *et al.*, 2000).

En países como Chile, los ballicos en general son el principal componente de las pasturas del sur del país debido a que presentan una buena adaptación edafoclimática y poseen un potencial de producción elevado mayor a 15 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (DEMANET, 2008; citado por Castillo, 2012). Así también, estudios en Europa y Nueva Zelanda mostraron que el uso de ballicos tetraploides puede incrementar en 13 % el consumo de materia seca por el animal y en 10 % la participación del trébol blanco en la composición botánica de la pradera, aunque la desventaja es la escasa tolerancia a suelos con bajos niveles de fertilidad y alta susceptibilidad al gorgojo barrenador del tallo (DEMANET, 2008; citado por Castillo, 2012).

La productividad del pasto ballico puede incrementarse ya sea aumentando la cantidad de pasto por medio de técnicas agronómicas o al reducir las pérdidas

causadas por envejecimiento o senescencia (Velasco, 2001). Para algunas regiones templadas se conocen los patrones de crecimiento y se puede determinar el manejo estacional y maximizar la producción de pasto y la producción pecuaria (Velasco, 2001). En un estudio realizado por Velasco *et al.* (2005) en Texcoco, Estado de México, acerca del rendimiento de una pradera de ballico perenne, hubo mayor acumulación de forraje (6,000 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) al cosechar entre las cuatro y seis semanas vs dos semanas, e independientemente de la frecuencia de corte durante la primavera y verano se registró 72 % del rendimiento anual de forraje; además, la mayor y menor tasa de crecimiento diario se observó en julio y enero respectivamente.

La senescencia en plantas es la secuencia de eventos bioquímicos, estructurales y fisiológicos controlados genéticamente, que comprende el estado final del desarrollo de la planta entera o una parte de ella, causando la muerte (Yoshida, 2003). La senescencia foliar, en un pasto, reduce la calidad nutritiva y se incrementa la proporción de materia muerta en el porcentaje total de materia seca (Guiboileau *et al.*, 2010).

Las citocininas son reguladores del crecimiento que regulan la división celular, ramificación, diferenciación del cloroplasto y retraso del envejecimiento. Además de promover la división celular y la ramificación, este regulador del crecimiento controla la diferenciación del cloroplasto y retrasa el envejecimiento en varias especies. La 6-bencilaminopurina puede prolongar la vida de la hoja más cercana a la espiga (hoja bandera) retrasando la senescencia y prolongando la actividad fotosintética, lo cual se refleja en un rendimiento mayor de granos (Todorov *et al.*, 1992). La citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) es la citocinina más usada como promotor del crecimiento, y es usada en la agricultura (Weaver, 1997). Aspersiones con bencilaminopurina (BAP 0.1 mM) en pasto oville (*Dactylis glomerata*) aumentó la elongación y el crecimiento de la hoja (cm tallo<sup>-1</sup>) en 36 % a la semana 17 después del corte, redujo la senescencia foliar y aumentó el peso seco en 18 % a los 47 días después del corte (DDC) comparado con el de los 14 DDC y en 64 % respecto al testigo (Willson *et al.*, 2008). Así, la citocinina BAP puede retrasar el envejecimiento y alargar el área verde de la

hoja, pero no se conoce el resultado de este efecto en la degradabilidad del pasto ballico (*Lolium perenne* L.).

Con base en lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la citocinina BAP en la calidad, retraso del envejecimiento y degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L., una especie con potencial para praderas de la zona templada de México.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Características botánicas de *Lolium perenne* L.

El ballico perenne (*Lolium perenne* L.) de la familia Poaceae es un pasto amacollado, perenne de 10 a 80 cm, con los tallos lisos, hojas de verde oscuro brillante, de limbo de hasta 18 cm de longitud, estriadas con nervio basal marcado, lígula membranosa y aurículas de hasta 2 mm; la vaina basal generalmente es rojiza cuando joven. La inflorescencia está compuesta por espigas sésiles alternadas a izquierda y derecha de un eje central. En la madurez las espiguillas se desprenden por arriba de las glumas; la arista central de los lemas está flanqueada por dos lóbulos membranosos (Rodríguez, 2000).



Imagen 1. Elementos taxonómicos del ballico perenne *Lolium perenne* L.  
(Ramos *et al.*, 2000. INIFAP).

## 2.2. Características agronómicas de *Lolium perenne* L.

El ballico perenne es originario de las zonas sur de Europa y suroeste y norte de África, y de Asia, al parecer fue la primera gramínea perenne producida en cultivo para forraje y en el norte de Europa, se siembra en lugares con clima templado o frío en altitudes de 1500 a 3000 m (Barnes *et al.*, 2007). En México está bien adaptado a las condiciones ambientales de los Valles de México y de Toluca y, además muestra adaptación a regiones templadas con temperatura media anual de 10 a 18° C y donde la temperatura del mes más caluroso no supera los 30 °C (Nuñez *et al.*, 1995).

La temperatura ambiental afecta y estimula el crecimiento del ballico perenne, con un intervalo de temperatura óptima para su crecimiento de 18 a 25 °C, adaptándose bien a climas fríos y húmedos. Tolera el frío, pero es sensible al calor y a la sequía; su crecimiento se estabiliza a partir de los 25 °C y se detiene a los 35 °C. El ballico perenne es más sensible a temperaturas elevadas y estrés hídrico, comparado con el ballico anual. La producción es afectada cuando la temperatura diurna supera los 31 °C y la nocturna excede los 25 °C (Muslera y Ratera, 1991).

Este pasto crece relativamente bien en suelos de poca fertilidad, pero para formar una cubierta vegetal satisfactoria es necesario realizar una siembra con una densidad de población alta. Puede crecer aceptablemente en suelos húmedos, siempre que el drenaje superficial sea relativamente bueno, ya que no prospera en áreas con problemas de encharcamiento. Dentro de las mejores condiciones edáficas para la producción de ballico están las características de textura y estructura del suelo. Así, el ballico se desarrolla mejor en suelos arcillosos con pH de 6.0 a 7.0. La concentración óptima de sales en el suelo que permite un desarrollo equilibrado de ballicos es de 0 a 6 mmhos cm<sup>-1</sup>; valores superiores a este intervalo afectan negativamente el desarrollo de dichos pastos (Ramos *et al.*, 2000).

La luz diurna además de su efecto indirecto a través de la fotosíntesis, actúa directamente sobre el desarrollo vegetativo de la planta (Ramos *et al.*, 2000). Así

mismo, estos autores señalan que los mejores rendimientos en materia seca de ballicos se obtienen cuando la duración del día es mayor, lo cual se puede relacionar también con la temperatura y la fotosíntesis.

*Lolium perenne* L. necesita más de 700 mm de lluvia para su desarrollo y su área de adaptación es muy amplia, tolera muy bien condiciones menos exigentes en fertilidad al igual que veranos calurosos y secos, y en otoño temprano es el cultivar con mayor tasa de acumulación de forraje. Su floración es intermedia, se presenta principalmente a fines de noviembre, en general es muy sano de hoja tanto en otoño como invierno, y específicamente posee muy buena tolerancia a la roya de corona (*Puccinia coronata avenae*) (Ramos *et al.*, 2000).

En el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, 2013) se desarrollaron investigaciones respecto a gramíneas forrajeras perennes para el sur de Chile. Del 2010 al 2013 se evaluó el pasto ovillo, el bromo (*Bromus inermis*), la festuca (*Festuca arundinacea*), el festulolium (*Festulolium* Aschers. et Graebn.) y el ballico perenne. Según INIA (2013), en el caso específico de *Lolium perenne* L. variedad Linn es una variedad diploide originaria de EE.UU., y para los experimentos en Chile se utilizó una densidad de siembra de 20 kg ha<sup>-1</sup> y el rendimiento promedio fue 100 kg MS ha<sup>-1</sup>; los valores de FDN, digestibilidad *in vitro* y proteína cruda (PC) fueron 44.7 %, 75.9 % y 19.4 %, respectivamente, mientras que el contenido de carbohidratos solubles en mayo y junio de 2011 fue 10.8 % y 17.4 % en abril de 2012.

*Lolium perenne* L. es la especie forrajera utilizada de la manera más frecuente para establecer las praderas permanentes en el sur de Chile. En su hábitat natural y utilizados tradicionalmente, los cultivares se encuentra en forma diploide ( $2n = 2x = 14$ ) (Nair, 2004; citado por Balocchi y Lopéz, 2009). En un estudio respecto al efecto de la ploidia de *Lolium perenne* L. sobre la producción de forraje, valor nutritivo y la preferencia de pastoreo, en la provincia de Valdivia, Chile, y de acuerdo con los resultados, los cultivares diploides presentaron mayor rendimiento de materia seca que los cultivares tetraploides, pero no hubo diferencias significativas en el contenido de proteína total promedio anual; además, los cultivares tetraploides presentaron un valor



mayor de proteína total que los cultivares diploides y las vacas lecheras pastaban más tiempo en los cultivares tetraploides (Balocchi y Lopéz, 2009).

### **2.3. Calidad nutritiva y producción de pastos**

El valor de un pasto utilizado para la producción pecuaria es el producto de la concentración de sus nutrimentos, es decir, el valor nutritivo de un pasto está determinado por la composición química del mismo, que puede variar considerablemente y está influenciado por muchos factores genéticos y ambientales. Entre estos factores se encuentran especies de gramíneas y la variedad, el clima y las condiciones de crecimiento (la temperatura, las precipitaciones y la intensidad de la luz), el tipo de suelo, y la gestión de los pastizales (nivel de fertilización, fecha de cosecha, fase de rebrote, y los días de cultivo). Estos factores también determinan las características de degradación de estos pastos en el rumen (Tas *et al.*, 2006).

Los nutrimentos en exceso a las necesidades de mantenimiento son destinados para la formación de tejido o para la secreción de leche por lo cual, al definir calidad de un pasto, el primer punto es conocer la proporción de nutrientes digestibles. Al respecto, la digestibilidad es aceptada convencionalmente como un índice de la ingestión voluntaria de un determinado pasto, al menos en experimentos de alimentación de rumiantes estabulados (Muslera y Ratera, 1991).

En *Lolium perenne* L. su principal fuente de energía fácilmente disponible son los hidratos de carbono solubles en agua, principalmente glucosa, fructosa, sacarosa y fructanos (polímeros de fructosa). El ballico perenne acumula una gran cantidad de fructanos de alto peso molecular en la base de las hojas cuando el suministro de carbono excede el flujo para el crecimiento y la respiración (Pollock y Eagles 1988; citados por Turner *et al.*, 2001); además los hidratos de carbono solubles en agua pueden acumularse en las láminas foliares. El equilibrio entre el crecimiento y la acumulación de reservas, por lo tanto determina la cantidad y calidad de la alimentación de los rumiantes en pastoreo.

En los sistemas intensivos, las praderas se cortan o pastorean con frecuencia en una etapa joven durante el periodo vegetativo (Whitehead, 2000; citado por Tas *et al.*, 2006). El pasto joven y la hoja se caracterizan por una alta concentración de proteínas solubles con una alta velocidad y extensión de la degradación en el rumen (Tamminga *et al.*, 1990). Como su principal fuente de energía, los microorganismos del rumen utilizan carbohidratos que se encuentran en el pasto fresco y están presentes principalmente como azúcares solubles, fructosanos y polisacáridos de la pared celular. Una vez liberado de las células, los hidratos de carbono solubles en agua se degradan casi instantánea y completamente. Sin embargo, la velocidad y el grado de degradación de los polisacáridos de la pared celular depende de la organización y la estructura de la pared celular (Boudon *et al.*, 2002).

Velasco *et al.* (2005) concluyeron que bajo las condiciones de su estudio, el mayor rendimiento de pasto digestible y proteína del ballico perenne se observó al cortar cada cuatro semanas, e independientemente de la frecuencia de corte, el 72 % del rendimiento anual de pasto se presentó en verano y primavera, mientras que la mayor tasa de crecimiento ocurrió en julio y la menor en enero.

En un estudio que evaluó la estacionalidad del crecimiento del ballico perenne durante un ciclo de crecimiento de ocho semanas, después del corte de uniformización, se alcanzó un máximo nivel de equilibrio conforme aumentó la cantidad de hojas verdes de la pradera, expresado como  $\text{kg MS ha}^{-1}$ , y en la primavera fue superior en 16 % al verano, en 39 % al otoño y 63 % al invierno; así mismo, el tiempo requerido para alcanzar el máximo rendimiento varió conforme a la estación y fue cuatro semanas en primavera, cinco semanas en verano y seis semanas en otoño e invierno, y una vez alcanzado este punto, la tasa de crecimiento comenzó a declinar como consecuencia de un aumento progresivo en material muerto y tallos; dichos incrementos fueron más altos en primavera y más bajos en invierno (Velasco *et al.*, 2002).

