



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



PROPAGACION IN VITRO DE (*Dianthus caryophyllus* L.) A
PARTIR DE SEGMENTOS NODALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A
JESUS VIEYRA RAMIREZ

ASESOR: ING. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

" Propagación in vitro de (*Dianthus caryophyllus* L.)
a partir de segmentos nodales".

que presenta el pasante Josés Vieyra Ramírez
con número de cuenta: 8512563-8 para obtener el TITULO de:
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 26 de abril de 1974

PRESIDENTE	Ing. Hilda Carina Gómez Villar	<i>Hilda Carina Gómez Villar</i>
VOCAL	Biol. Elva Martínez Holguín	<i>E. Martínez Holguín</i>
SECRETARIO	Ing. Francisco Cruz Pizarro	<i>F. Cruz Pizarro</i>
PRIMER SUPLENTE	Ing. Abel Rodríguez Bueno	<i>A. Rodríguez Bueno</i>
SEGUNDO SUPLENTE	Ing. Adolfo Ochoa Ibarra	<i>A. Ochoa Ibarra</i>

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Francisco Cruz Pizarro por el tiempo y las valiosas observaciones dedicadas a este trabajo de tesis, así como brindarme su amistad.

A los miembros del H. jurado por sus valiosas aportaciones que me permitieron una mejor presentación del trabajo.

Al Ing. Jose L. Garcia H. por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por permitirme ser parte de ella.

A todas a aquellas personas que de alguna forma contribuyeron para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis Padres.

Cristina Ramírez R. y Jose G. Vieyra M.

A mis Hermanos.

M. Estaher, M. Teresa, Mateo, M. Luisa, Valentin,
Ana Bertha y a mi Abuela Concepción Rubio.

A mis Padrinos.

Silvino Nava B y Natalia Vargas M.

A Margarita. Por su apoyo y comprensión que sin el cual no
hubiera sido posible la realización de este
trabajo.

A la Disidencia.

Jose G., Raúl, Benjamin, Jesús A., Arturo y
Gregorio.

A mis amigos.

Victor M., Manuel, Patricia, Araceli,
Guillermo, Jorge, Monica, Fernando y Leonardo.

A todos mis compañeros de 13^a Generación.

Mario, Ines, Ricardo, Atanasio, Moises,
Alejandro, Beatriz M. y todos los demás que se
encuentran en esta interminable lista.

3.0. - Problemática del Clavel in vitro	39
3.0.1. - Vitrificación	39
3.0.2. - Variación Somaclonal	42
3.0.3. - Ventajas y Desventajas	44
IV. - Materiales y Métodos	47
4.1. - Localización	47
4.2. - Material vegetal empleado	47
4.3. - Desinfección del material vegetal	47
4.4. - Medio de Cultivo	47
4.5. - Condiciones de incubación	49
4.6. - Implantación del material vegetal	49
4.7. - Fecha de siembra	50
4.8. - Diseño experimental	50
4.9. - Toma de datos	52
V. - Resultados y Discusión	53
5.1. - Establecimiento del cultivo aséptico	53
5.1.1. - Desinfección del material vegetal	53
5.1.2. - Medio de cultivo	55
5.1.3. - Variedades	58
5.1.4. - Respuesta del inoculo a las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento	59
5.1.5. - Número de brotes	60
5.1.6. - Longitud de brote	61
5.2. - Proliferación	66
5.2.1. Subcultivo	66
5.3. - Enraizamiento	68
5.3.1. - Días a emisión de raíz	68
5.3.2. - Porcentaje de enraizamiento	68
VI. - Conclusiones	72
VII. - Bibliografía	74

INDICE DE CUADROS

No.	Nombre	Pag.
1	Especies de corte clonadas <u>in vitro</u> en Holanda en 1986.	10
2	Investigaciones realizadas en clavel <u>in vitro</u> .	12
3	Diferentes tipos de inoculos y su respuesta en crecimiento.	18
4	Cantidades y tipos de reguladores y tipo de explanto.	21
5	Investigaciones realizadas en clavel en vitrificación.	41
6	Medio de Cultivo de Murashige y Skoog	48
7	Organización del experimento en la fase de establecimiento.	50
8	Organización del experimento en la fase III enraizamiento.	51
9	Respuesta del explanto a las diferentes concentraciones de reguladores.	57
10	Anova del número de brotes	62
11	Comparación de medias de número de brotes	62
12	Anova de longitud de brote	65
13	Comparación de medias de longitud de brote	65
14	Anova de regresión entre el número de brote y longitud de brote.	66
15	Anova del porcentaje de enraizamiento	69
16	Comparación de medias de porcentaje de enraizamiento.	69

INDICE DE FIGURAS

No.	Nombre	Pag.
1	Flores de corte clonadas in vitro en Holanda en 1988	9
2	Esquema del método de segmentos nodales	38
3	Porcentaje de contaminación	54
4	Porcentaje de sobrevivencia	55
5	Número de brotes por tratamiento de las dos variedades de clavel.	63
6	Promedio de longitud de brote por tratamiento de las dos variedades.	64
7	Comparación del número de brotes en la fase 1 y en el primer subcultivo.	67
8	Porcentaje de enraizamiento	70

RESUMEN

En la presente investigación se realizó en el laboratorio de micropropagación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan del Departamento de Ingeniería Agrícola. Los objetivos fueron determinar la metodología y factores que afectan el establecimiento del clavel a partir de