## 2.4. Senescencia foliar

La muerte celular programada (PCD, sigla en inglés) es un proceso genéticamente programado en el que una célula conduce la ejecución de su propia muerte; este proceso, tiene una serie de características: en las células del mesofilo verde, la PCD inicia en el cloroplasto, el cual pierde la estructura de las membranas tilacoidales y también la proteína soluble. El ADN se corta en sitios específicos, las células se condensan y se encogen, aunque las membranas suelen mantener su continuidad. La PCD se asocia con muchos procesos biológicos y las respuestas medioambientales, tanto en las células de animales como en las de plantas, aunque no todas las características típicas (por ejemplo, condensación de la cromatina y del ADN) son siempre evidentes; así, en las plantas la PCD puede tardar y las formas en que se presenta se reducen a dos tipos principales: el tipo asociado con la infección por patógenos (respuesta hipersensible) y el tipo asociado, o procedentes de, la senescencia. El primer tipo de muerte es rápida, mientras que el segundo es un proceso altamente regulado durante el cual nuevas vías metabólicas se activan y otras están apagadas (Carimi *et al.*, 2004).

La senescencia en las plantas se ha analizado frecuentemente partiendo de la base de que existe un determinismo genético que lleva a los organismos a envejecer y morir. El análisis desde la célula permite percibir la incidencia de factores de estrés durante el desarrollo de los organismos y la importancia del ambiente interno y externo en el determinismo genético. La interacción de la célula con el ambiente interno y externo definiría la organización, las formas, la senescencia y muerte celular durante la ontogenia (Trippi, 2008). Durante la senescencia los nutrientes almacenados en hojas senescentes se vuelven a movilizar y los procesos de degradación tienen lugar con el fin de mantener los órganos en desarrollo totalmente más jóvenes, como las hojas jóvenes, frutas o granos (Zalabák *et al.*, 2013).

Según Smart (1994), el proceso de senescencia está influenciado por factores internos (reproducción, reguladores de crecimiento, condición nutricional) y externos

(temperatura, condición hídrica y el ataque de patógenos); además, la duración del día e intensidad luminosa influye en el inicio de la floración, lo cual dispara la senescencia de las hojas. En plantas el amarillamiento de la hoja se acelera con cambios en la temperatura ambiente; si las raíces de plántulas de maíz se exponen dos minutos a 47.5 °C, la actividad fotosintética de la hoja y la acumulación de clorofila son inhibidas y disminuye el nivel de citocininas, y esta reducción dirige los síntomas de senescencia de las hojas de maíz (Smart, 1994).

La senescencia foliar es la última etapa en el desarrollo de una hoja y comprende el periodo desde la terminación de su alargamiento (madurez) hasta su muerte (Yoshida, 2003). La senescencia foliar resulta de la degradación coordinada de macromoléculas y posterior movilización de componentes (nitrógeno, carbono y minerales) a otras partes de la planta (Buchanan-Wollaston, 1997). Una de las características visuales principales de la senescencia foliar es el amarillamiento de la lámina seguido por la desecación y posterior abscisión de la hoja; el amarillamiento es debido a la pérdida diferencial de clorofilas y la retención parcial de carotenoides y xantofilas (Matile *et al.*, 1999; Zalabák *et al.*, 2013). La integridad de las membranas se pierde por un incremento en la peroxidación de lípidos, causado por un gran aumento en la generación de elementos oxidativos en el tejido (Del Río *et al.*, 1998). En el nivel celular o molecular, en adición a la desintegración del cloroplasto, los eventos que contribuyen a estos síntomas visuales incluyen la pérdida de proteínas y ácidos nucleicos de la célula (Zalabák *et al.*, 2013). En resumen, en los pastos la senescencia se manifiesta como la pérdida del área verde en la hoja y la aparición de tejido senescente o seco (Wilson *et al.*, 2008).

Uno de los rasgos distintivos durante la senescencia foliar es el cambio metabólico del catabolismo primario hacia el anabolismo (Smart, 1994). En la soya y el trigo la eliminación de estructuras reproductivas generalmente retrasa la senescencia de la hoja y de la planta entera (Nooden, 1984; Srivalli y Khanna-Chopra, 2004; citados por Schippers *et al.*, 2007). Así también, la senescencia de la hoja está típicamente

asociada con la pérdida de clorofila y disminución de su capacidad fotosintética (Rajcana *et al*, 1999).

La senescencia foliar es la fase final del desarrollo de una hoja y está influenciada por varias fitohormonas, como la citocininas y etileno que tienen las funciones más extensamente documentadas en el retraso o la inducción de la senescencia foliar. Además, otras fitohormonas, como el ácido abscísico, auxinas, ácido giberélico, ácido jasmónico y ácido salicílico, también tienen efectos sobre el proceso de senescencia (Schippers *et al.*, 2007). En las plantas, dos tipos de senescencia son evidentes: la senescencia mitótica y la senescencia post-mitótica (Gan, 2003; citado por Schippers *et al.*, 2007). Las células en las hojas sólo se dividen durante el desarrollo temprano y, por lo tanto, la senescencia de las hojas puede ser considerada post-mitótica (Schippers *et al.*, 2007).

## **2.5. Reguladores de crecimiento**

Un regulador de crecimiento vegetal se define como un compuesto orgánico distinto de los nutrientes y que en pequeñas cantidades estimula, inhibe o modifica cualquier proceso fisiológico, de crecimiento, o ambos, y además, procesos de diferenciación de las plantas (Weaver, 1997). Dentro de los reguladores de crecimiento vegetal se incluyen los promotores del crecimiento, auxinas, giberelinas y citocininas, y también los inhibidores del crecimiento como ácido abscísico y etileno (Taiz y Zeiger, 1998). Los promotores del crecimiento vegetal promueven o incrementan el crecimiento, elongación y división celular (Taiz y Zeiger, 1998) mientras que los inhibidores del crecimiento inhiben o retrasan procesos fisiológicos o bioquímicos de los vegetales. Los inhibidores naturales interactúan con los promotores del crecimiento en forma compleja para promover procesos de diferenciación u organogénesis *in vivo* o *in vitro* (Weaver, 1997).

Las citocininas son compuestos de bajo peso molecular que pertenecen a un grupo de fitohormonas con funciones cruciales en toda la vida de una planta, y en

contraste con hormonas animales que normalmente tienen un espectro muy estrecho de la acción, las fitohormonas generalmente tienen menos diversidad estructural y regulan muchos procesos fisiológicos y de desarrollo sinérgicamente. Hay dos tipos de citocininas, las de tipo *adenina* presentes en tejidos vegetales: raíz, tallo y hojas; y las de tipo *fenilurea* que no se encuentran en los vegetales y actúan como análogos estructurales (García, 2014). Estructuralmente, las citocininas son derivados de adenina que tienen una cadena lateral unida al grupo amino 6 del anillo purínico; la cadena lateral puede ser de naturaleza isoprenoides que son obicuos (zeatina, isopenteniladenina y dihidrozeatina) y aromáticos que son los menos abundantes (benciladenina, kinetina y topolina). Las citocininas naturales más importantes son isopenteniladenina (IPA) [N6-(2-isopentenil) adenina] y trans-zeatina (tZ) [N6-(4-hidroxi-3-metil-trans -2-butenil) adenina] (Zalabák *et al.*, 2013; García, 2014).

Las citocininas regulan muchos aspectos importantes del desarrollo de la planta en los órganos aéreos y subterráneos, siendo parte de una red genética intrínseca que controla tanto el desarrollo de órganos como el crecimiento de la planta (Werner *et al.*, 2009). Además regulan la morfogénesis y división celular y, de ese modo, los tejidos de actividad meristemática; retrasan el inicio de la senescencia; están involucradas en la dominancia apical; y tienen influencia en la flor y el desarrollo de la semilla, en la germinación de semillas y en la absorción y asimilación de nutrientes a los órganos de la planta. Lo anterior ha puesto de manifiesto su implicación crucial en diferentes rasgos de importancia agrícola, tales como la productividad, el aumento de la tolerancia a varias tensiones y la morfología general de la planta (Zalabák *et al.*, 2013).

Las citocininas, en presencia de auxinas, inducen la división celular en un material de crecimiento adecuado definido como medio y la diferenciación de plantas (Massoloa *et al.*, 2014). Las citocininas se encuentran en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas, y probablemente están presentes en cada tejido de las plantas, pero son más abundantes en los meristemas ubicados en el ápice de la raíz (Taiz y Zeiger, 1998) y se transportan al resto de la planta en el xilema (Buchanan-Wollaston, 1997). Las citocininas están involucradas en la dormancia y germinación de las semillas,

formación y liberación de yemas, expansión de las hojas, desarrollo reproductivo y retraso de la senescencia; además, son necesarias en algunos procesos posteriores a la replicación del ADN pero anteriores a la mitosis (Nooden *et al.*, 1988).

La función de las citocininas es clave en la senescencia foliar de muchas especies vegetales (Buchanan-Wollaston, 1997) y varios factores son importantes en la regulación de la senescencia: hormonas, luz, azúcares, disponibilidad de nutrientes, actividad metabólica, etc. (González Santos *et al.*, 2009). Un proceso normal de senescencia requiere un complejo balance entre estos reguladores. Las citocininas retrasan la senescencia e incluso causan reverdecimiento de hojas amarillas en *Nicotiana tabacum* (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). El retraso de la senescencia por citocininas ocurre en maíz (*Zea mays*) (Smart, 1994), trigo (*Triticum aestivum*) (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008) y pasto ovillo (Willson *et al.*, 2008). Así también, la citocinina se ha utilizado para retrasar la senescencia en una serie de cultivos. En un experimento con aplicaciones de la citocinina sintética N6-bencilaminopurina (BAP) se redujo la expresión de los genes de clorofila-degradantes en brócoli (Gómez-Lobato *et al.*, 2012) y se retrasó el desmantelamiento cloroplasto y el color amarillento en las hojas (Ben-Yaakov *et al.*, 2006). En las frutas las citocininas se ha utilizado sobre todo antes de la cosecha y su uso post-cosecha se hace principalmente en materias primas para retrasar su deterioro en almacén (Massoloa *et al.*, 2014).

El hecho de que la citocinina puede retrasar la senescencia se conoce desde que se aisló primero la kinetina y su efecto fue probado por Miller y colaboradores en 1955 (Zalabák *et al.*, 2013). El mecanismo de este proceso de antisenescencia radica en la inhibición de la degradación de la clorofila y proteínas del aparato fotosintético (He *et al.*, 2005). Las citocininas tienen un efecto fuerte en el retraso de la senescencia de las hojas (Schippers *et al.*, 2007). Aplicaciones externas de la citocinina BAP retrasan la degradación de clorofila, y la proteína LHCP-2, la cual es responsable de la captación de luz en el tilacoide del cloroplasto, y en condiciones de baja iluminación las citocininas pueden revertir el proceso de amarillamiento foliar y reverdecer las hojas, promoviendo el ensamblaje del cloroplasto envejecido, lo cual podría observarse como

reverdecimiento (Zavaleta *et al.*, 1999). También se ha observado que la reducción de los niveles endógenos de citocinina causa una senescencia acelerada (Masferrer *et al.*, 2002; citados por Schippers, 2007). La caída en los niveles de citocinina antes del inicio de la senescencia podría ser una señal clave para la iniciación de la misma (Nooden *et al.*, 1990, Gan y Amasino, 1995; citados por Schippers, 2007).

La citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) y sus derivados son sustancias activas y promotoras del crecimiento, se obtienen de manera fácil de la planta y son considerados como compuestos puramente sintéticos. Sin embargo, algunos de ellos también se han detectado e identificado en diferentes tejidos de la planta. La citocinina BAP es también una de las utilizadas en muchos sistemas de micro propagación, pero su aplicación causa desventajas en algunos cultivos, incluidos los problemas de aclimatación, la heterogeneidad en el crecimiento y la inhibición del enraizamiento. Una forma de eliminar los efectos secundarios negativos podría basarse en el desarrollo y análisis de los derivados de BAP que no presentan efectos secundarios no deseados (Dolezal *et al.*, 2006).

La BAP es una citocinina que podría regular las actividades del sistema de defensa antioxidante de las plantas. Los efectos de la citocinina en los sistemas celulares han recibido una gran atención en las décadas más recientes debido a la creciente aplicación de citocinina en cultivos de plantas. BAP, como una de las citocininas sintéticas de primera generación, se ha utilizado para estimular la división celular, la aparición de la yema lateral (manzanas, naranjas), la formación de brotes basales (rosas, orquídeas), la floración (ciclamen, cactus) y cuajado de frutos (uvas, naranjas, melones). También se considera como un compuesto adecuado para las aplicaciones posteriores a la cosecha y se utiliza como un bioplaguicida en los EE.UU. y Canadá. Varias investigaciones muestran que BAP retrasaría la producción de especies reactivas de oxígeno, y regularía el estado oxidativo de los tejidos; además tiene una estrecha relación con el sistema de defensa antioxidante de las plantas (Zavaleta *et al.*, 2007, Qin *et al.*, 2014).



## 2.6. Pigmentos fotosintéticos e índice de verdor

La medición de clorofila es un método para estudios de producción en plantas, y su utilización se ha difundido en mayor grado de manera reciente porque su costo disminuía las posibilidades de su uso de manera rutinaria anteriormente. Ahora, el uso del medidor de verdor SPAD-502 ha permitido que el índice de verdor se haya convertido en un sistema útil en estos estudios (Mirassón *et al.*, 2010). Una de sus aplicaciones la mostraron Loewy *et al.* (2008) para evaluar la nutrición nitrogenada y utilización de azufre en trigo; los resultados señalaron efectos significativos de estos compuestos en el índice de verdor.

El SPAD usa diodos emisores de luz a 650 y 940 nm para emitir luz a través de la hoja, la luz en 650 nm está en la zona de las longitudes de onda asociadas con la absorción clorofílica, mientras que la longitud de onda a 940 nm actúa como una referencia interna; la diferencia de transmitancia a 650 y 940 nm da un índice de verdor con el cual se puede establecer una relación con el contenido de clorofila extraíble. Cuando las plantas presentan una buena disponibilidad hídrica, la determinación de clorofila con el SPAD da un resultado similar al obtenido cuando se extrae la clorofila (Mirassón *et al.*, 2010). De acuerdo con Marengo *et al.* (2009), hay correlaciones entre el SPAD y las concentraciones de clorofila y nitrógeno en las hojas en muchas especies, y además las ecuaciones de calibración del contenido de clorofila como una función de los valores de SPAD generalmente son específicas para las especies e incluso para los cultivares.

### 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 3.1. Objetivo general

- Estudiar el efecto de la citocinina BAP en la producción, senescencia y degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de tres concentraciones de BAP (0.1, 0.01, 0.001 mM) en el crecimiento, senescencia, pigmentos fotosintéticos, proteína y componentes botánicos de *Lolium perenne* L. en invernadero.
- Analizar el efecto de tres concentraciones de BAP (0.1, 0.01, 0.001 mM) en el contenido de compuestos nitrogenados, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de *Lolium perenne* L. en invernadero.
- Estudiar el efecto de tres concentraciones de BAP (0.1, 0.01, 0.001 mM) en la degradación *in vitro* de la pared celular de *Lolium perenne* L.

#### 3.3. Hipótesis

- La citocinina BAP promoverá el aumento de la biomasa seca, crecimiento de hoja y reducción de senescencia de *Lolium perenne* L. con un comportamiento dosis respuesta.
- La composición química de *Lolium perenne* L. se modificará por efecto del regulador de crecimiento.
- La citocinina BAP aumentará la degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Localización, material biológico y duración del experimento

El experimento se llevó a cabo en instalaciones el campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, en el Estado de México (98° 48' 27" O, 19° 48' 23" N). La fase de campo se realizó en un invernadero tipo sierra de un solo túnel de cubierta plástica. La fase de laboratorio para la cuantificación química de pigmentos fotosintéticos se llevó a cabo en el laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal. Las determinaciones de FDN, FDA, nutrientes nitrogenados y degradación *in vitro* del ballico perenne se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería.

Para este experimento se utilizaron 68 macetas de 24 cm de diámetro y 22 cm de profundidad; el sustrato para el llenado de cada maceta fue una mezcla en relación 1:1:1 de suelo arcillo-arenoso, agrolita esteril y peat-moss comercial (PRO- MIX FLEX).

Para la siembra de la semilla en cada maceta se utilizó una densidad de 25 kg ha<sup>-1</sup> de semilla de *Lolium perenne* L. variedad Linn, y la cantidad de semilla por maceta se calculó obteniendo el peso promedio de 100 semillas y se extrapolo el peso de la semilla al área de cada maceta, dando como resultado una densidad de siembra por maceta de 66 semillas. La siembra se realizó el día 24 de agosto de 2012 y el espaciamiento entre riegos fue de tres a cuatro días.

La fase experimental comenzó el día 16 de abril de 2013 con un corte de homogenización del pasto a 5 cm de altura sobre el nivel del sustrato de cada maceta. Este experimento concluyó el día 6 de agosto del mismo año y tuvo una duración de 110 días.

## 4.2. Diseño experimental, tratamientos, variables y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con tres tratamientos de BAP y un testigo sin la fitohormona. Entonces, los tratamientos fueron las siguientes soluciones:

T1: 0.1 mM citocinina BAP.

T2: 0.01 mM citocinina BAP.

T3: 0.001 mM citocinina BAP.

T0: testigo sin BAP.

La citocinina BAP se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) (0.02 %) y luego se agregó 0.02 % de Tween 20 para romper la tensión superficial y facilitar la penetración del regulador en la hoja. La solución testigo se preparó de la misma forma que las soluciones con citocinina pero no se agregó el BAP. Las soluciones se conservaron a 4 °C por un máximo de dos semanas.

Cuando las plantas cumplieron ocho meses de edad (16 de abril de 2013) se realizó un corte de homogenización. A los 21 días de rebrote, las plantas se asperjaron (17:00 a 20:00 h) cada siete días, con la solución de citocinina BAP, hasta la séptima semana (63 días después del corte, DDC) y completar siete aplicaciones.

### 4.2.1. Crecimiento y senescencia foliar de *Lolium perenne* L.

En este experimento se utilizaron 20 macetas con *Lolium perenne* L. de ocho meses de edad. Los tratamientos se distribuyeron al azar, por lo cual quedaron cinco macetas en cada tratamiento. En cada maceta se marcaron (al azar) cinco tallos, con anillos de colores en la base.

El crecimiento y senescencia foliar se midió de acuerdo con Bircham y Hodgson (1983) durante 105 días (de 7 a 112 DDC). En cada tallo se midió la longitud verde y total de cada hoja (lámina) con una regla de 1 mm de precisión. La longitud foliar

senescente se calculó como la diferencia entre la longitud total de la lámina y la longitud de la parte verde de la misma.

Las longitudes obtenidas de la lámina foliar verde se sumaron y se dividieron entre el número de hojas en cada tallo y el resultado se reportó como crecimiento acumulado de la hoja. De igual forma, se hizo este cálculo para la parte senescente y se reportó como senescencia acumulada de la hoja. Una vez obtenidas estas dos variables se calculó el crecimiento neto como la diferencia entre el crecimiento acumulado y la senescencia acumulada.

#### **4.4.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos y proteínas solubles en hojas de *Lolium perenne* L.**

Para estas variables se usaron las mismas 20 macetas en las cuales se midió el crecimiento y senescencia. Se marcaron 80 hojas jóvenes (14 DDC) de la misma longitud por tratamiento, con corrector blanco sobre el tallo y se muestrearon cinco hojas, por tratamiento, cada dos semanas durante 16 semanas (14 DDC a 112 DDC).

Para determinar clorofila *a*, clorofila *b*, y xantofilas+carotenoides, se tomaron muestras de 300 mg de la parte media de cada una de cinco hojas por tratamiento, se maceraron en 5 mL de acetona 80 % a 4 °C y el extracto se centrifugó 10 min a 840 *g*. El sobrenadante fue recuperado y ajustado a 5 mL. La concentración de cada pigmento se calculó con la fórmula de Lichtenthaler y Wellburn (1983) y se expresó en mg g<sup>-1</sup> peso fresco (PF).

Para la determinación de proteínas solubles, se extrajeron muestras de 300 mg de la parte media de cada una de tres hojas por tratamiento y se cuantificaron con el método de Bradford (método colorimétrico) usando albúmina de suero bovino como estándar.

#### **4.4.3. Composición morfológica y composición química.**

Para esta determinación se utilizaron las 48 macetas restantes y se muestreó cada cuatro semanas (14 de mayo, 11 de junio, 9 de julio y 6 de agosto).

La parte aérea se separó en sus componentes: hoja, tallo y material muerto, y luego se secaron en una estufa a una temperatura de 55 °C durante 48 horas, hasta peso constante.

El material seco se procesó en un molino (Thomas-Wiley modelo 4) con tamiz de malla 30, obteniendo así una muestra homogénea. El contenido de nutrientes nitrogenados fue analizado por el método de proteína total de Van Soest *et al.* (1991), y la FDN y la FDA por el método de ANKOM (2006).

#### **4.4.4. Degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L.**

Para esta variable se usó material seco, molido según se describe anteriormente. Esta determinación fue realizada por el método de ANKOM manejando cuatro horarios de incubación (6, 12, 24 y 48 horas). El fluido ruminal se obtuvo de un novillo Holstein de un peso aproximado de 450 kg con una cánula ruminal y alimentado con una mezcla de ensilado de maíz y heno de alfalfa y con acceso libre al agua. El fluido ruminal se recogió antes de la alimentación a las 08:00 horas.

#### **4.4.5. Análisis estadístico.**

Para el caso de crecimiento y senescencia foliar cada maceta fue una repetición y cada tallo la unidad experimental. Para la determinación de proteína soluble por el método de Bradford hubo tres repeticiones por tratamiento; en la variable pigmentos fotosintéticos se usaron cinco repeticiones (hoja) por tratamiento y para las variables contenido de nutrientes nitrogenados, FDN, FDA y degradación *in vitro* se utilizaron tres repeticiones por tratamiento considerando a cada maceta como unidad experimental y repetición.

Con los datos de las variables de crecimiento foliar, senescencia foliar y crecimiento foliar neto, se calculó el valor de regresión ( $R^2$ ) y se muestra la ecuación de la curva que mejor describe el comportamiento de la variable.

La comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey,  $P < 0.05$ , y los resultados se analizaron con el procedimiento para medidas repetidas en el tiempo MIXED (SAS 9.0, 2004).

El modelo estadístico utilizado se muestra a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \delta_{j(i)} + P_k + (\tau P)_{ik} + E_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable respuesta en la observación  $k$ .

$\mu$  = Media general.

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\delta_{j(i)}$  = Error aleatorio asociado con el  $j$ -ésimo sujeto dentro del  $i$ -ésimo tratamiento.

$P_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo periodo.

$(\tau P)_{ik}$  = Interacción tratamiento x periodo.

$E_{ijk}$  = Error aleatorio asociado con la  $k$ -ésima medida repetida dentro del  $j$ -ésimo tratamiento.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Crecimiento y senescencia foliar de *Lolium perenne* L.

El testigo tuvo el menor crecimiento acumulado promedio ( $101.01 \pm 4.68$  mm tallo<sup>-1</sup>) y el menor crecimiento neto promedio ( $49.06 \pm 2.93$ ), pero mostró la menor senescencia acumulada promedio ( $51.69 \pm 2.32$ ). Según el análisis de los datos, el tratamiento con los valores más altos en crecimiento acumulado y neto fue T3.

El crecimiento acumulado y crecimiento neto presentaron diferencias significativas a través del tiempo durante todo el experimento, lo cual no ocurrió para senescencia acumulada en la cual, durante las tres primeras semanas, la respuesta de los tratamientos no fue diferente ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 1. Crecimiento foliar neto, senescencia y crecimiento foliar acumulado en *Lolium perenne* L. (mm tallo<sup>-1</sup>) asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.

Variable	Tratamientos				EEM	P < F		
	T0	T1	T2	T3		Trat.	Tiempo	Trat*tiempo
Crecimiento acumulado	101.01 <sup>c</sup>	127.69 <sup>ab</sup>	111.47 <sup>abc</sup>	127.89 <sup>a</sup>	4.68	0.0019	0.0001	0.0001
Senescencia	51.96 <sup>b</sup>	61.86 <sup>a</sup>	53.98 <sup>ab</sup>	59.06 <sup>ab</sup>	2.32	0.0300	0.0001	0.0001
Crecimiento neto	49.06 <sup>c</sup>	65.82 <sup>ab</sup>	57.48 <sup>abc</sup>	68.83 <sup>a</sup>	2.93	0.0090	0.0001	0.0001

Medias con diferente literal en un renglón son diferentes ( $P < 0.05$ ); EEM= Error estándar de la media. La prueba de Tukey se utilizó para la comparación múltiple de medias. Los datos son promedio de  $n= 25$  y mediciones semanales durante cuatro meses.

Al inicio del crecimiento después del corte, la tasa de crecimiento y pérdida de pasto son lentas; posteriormente, la tasa de crecimiento se acelera y supera a la de



senescencia, y conforme el pasto madura la tasa de crecimiento es balanceada por el aceleramiento de la tasa de senescencia, y la producción neta llega a ser mínima. El crecimiento acumulado en el presente experimento se mantuvo constante (Figura 1), la senescencia aumentó de manera pronunciada desde la semana seis a la nueve (Figura 2), mientras que el mayor crecimiento neto del *Lolium perenne* se da en las primeras seis semanas después del corte de homogenización (Figura 3).

La figura 1 muestra el comportamiento del crecimiento foliar acumulado de *Lolium perenne* L. La curva que mejor describe el comportamiento de esta variable a través del tiempo es una curva polinómica debido a que hay pequeñas fluctuaciones, cambiando los datos de dirección más de una vez. Además el valor de  $R^2$  fue 0.97, lo cual indica un buen ajuste de la línea respecto a los datos.

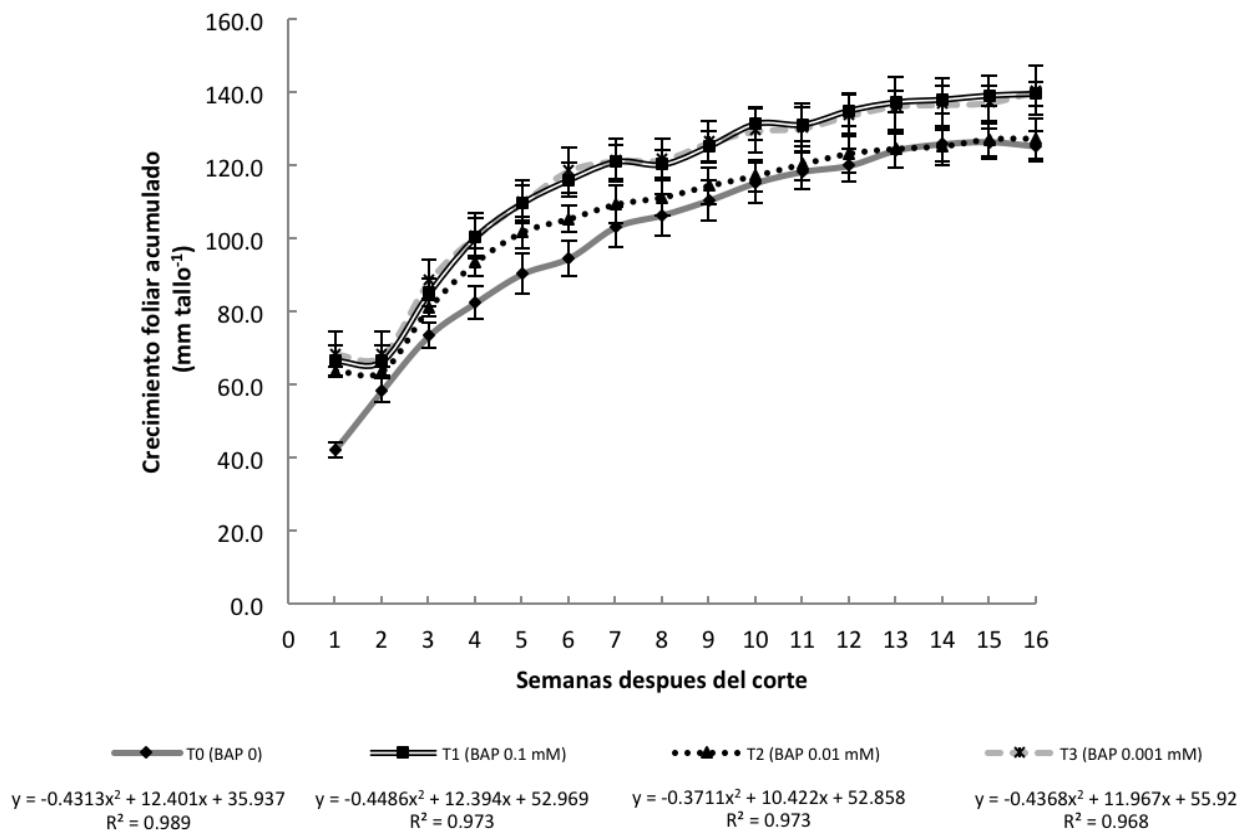


Figura 1. Crecimiento foliar acumulado de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de  $n=25 \pm SE$ .

La línea de tendencia que mejor se ajusta para los datos de senescencia fue una curva potencial, cuya  $R^2$  fue 0.94 promedio para los cuatro tratamientos (Figura 2). La curva describe como los valores aumentan a un ritmo específico y se observa mejor este crecimiento potencial a partir de la semana seis después del corte de homogenización.

El beneficio de los tratamientos con BAP en *Lolium perenne* se reflejó en el aumento significativo del crecimiento acumulado de la hoja. Aspersiones semanales con BAP 0.1 mM y 0.001 mM promovieron la elongación de la hoja de manera continua durante 16 semanas. En la semana seis las plantas tratadas aumentaron ( $P < 0.05$ ) su crecimiento y en la semana 16 el crecimiento acumulado fue 25.7 % superior al testigo. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el pasto *Dactylis glomerata* con ganancia del 36 % de crecimiento acumulado con respecto al testigo, con tratamiento de 0.1 mM BAP (Wilson *et al.*, 2008). Sin embargo el tratamiento con BAP en *Lolium perenne* no redujo la senescencia con respecto al testigo y valores obtenidos fueron similares entre tratamientos (Cuadro 1), en contraste con los resultados obtenidos en *Dactylis glomerata* (Wilson *et al.*, 2008) en los cuales hubo una reducción de la senescencia del 29 % de material muerto con respecto al testigo.

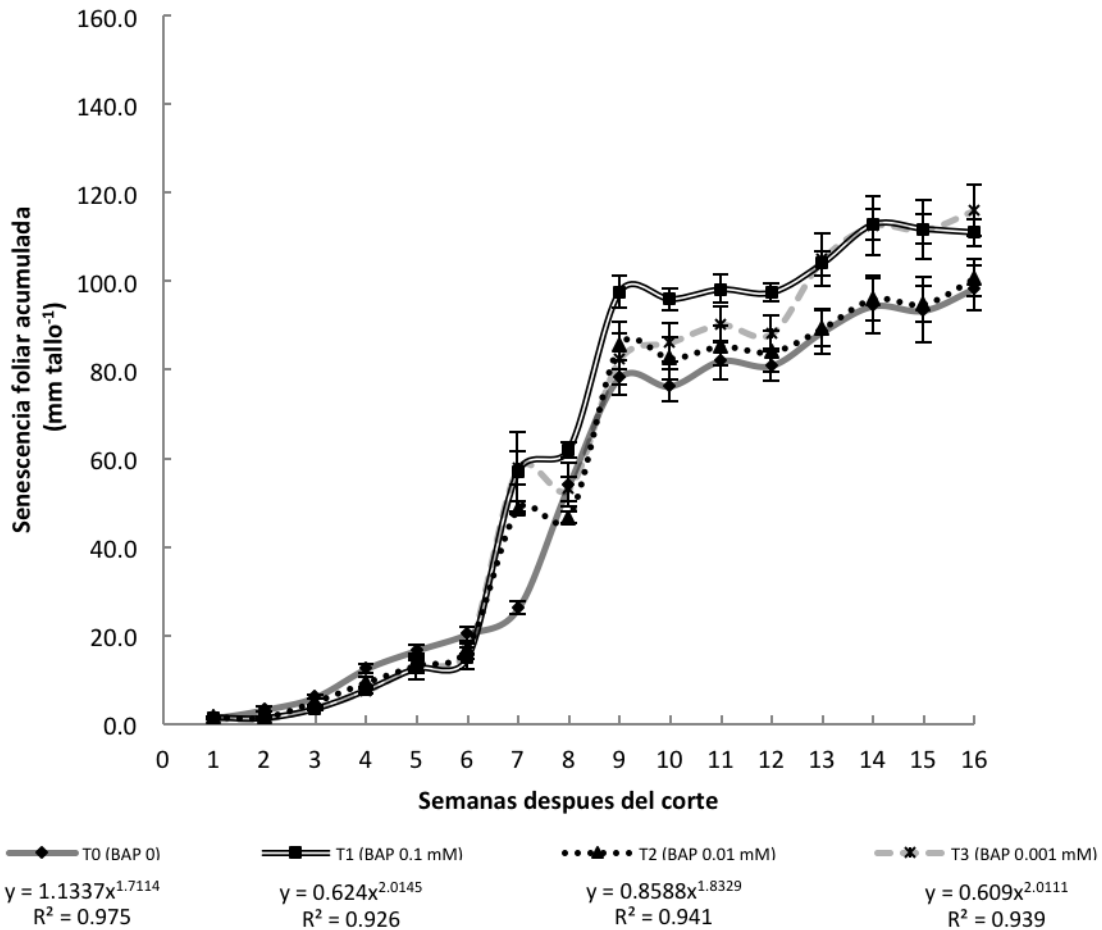


Figura 2. Senescencia foliar acumulada de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de  $n=25 \pm SE$ .

En general, las citocininas producen un retraso en la senescencia de la hoja, como se encontró en especies como *Triticum aestivum* (Xie *et al.*, 2004), floretes de *Brassica oleraceae* (Costa *et al.*, 2005), *Zea maiz* (He *et al.*, 2005), *Oriza sativa* (Ookawa *et al.*, 2004) y *Dactylis glomerata* (Wilson *et al.*, 2008), las cuales fueron asperjadas con BAP. Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos por los autores mencionados, Carimi *et al.* (2004) señalan que la adición de dosis altas de BAP a las plantas y suspensiones de células cultivadas de *Arabidopsis thaliana* y *Daucus carota*, induce la muerte celular programada por la aceleración de la senescencia. De igual forma, en plántulas de zanahoria (de línea 'Pisa') regenerado por embriogénesis

somática y plantas de semillero de *Arabidopsis* (Columbia), donde se añadió BAP a diferentes concentraciones (4, 13 y 27  $\mu\text{M}$ ), la presencia de BAP en el medio induce un color amarillento más rápida de la hoja y una fragmentación precoz del ADN, tanto en la zanahoria como en *Arabidopsis*, la muerte celular en las células a los siete días de edad y tratadas con BAP (es decir, después de cuatro días de exposición al BAP) es cuatro veces mayor que en las células del grupo testigo de siete días de edad; estos resultados indican que la respuesta a las citocininas es genotipo dependiente. En el caso de *Lolium perenne* bajo las condiciones del presente experimento con temperaturas promedios diurnas mínimas de 10 °C y máximas de 38 °C, BAP no retrasa la senescencia pero la fitohormona es efectiva para promover el crecimiento en condiciones de temperaturas altas para la variedad Linn de *Lolium perenne* que podrían considerarse no óptimas (Velasco *et al.*, 2002). Esto sugiere que las aspersiones con concentraciones bajas (0.001 mM) de BAP se podrían recomendar para promover el crecimiento de praderas en los periodos de bajo crecimiento (otoño e invierno).

Lo anterior sugiere que la citocinina 6-bencilaminopurina tiene un efecto paradójico, dependiendo de las dosis aplicadas y la sinergia o antagonismo con otras señales, ya sean endógenas como otras fitohormonas o exógenas como la luz (Brault *et al.*, 1999). Como lo señalaron Jeli y Bogdanovi (1990), en plántulas de pino donde la síntesis de clorofila fue deprimida por el ácido abscísico (ABA) y estimulada por citocininas (benciladenina, zeatina y ribósido zeatina), los efectos dependen del tipo de citocinina y la concentración aplicada. Otro ejemplo de la relación de citocinina con otra fitohormona es el efecto antagónico que puede tener con las auxinas; en *Phaseolus vulgaris*, la auxina producida por el ápice del brote impide el desarrollo de yemas axilares, mientras que la aplicación de las citocininas en estos brotes induce su desarrollo (Brault *et al.*, 1999).

En el presente experimento el análisis de los resultados sugiere que al aumentar la concentración de BAP aplicada al ballico perenne, la senescencia es mayor así como el crecimiento neto. Las diferencias entre los tratamientos fueron significativas ( $P = 0.03$ ), pero la magnitud de las diferencias no fueron elevadas.

Para describir el comportamiento de los datos de crecimiento neto se utilizó una línea de tendencia exponencial con una  $R^2$  0.69 promedio. De esa manera se muestra como el crecimiento neto disminuye a intervalos cada vez mayores a medida que envejece la planta. Anteriormente se mencionó que, de acuerdo con Velasco *et al.* (2002), la edad adecuada para cosechar la planta varía de 4 a 6 semanas, puesto que a partir de esta edad la planta reduce su tasa de crecimiento, las hojas disminuyen su capacidad fotosintética y senescen las primeras hojas. En un manejo adecuado para una pradera, la parte aérea de la planta debe ser removida, dejando intactos los puntos de crecimiento de la misma, ubicados en el ápice vegetativo donde se originan las nuevas hojas y se encuentran las yemas axilares. Para la formación de estas nuevas hojas, la planta utiliza sus reservas nutricionales almacenadas en las raíces durante sus primeras seis semanas de edad; una vez que las hojas inician su actividad fotosintética, el exceso de nutrientes asimilados por ellas a través de la fotosíntesis se va a las raíces donde se almacena y serán utilizados nuevamente para iniciar el ciclo de la planta. Si se dejara la parte aérea de la planta en la pradera, uno de los problemas principales es la acumulación de material muerto en la pradera y el sombreado de la parte inferior de la planta, disminuyendo la capacidad de la luz solar de llegar a las hojas jóvenes con mayor capacidad fotosintética y, además, la calidad nutricional en general de la pradera disminuye.

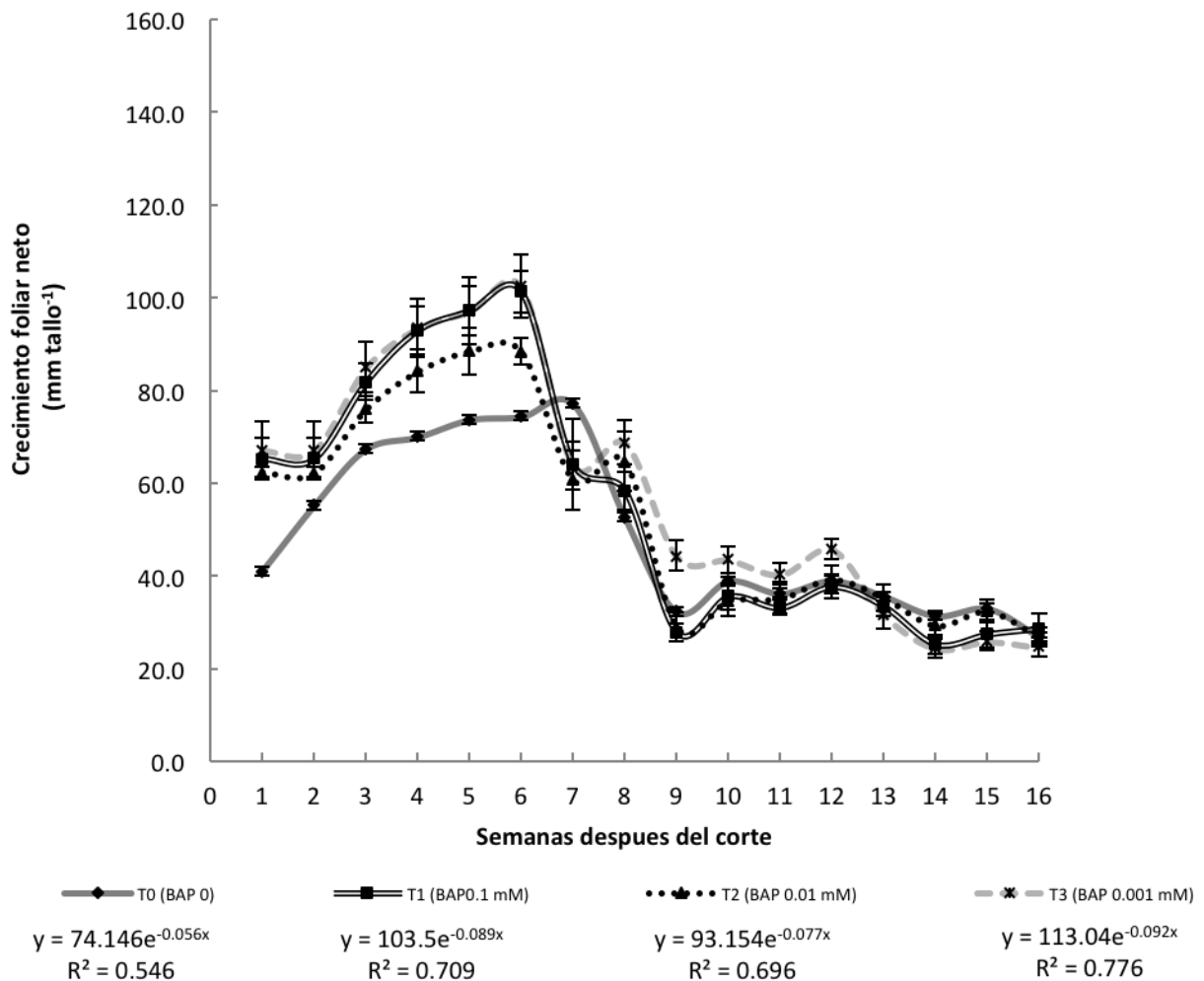


Figura 3. Crecimiento foliar neto de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de  $n=25 \pm SE$ .

## 5.2. Pigmentos fotosintéticos.

Las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, xantofila y carotenoides), no presentaron diferencias significativas entre tratamientos y solamente cambiaron en el tiempo (Figura 4, 5, 6). La característica más visible de la senescencia foliar es el cambio de color de la hoja verde a amarillo o rojo y estos cambios se deben a que la clorofila se degrada más rápido que los carotenoides. Por lo tanto, la desaparición de la clorofila se utiliza comúnmente como un síntoma de la

senescencia foliar (Rajcana *et al.*, 1999). En otros estudios, aplicaciones externas de BAP (0.1 mM) retrasaron el amarillamiento foliar de la gramínea *Triticum aestivum* (Zavaleta *et al.*, 2007), *Nicotiana rustica* (Zavaleta *et al.*, 1999) y otros. En contraste, en el caso del forraje *Dactylis glomerata* la senescencia es estudiada como la longitud de la fracción senescente de la hoja ( $\text{cm tallo}^{-1}$ ) y no como el amarillamiento de la misma.

En el presente estudio la aplicación de citocinina BAP de manera foliar en *Lolium perenne* L. no tuvo efecto en la concentración de pigmentos fotosintéticos. La mayor cantidad de clorofila *a* ( $1.18 \pm 0.055$ ), clorofila *b* ( $1.05 \pm 0.038$ ) y carotenoides ( $0.49 \pm 0.019$ ) fue a los 28 DDC, 42 DDC y 28 DDC ( $P < 0.05$ ), respectivamente (Cuadro 2; Figura 4, 5 y 6). Después de esos días, el contenido disminuye en todos los tratamientos de manera constante.

Cuadro 2. Contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, xantofilas + carotenoides, clorofila total y proteína soluble en extracto de hojas de *Lolium perenne* L. ( $\text{mg g}^{-1}$  PF) asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.

Variable	Tratamientos				EEM	P < F		
	T0	T1	T2	T3		Trat.	Tiempo	Trat*tiempo
Clorofila <i>a</i>	0.83 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.76 <sup>a</sup>	0.037	0.3136	0.0001	0.4404
Clorofila <i>b</i>	0.61 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.61 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>	0.036	0.752	0.0001	0.0723
Xantofilas + carotenoides	0.35 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.013	0.2715	0.0001	0.5658
Clorofila total	1.43 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	1.35 <sup>a</sup>	1.39 <sup>a</sup>	0.053	0.7285	0.0001	0.3937
Proteína soluble	2.92 <sup>ab</sup>	3.55 <sup>a</sup>	3.20 <sup>ab</sup>	2.72 <sup>b</sup>	0.161	0.0304	0.0001	0.5707

Medias con diferente literal en un renglón son diferentes ( $P < 0.05$ ); PF = Peso fresco; EMM = Error estándar de la media. La prueba de Tukey se utilizó para la comparación múltiple de medias. Los datos son promedio de  $n=5$ .

Los tratamientos de 0.1 mM (T1) y 0.01 mM (T2) de BAP aumentaron significativamente ( $P < 0.05$ ) el contenido de proteína soluble (aminoácidos totales) con  $3.55 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en T1 y  $3.20 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  en T2, pero la concentración más baja de BAP (0.001 mM; T3) causó un valor de  $2.72 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  el cual no fue diferente al del testigo T0 ( $2.92 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ ).

Las citocininas pueden promover la síntesis de proteínas cloroplásticas, las cuales constituyen 70 % de toda la proteína de la hoja verde (Dangl *et al.*, 2000). En otros estudios, aspersiones con 0.1 mM BAP retrasan la pérdida de clorofila y el contenido de proteínas solubles en *Dactylis glomerata*, *Triticum aestivum* y *Nicotiana rustica* (Wilson-García 2008; Zavaleta *et al.*, 2007; Zavaleta *et al.*, 1999a).

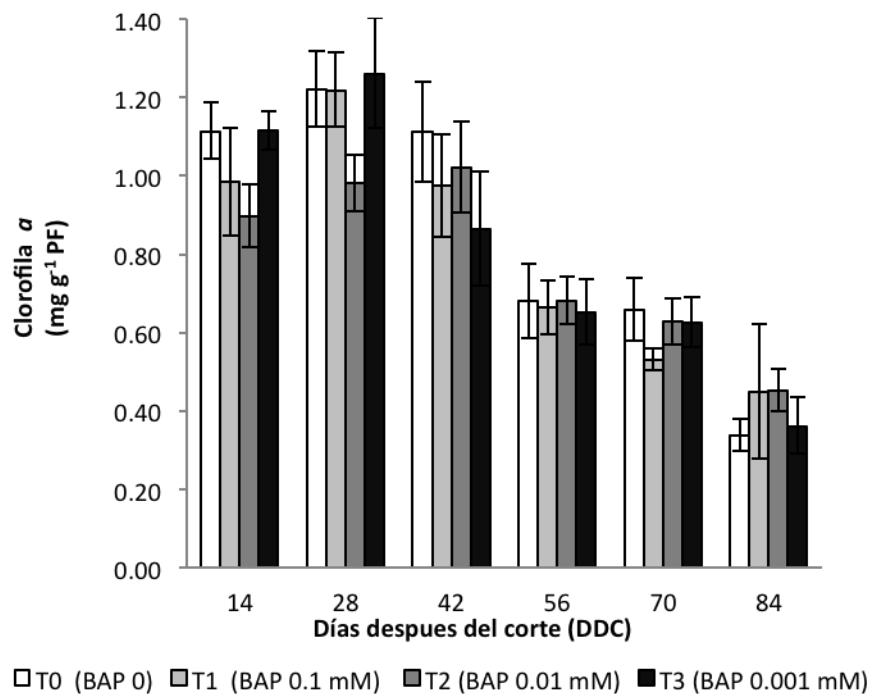


Figura 4. Contenido de clorofila  $a$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{ PF}$ ) en hojas de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de  $n=5 \pm \text{SE}$ .

Una fracción considerable de las citocininas en la hoja se localiza en los cloroplastos, y estas citocininas activan la diferenciación etioplasto en la oscuridad y el



desarrollo de cloroplasto a la luz (Khokhlova *et al.* 1971, Chory *et al.* 1991, citados por Kulaeva *et al.*, 2002). Según Kulaeva *et al.* (2002), la evidencia experimental es abundante respecto a que la citocinina activa la síntesis de las proteínas codificadas por los cloroplastos, aumenta la producción de pigmentos fotosintéticos, y estimula la diferenciación estructural de cloroplasto.

En estudios realizados por Zavaleta-Mancera *et al.* (2007), se encontró que el retraso en la senescencia por efecto de BAP estaba asociado con la retención de pigmentos fotosintéticos, la preservación de la estructura del cloroplasto, la promoción de la síntesis de Rubisco, la proteína cosechadora de luz (LHCP-2), citocromo f (Cyt f) y el aumento de la actividad antioxidante de catalasa y ascorbato peroxidasa. La degradación de la clorofila lleva al amarillamiento de la hoja, el cual es el síntoma principal de la senescencia (Matile *et al.*, 1996). El cloroplasto es el primer organelo en la célula verde que muestra signos de decaimiento, y se reconoce que la aplicación exógena de citocinina retrasa la degradación de clorofila y proteínas fotosintéticas (Gan y Amasino, 1996). En contraste, inoculaciones de larga duración con concentraciones altas de BAP (200 mM) tienen un efecto adverso porque reducen el contenido de pigmentos fotosintéticos, efecto acompañado por la inhibición del fotosistema II y transporte de electrones (Prokopová *et al.* 2010). Los resultados del presente experimento indican que el aparato fotosintético de *Lolium perenne* es menos sensible al efecto de las citocininas que otras especies.

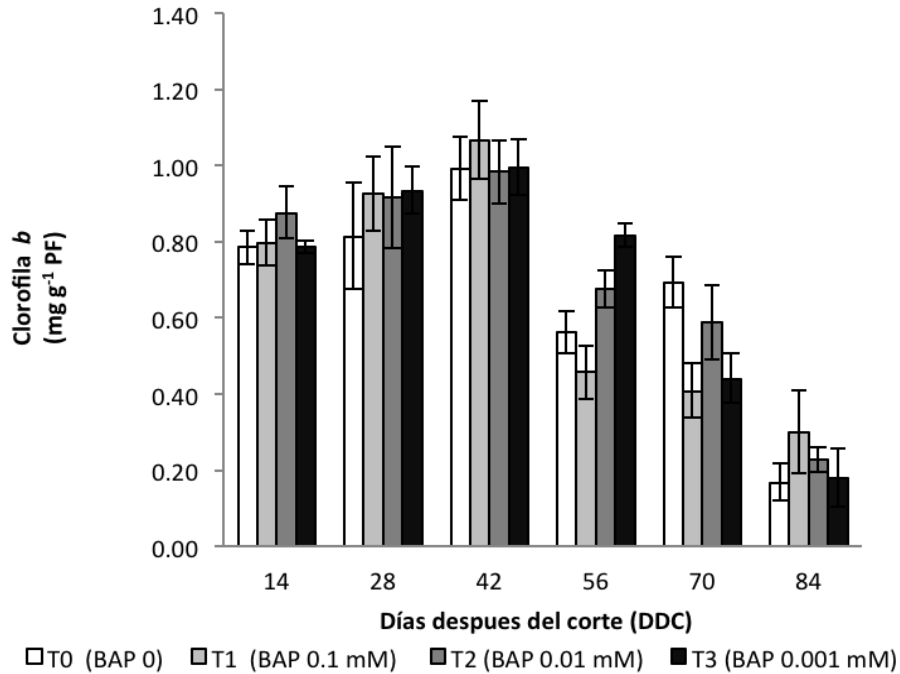


Figura 5. Contenido de clorofila *b* ( $\text{mg g}^{-1}$  PF) en hojas de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de  $n=5 \pm \text{SE}$ .

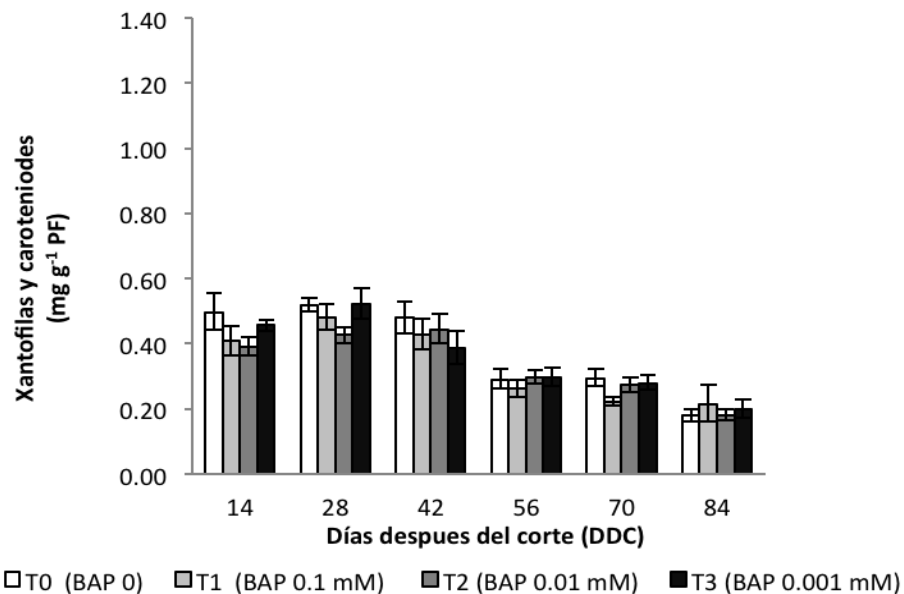


Figura 6. Contenido de xantofilas y carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}$  PF) en hojas de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin

BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de  $n=5 \pm SE$ .

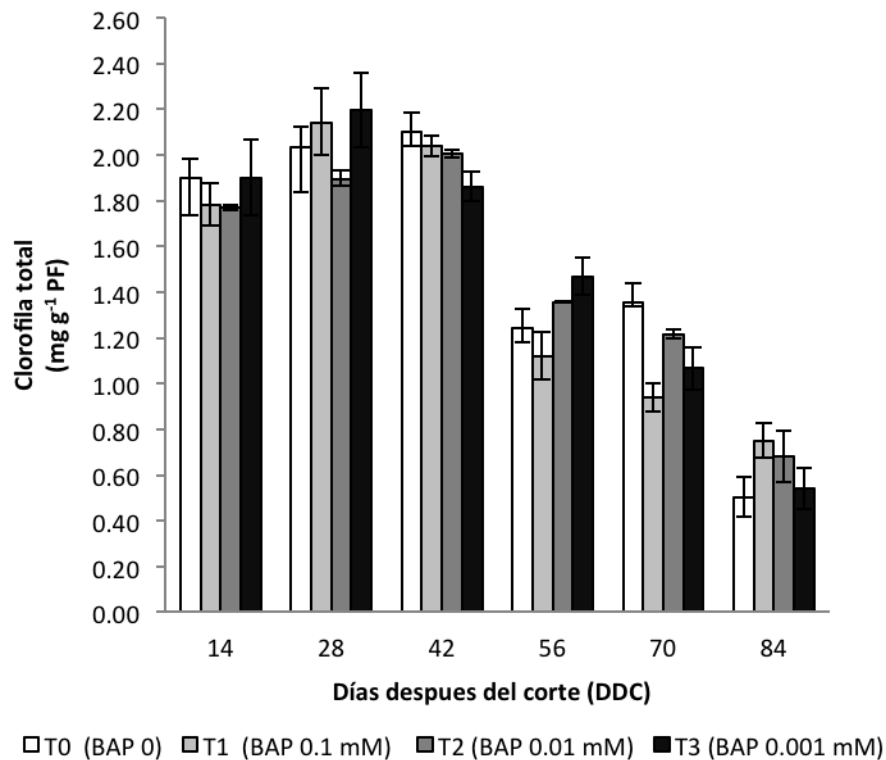


Figura 7. Contenido de clorofila total: clorofila *a* + clorofila *b* ( $\text{mg g}^{-1}$  PF) en hojas de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de  $n=5 \pm SE$ .

La disminución de los pigmentos fotosintéticos conforme aumenta la edad de la planta, como se aprecia en las gráficas anteriores (Figuras 5, 6, 7), se debe a la degradación de clorofila del cloroplasto cuyo proceso está incluido en la senescencia, así como el deterioro de la estructura celular y degradación de macromoléculas (Chen *et al.*, 2008).

En la figura 8 se muestra el valor del índice relativo de verdor el cual indica la apariencia verde de la hoja, y que fue el resultado del cociente de clorofila total entre las xantofilas+carotenoides. El tratamiento T2 obtuvo los mayores valores al inicio y al final del experimento respecto a los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ); a medida que transcurrió

el tiempo hubo algunas fluctuaciones pero se mantuvieron relativamente altos y constantes los valores de este índice en el tiempo.

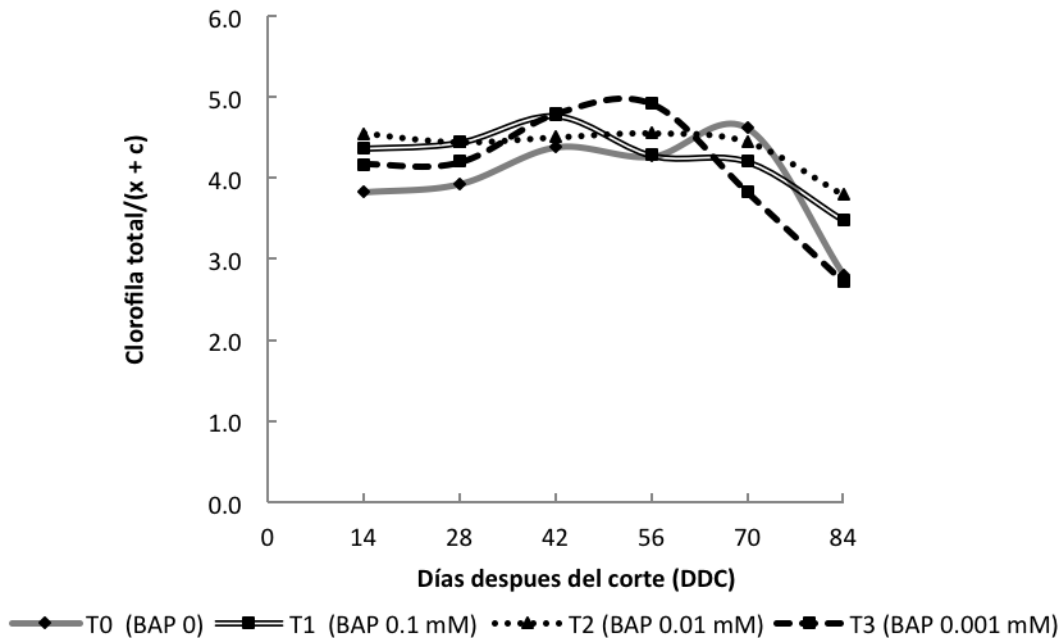


Figura 8. Índice relativo de verdor (clorofila total/xantofilas y carotenoides) en hojas de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.

### 5.3. Composición morfológica, composición química y degradación *in vitro* de *Lolium perenne* L.

En general el contenido de hojas (%) fue mayor a los 28 DDC respecto a los demás periodos de muestreo (56, 84 y 112 DDC). El componente tallo no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos. En lo correspondiente al contenido de hoja hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ); así, el contenido mayor lo obtuvo el tratamiento T2 (70.72 %), mientras que el valor menor fue para T1 (61.03 %). Así también, en el contenido de material muerto hubo diferencias entre tratamientos; la cantidad mayor se encontró en el tratamiento T1 (34.29 %) y la acumulación menor ocurrió en el tratamiento T2 con 23.98 % (Cuadro 3).

Cuadro 3. Composición morfológica (%) y relación hoja: tallo y relación hoja: no hoja, en *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.

Variable	Tratamientos				EEM	P < F		
	T0	T1	T2	T3		Trat.	Tiempo	Trat.*tiempo
Tallo	5.78 <sup>a</sup>	4.69 <sup>a</sup>	5.31 <sup>a</sup>	5.29 <sup>a</sup>	0.511	0.549	0.001	0.454
Hoja	68.64 <sup>ab</sup>	61.03 <sup>c</sup>	<b>70.72<sup>a</sup></b>	70.14 <sup>ab</sup>	0.489	0.001	0.001	0.001
Material muerto	25.58 <sup>bd</sup>	34.29 <sup>a</sup>	23.98 <sup>d</sup>	24.57 <sup>cd</sup>	0.476	0.001	0.001	0.001
Relación hoja:tallo	19.82 <sup>a</sup>	17.97 <sup>a</sup>	16.91 <sup>a</sup>	19.36 <sup>a</sup>	2.189	0.778	0.001	0.883
Relación hoja:no hoja	9.88 <sup>a</sup>	9.8 <sup>a</sup>	10.93 <sup>a</sup>	12.65 <sup>a</sup>	1.732	0.640	0.001	0.951

Medias con diferente literal en un renglón son diferentes ( $P < 0.05$ ); EMM= Error estándar de la media. La prueba de Tukey se utilizó para la comparación múltiple de medias.

En la Figura 9 se observan los cambios respecto a la composición morfológica en el *Lolium perenne* L. a cuatro diferentes edades y tratado con citocinina BAP. En este caso hubo disminución de la cantidad de hoja conforme avanza la edad de la planta y un aumento en el contenido de material muerto y tallo.

La relación entre tasa de aparición de hojas (TAH) de *Lolium perenne* L. se debe a una alta densidad de macollos pequeños. La relación entre TAH, estructura de la pastura y flujo de material es la siguiente: A mayor TAH, mayor cantidad de macollos chicos y el crecimiento y la senescencia son más rápidas; a menor TAH, pocos macollos grandes y el crecimiento y la senescencia son más lentas (Colabelli *et al.*, 1998).

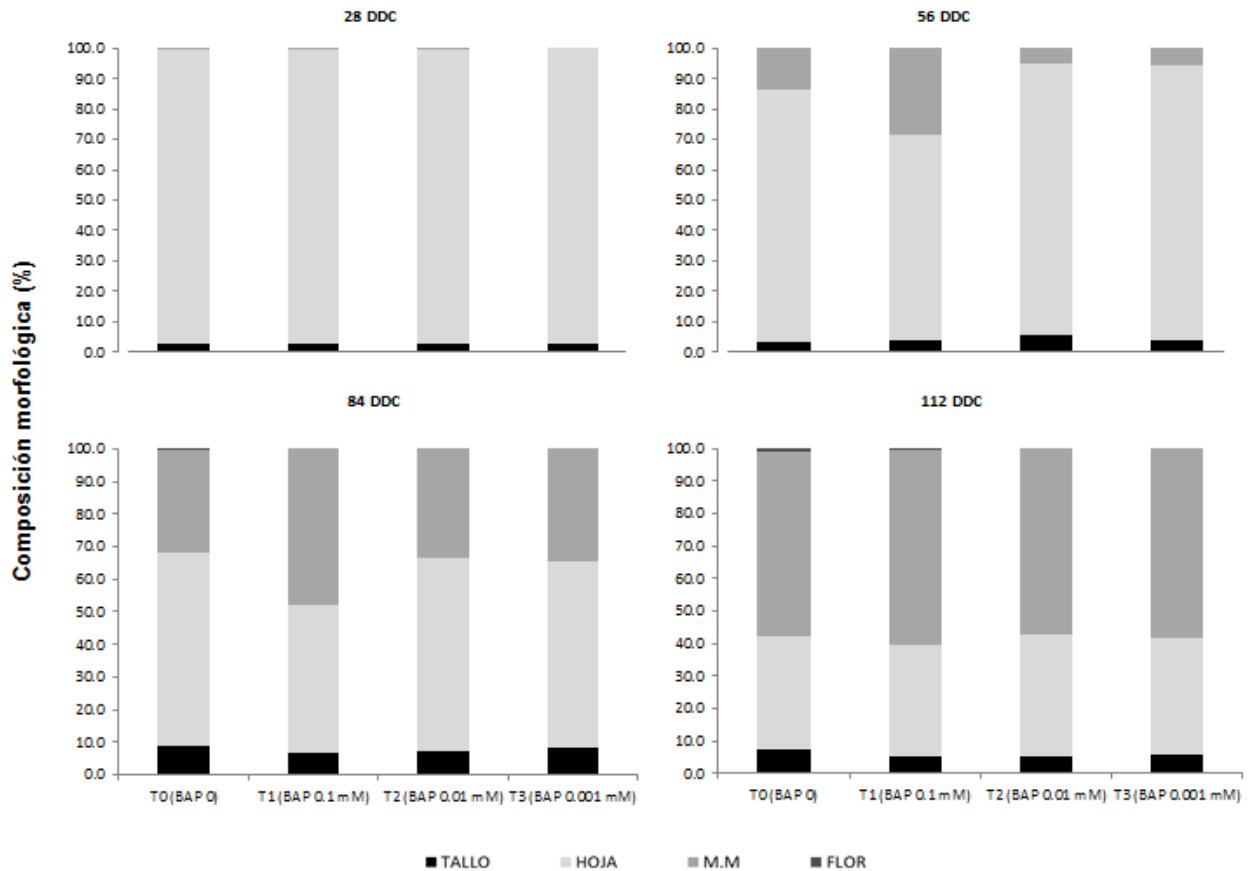


Figura 9. Cambios en la composición morfológica del pasto *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. Los datos son promedio de n=5.

Los azúcares son sustratos esenciales en el esqueleto de carbono, el metabolismo energético, y en la biosíntesis de polímero en las plantas. En el presente experimento se presentaron diferencias en el tiempo respecto al contenido de celulosa y hemicelulosa en cada uno de los tratamientos, lo cual fue causado principalmente a los cambios debido a la senescencia ya que una gran cantidad de macromoléculas se degrada y se pierde (Lim *et al.*, 2007).

Velasco *et al.* (2005) encontraron contenidos de 20.3 % de proteína total en *Lolium perenne* a las 2, 4, 6 semanas de edad, y a medida que aumentó la edad de la planta la degradación *in vitro* de la materia orgánica se redujo. En el presente estudio el contenido de proteína (nutrientes nitrogenados) promedio para los cuatro tratamientos

fue 19.6 % (Cuadro 4). Además, los resultados reportados por Velasco *et al.* (2005) sugieren que para obtener los más altos rendimientos de materia orgánica digestible y proteína, los cortes deben realizarse cada 4 semanas, lo cual coincide con el presente experimento donde a los 30 DDC se observaron las mayores concentraciones de nutrientes nitrogenados (31.63 %), pero sin diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 4). Para el presente estudio, a mayor edad la cantidad de nutrientes nitrogenados disminuyó ( $P < 0.05$ ): 20.41 %, 14.91 % y 11.44 % a los 60, 90 y 120 DDC; además, a los 60 DDC T3 mostró la mayor cantidad de nutrientes nitrogenados (22 %), y el T1 tuvo 17.05 % a los 90 DDC y 12.72 % a los 120 DDC (Cuadro 4). Los valores se mantienen bajos comparados con los reportados por Fulkerson *et al.* (2007), quienes mencionan que la proteína total contenida en el ballico perenne es normalmente más del 25 % y puede ser tan alto como 35 %. Esto pudo deberse a que las plantas se desarrollaron en macetas en una mezcla de peat moss, agrolita y suelo arenoso.

La FDN y FDA son variables importantes de la calidad del forraje, ya que afectan el consumo de materia seca y la digestibilidad. La FDN tiende a ser menor en la lámina que en el material de la vaina de los pastos y generalmente la fracción de FDN aumenta con el período de rebrote debido a la maduración de la planta (Hoekstra *et al.*, 2007). De acuerdo con Fulkerson *et al.* (2007), en ballico perenne se encontró un contenido de 52 % de FDN. El análisis de los resultados obtenidos en el presente experimento muestra que el contenido de FDN no varía significativamente ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 4). Para la FDA hubo una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) porque el valor más alto (29.04 %) se observó en el testigo (sin BAP) comparado con el tratamiento T1 (0.1 mM BAP) donde la FDA fue 27.32 % (Cuadro 4). Este resultado es interesante porque muestra que la aplicación de BAP a la concentración de 0.1 mM reduce la FDA, que es la fracción que contiene la lignina y además es la menos degradable.

Cuadro 4. Contenido de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y nutrientes nitrogenados (NN) en *Lolium perenne* L. (%) asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.

Variable	Tratamientos				EEM	P < F		
	T0	T1	T2	T3		Trat.	Tiempo	Trat*tiempo
FDN	55.1 <sup>a</sup>	55.3 <sup>a</sup>	55.24 <sup>a</sup>	55.93 <sup>a</sup>	0.583	0.763	0.001	0.155
FDA	29.04 <sup>a</sup>	27.32 <sup>b</sup>	27.9 <sup>ab</sup>	28.45 <sup>ab</sup>	0.287	0.015	0.001	0.064
NN	18.7 <sup>a</sup>	20.08 <sup>a</sup>	19.73 <sup>a</sup>	19.88 <sup>a</sup>	0.434	0.191	0.001	0.014

Medias con diferente literal en un renglón son diferentes (P < 0.05); EMM= Error estándar de la media (n= 3). La prueba de Tukey se utilizó para la comparación múltiple de medias.

La digestibilidad es definida como la cantidad de alimento que no aparece en las heces y se considera que ese alimento ha sido absorbido. La poca digestibilidad de las paredes celulares en gramíneas forrajeras es un factor limitante en la utilización de polisacáridos de la pared como fuentes de carbono y energía para los rumiantes. Algunas paredes primarias no lignificadas, como las células parenquimatosas del mesofilo, son casi completamente digeridos en el rumen, pero otras células lignificadas, como las fibras, elementos de vaso del xilema y otras células lignificadas de los haces vasculares, son resistentes a la digestión (Lam *et al.*, 2003).

Cuadro 5. Degradación *in vitro* (6, 12, 24 y 48 h) de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas.

Degradación <i>in vitro</i>	Tratamientos (%)				EEM	P > F		
	T0	T1	T2	T3		Trat.	Tiempo	Trat * tiempo
30 DDC	0.44 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0.0088	0.2695	0.0001	0.4201
60 DDC	0.50 <sup>ab</sup>	<b>0.43<sup>c</sup></b>	0.52 <sup>ab</sup>	0.53 <sup>a</sup>	0.0074	0.0001	0.0001	0.0015
90 DDC	0.51 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.0134	0.0885	0.0001	0.5984
120 DDC	0.44 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.0081	0.2795	0.0001	0.2172

Medias con diferente literal en un renglón son diferentes (P < 0.05); EMM= Error estándar de la media; DDC= Días después del corte. La prueba de Tukey se utilizó para la comparación múltiple de medias.



Para la degradación *in vitro* no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos para los periodos de muestreo de 30, 90 y 120 DDC. Solamente se presentaron diferencias entre tratamientos a los 60 DDC: el tratamiento T3 (0.001 mM citocinina BAP) obtuvo la mayor degradación (0.53 %) respecto a los demás tratamientos; mientras que el tratamiento T1 con la mayor concentración de citocinina BAP aplicada (0.1 mM) mostró el menor valor de degradación (Cuadro 5) a pesar de que este tratamiento presentó la menor proporción de FDA. Respecto a los periodos de incubación (6, 12, 24 y 48 horas), la degradación fue aumentando conforme el tiempo de incubación se incrementó, como se muestra en el Cuadro 6. Cabe señalar que los tallos de ballico perenne tienen mayores contenidos de pared celular y son menos digestibles que las hojas (Tas *et al.*, 2006)

Cuadro 6. Degradación *in vitro* (6, 12, 24 y 48 h.) de *Lolium perenne* L. asperjado con BAP 0.1 mM (T1), 0.01 mM (T2), 0.001 mM (T3), y testigo sin BAP (T0), una vez por semana durante siete semanas continuas. En cuatro muestreos iniciando a los 30 DDC (días después del corte) y con intervalos de 30 días entre cada muestreo. Los datos son promedio de  $n= 3$ .

Periodo de muestreo	Horas de incubación	Tratamientos			
		T0	T1	T2	T3
30 DDC	6	0.23	0.26	0.23	0.25
	12	0.34	0.36	0.34	0.37
	24	0.50	0.51	0.50	0.53
	48	0.67	0.65	0.65	0.67
60 DDC	6	0.29	0.26	0.31	0.30
	12	0.40	0.31	0.43	0.44
	24	0.58	0.48	0.62	0.62
	48	0.73	0.65	0.71	0.74
90 DDC	6	0.29	0.23	0.25	0.23
	12	0.40	0.34	0.38	0.39
	24	0.61	0.52	0.57	0.58
	48	0.72	0.71	0.76	0.73
120 DDC	6	0.19	0.22	0.18	0.18
	12	0.26	0.30	0.25	0.26
	24	0.56	0.54	0.56	0.53
	48	0.75	0.68	0.70	0.72

## CONCLUSION GENERAL

El efecto de la citocinina BAP como promotor de crecimiento en *Lolium perenne* L. fue evidente puesto que aumentó el crecimiento foliar neto y el crecimiento foliar acumulado; así mismo aumentó el contenido de proteína al aplicar 0.1 mM de BAP y redujo la proporción de FDA con respecto al testigo. Solamente a los 60 DDC cuando fue asperjada con 0.001 mM de BAP, la citocinina incrementó el nivel de degradación *in vitro* de ballico perenne. Sin embargo, la citocinina no redujo la senescencia foliar, ni tuvo efecto en el contenido de pigmentos fotosintéticos.

## LITERATURA CITADA

- Balocchi, A. O., López, F. I. 2009. Herbage production, nutritive value and grazing preference of diploid and tetraploid perennial ryegrass cultivars (*Lolium perenne* L.). Chilean Journal of Agricultural Research 69 (3): 331 - 339.
- Barnes, R. F., Nelson, C. L., Moore, K. J., Collins, M. 2007. Forages. The Science of Grassland Agriculture. 6ta Edición. Volumen II. Pág. 211 – 213.
- Ben-Yaakov, E., Harpaz-Saad, S., Galili, D., Eyal, Y., Goldschmidt, E. 2006. The relationship between chlorophyllase activity and chlorophyll degradation during the course of leaf senescence in various plant species. Israel Journal of Plant Science (54): 129 – 135.
- Buchanan-Wollaston, V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. Journal of Experimental Botany 48 (307): 181 – 199.
- Boudon, A., Peyraud, J. L., Faverdin, P. 2002. The release of cell contents of fresh ryegrass (*Lolium perenne* L.) during digestion in dairy cows: effect of the intracellular constituents, season and stage of maturity. Animal Feed Science and Technology (97): 83 – 102.
- Brault, M., Maldiney, R. 1999. Mechanisms of cytokinin action. Plant Physiology and Biochemistry 37 (5): 403 – 412.
- Carimi, F., Terzi, M., De Michele, R., Zottini, M., Lo Schiavo, F. 2004. High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. Plant Science 166: 963 – 969.
- Castillo, C. D. A. 2012. Competencia entre *Lolium perenne* L. y *Bromus valdivianus* Phil., período invierno – primavera, en praderas pastoreadas por vacas de peso contrastante. Memoria. Universidad Austral de Chile. Valdivia - Chile. 48 pp.

- Chen, Y- T., Chen, L- F, O., Shaw, J- F. 2008. Senescence - associated genes in harvested broccoli florets. *Plant Science* (175): 137 – 144.
- Colabelli, M., Agnusdei, M., Mazzanti, A., Labreveuz, M. 1998. El proceso de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras como base para el manejo de la defoliación. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Buenos Aires Sur. Boletín Técnico 148: 17 pp.
- Costa, M. L., Civello, P. M., Chaves, A.R., Martínez, G. A. 2005. Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea* L var *Italica*) heads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (85) 7: 1154–1160.
- Dangl, J., Dietrich, R. A., Thomas, H. 2000. Senescence and programmed cell death. In: Buchanan, B. B., W. Gruissem, R. and L. Jones (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Press. Rockville, USA. pp: 1044-1100.
- Del Río, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Scandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Jiménez, A., López-Huestas, E., Hernández, J. A. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195 – 1200.
- Dolezal, K., Popa, I., Krystof, V., Spichal, L., Fojtikova, M., Holub, J., Lenobel, R., Schmulling, T., Strnad, M. 2006. Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (14): 875 – 884.
- Fulkerson, W. J., Neal, J. S., Clark, C. F., Horadagoda, A., Nandra, K. S., Barchia, I. 2007. Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: Grasses and legumes. *Livestock Science* (107): 253 – 264.

- Gan, S., Amasino, R. M. 1996. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bio Essays* (18): 557 – 565.
- García, B, F, J. 2014. Reguladores de crecimiento. Revisado en: <http://www.euita.upv.es/variados/biologia/Temas%20PDF/Tema%2014b%20Reguladores%20del%20Crecimiento.%20Citoquininas.pdf>.
- Gómez-Lobato, M.E., Civello, P.M., Martínez, G.A. 2012. Effects of ethylene, cytokinin and physical treatments on BoPaO gene expression of harvested broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (92): 151 – 158.
- González-Santos, R., Delgado-Alvaro, A., Zavaleta-Mancera, H. A., Herrera- Cabrera, B. E. 2009. Cytokinin BAP promotes the accumulation of hexoses and increases the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase during the delay of leaf senescence in wheat. *Agrociencia* 43 (4): 379 – 391.
- Guiboileau, A. Sormani, R. Meyer, C. Maxclaus-Daubresse, C. 2010. Senescence and death of plant organs. Nutrient recycling and developmental regulation. *C. R. Biologies* 333: 381 – 391.
- He, P., Osaki, M., Takebe, M., Shinano, T., Wasaki, J. 2005. Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. *Journal of Experimental Botany* 56 (414): 1117 – 1128.
- Hoekstra, N. J., Struik, P. C., Lantinga, E. A., Schulte, R. P. P. 2007. Chemical composition of lamina and sheath of *Lolium perenne* as affected by herbage Management. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 55 (1): 55 – 73.
- INIA. 2013. Gramíneas forrajeras perennes para el sur de Chile. Evaluación de cultivares 2010 – 13. *Boletín Instituto de Investigaciones Agropecuarias* 226: 62 pp.

- Jeli, G., Bogdanovi, M. 1990. The relationship between chlorophyll accumulation and endogenous cytokinin in the greening cotyledons of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science* 71: 153 – 157.
- Kulaeva, O. N., Burkhanova, E. A., Karavaiko, N. N., Selivankina, S. Y., Porforova, S. A., Maslova, G. G., Zemlyachenko, Y. V., Borner, T. 2002. Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. *Journal of Plant Physiology* 159: 1309 – 1316.
- Lam, T. B-T., Liyamada, K., Stone, B. A., 2003. Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. *Phytochemistry* 64: 603 – 607.
- Lim, P. O., Kim, H. J., Nam, H. G. 2007. Leaf senescence. *Plant Biology* 58: 115 – 136.
- Loewy, T., Ron, M. M. 2008. Índice de verdor en trigo según nutrición nitro-azufrada. Adaptado de: Fertilización nitro-azufrada, expresión del índice de verdor y rendimiento del nitrógeno en trigo. VII Congreso Nacional de Trigo. Santa Rosa (La Pampa) Argentina.
- Massoloa, J. F., Lemoineae, M. L., Chavesa, A. R., Concellóna, A., Ariel, R., Vicentea. 2014. Benzyl-aminopurine (BAP) treatments delay cell wall degradation and softening, improving quality maintenance of refrigerated summer squash. *Postharvest Biology and Technology* 93: 122 – 129.
- Marenco, R. A., Antezana-Vera, S. A., Nascimento, H. C. S. 2009. Relationship between specific leaf area, leaf thickness, leaf water content and SPAD-502 readings in six Amazonian tree species. *Photosynthetica* 47 (2): 184 – 190.
- Martínez-Gutiérrez, R., Zavaleta-Mancera, H. A., Ruíz-Posadas, L del M., Delgado-Alvarado, A., Vaca-Paulín, R. 2008. Intercambio de gases y relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo (*Triticum aestivum* L.) por la citocinina BAP. *Interciencia* 33 (2): 140 – 145.
- Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H. 1999. Chlorophyll degradation. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 67 – 95.

- Mirassón, H. R., Faraldo, M. L., Fioretti, M. N., Miravalles, M., Brevedan, R. E. 2010. Relaciones entre el índice de verdor y el nivel hídrico foliar en trigo con diferentes sistemas de labranza. *Phyton* 79: 183 – 187.
- Muslera, P., E. y Ratera G, C. 1991. *Praderas y Forrajes, Producción y Aprovechamiento*. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 674 pp.
- Nooden, L. D., Guiamet, J. J., Singh, S., Letham, D. S., Tsuji, J., Schneider, M. J. 1988. Hormonal control of senescence. *Plant Growth Substances*. Berlín. 537 – 546.
- Núñez, H. G., Hernández, Y. C., Santamaría, C. J., Márquez, O. J. 1995. Producción de forrajes bajo condiciones limitadas de agua para riego. LALA. Memorias. Ciclo internacional de conferencias sobre nutrición y manejo. Comarca Lagunera, Durango. Pág: 29 – 37.
- Ookawa, T., Naruoka, Y., Sayama, A., Hirasawa, T. 2004. Cytokinin effects on ribulose 1–5–biphosphate carboxilase/ oxigenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Science Society of America*. 44: 2107 – 2115.
- Prokopová, J., Spundová, M., Sedlářová, M., Huscková, A., Novotný, R., Dolezal, K., Naus, J., Lebeda, A. 2010. Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 716 – 723.
- Qin, X., Yanni, L., Longyun, J., Lijuan, C., Xinfeng, Z., Ju, X., Xiaoya, H. 2014. Specific binding and inhibition of 6-benzylaminopurine to catalase: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking study. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 123: 327 – 335.
- Rajcana, I., Dwyerb, L, M., Tollenaar, M. 1999. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. *Field Crops Research* 63: 13 – 17.

- Ramos, G, J, L., Espinoza, C, J, M., Robles, E, F, J. 2000. Características descriptivas del ballico anual y perenne en las zonas templadas de México. INIFAP. Fundación Produce Aguascalientes, A. C. Folleto Técnico No.16. 28 pp.
- Rodríguez, C. B. 2000. Gramineas. Características y Claves. 1<sup>ra</sup>. edición. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pág: 305 – 316.
- Schippers, J, H, M., Jing, H-C., Hille, J., Dijkwel, P, P. 2007. Developmental and hormonal control of leaf senescence. Senescence Processes in Plants. Gan S, ed. Oxford: Blackwell Publishing. Pag: 145 - 170.
- Smart, M. C. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* 126: 419 – 448.
- Taiz, L., Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Third ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. 690 p.
- Tamminga, S., Vuuren, A. M., Koelen, C. J., Ketelaar, R. S., Togt, P. L. 1990. Ruminant behavior of structural carbohydrates, non-structural carbohydrates and crude protein from concentrate ingredients in dairy cows. *Netherlands Journal of Agriculture Science* 38: 513 – 526.
- Tas, B. M., Taweel, H. Z., Smit, H. J., Elgersma, A., Dijkstra, J., Tamminga, S. 2006. Rumen degradation characteristics of perennial rye-grass cultivars during the growing season. *Animal Feed Science and Technology* 131: 102 – 119.
- Todorov, D., Alexieva, V., Karanov, E., Velichkov, D., Velikona, V. 1992. Effect of certain dicarboxylic acid monoesters on growth, chlorophyll content, chlorophyllase and peroxidase activities, and gas-exchange of young maize plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 11: 233 – 238.
- Trippi, V. 2008. Resumen de conferencias, simposios y trabajos. XIII Reunión Latinoamericana. XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Rosario, Provincia de Santa Fe, República Argentina. 309 pp.



- Turner, L. B., Humphreys, M. O., Cairns, A. J., Pollock, C. J. 2001. Comparison of growth and carbohydrate accumulation in seedlings of two varieties of *Lolium perenne* L. *Journal of Plant Physiology* 158: 891 – 897.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583 – 3597.
- Velasco, Z. M. E., Hernández, G. A., González, H. V. A., Pérez, P. J., Vaquera, H. H., Galvis, S. A. 2001. Curva de crecimiento y acumulación estacional del pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L.). *Técnica Pecuaria México* 39: 1 – 14.
- Velasco, Z. M. E., Hernández, G. A., González, H. V. A., Pérez, P. J., Vaquera, H. H. 2002. Curvas estacionales de crecimiento de ballico perenne. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25 (1): 97 – 106.
- Velasco, Z. M. E., Hernández, G. A., González, H. V. A. 2005. Rendimiento y valor nutritivo de ballico perenne (*Lolium perenne* L.) en respuesta a la frecuencia de corte. *Técnica Pecuaria México* 43 (2): 247 – 258.
- Weaver, L. M., Himelblau, E., Amasino, R. M. 1997. Leaf senescence: Gene expression and regulation. *Genetic Engineering* 19: 215 – 234.
- Werner, T., Schumulling, T. 2009. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 527 – 538.
- Wilson, C.Y., Zavaleta, M. H. A., López, D. H., Hernández, G. A. 2008. La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteína y crecimiento en el pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L.). *Agrociencia* 42: 799 - 806.
- Xie, Z., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., Cao, W. 2004. Effects of exogenous ABA and cytokinin on leaf photosynthesis and grain protein accumulation in wheat ears cultured *in vitro*. *Plant Growth Regulation*. 44: 25 – 32.

- Yoshida, S. 2003. Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 79 – 84.
- Zalabák, D., Pospíšilová, H., Šmehilová, M., Mrízová, K., Frébort, I., Galuszka, P. 2013. Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances* 31: 97 – 117.
- Zavaleta-Mancera H.A., Franklin K.A., Ougham H.J., Thomas H., Scott I.M. 1999a. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Journal of Experimental Botany* 50: 1677 – 1682.
- Zavaleta-Mancera, H. A., Thomas, B. J., Thomas, H., Scott, I. M. 1999b. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* 50 (340): 1683 – 1689.
- Zavaleta-Mancera, H. A., López, D. H., Loza, T, H., Mora, H. M., Trevilla, G. C., Vargas, S. M., Ougham, H. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572 – 1582.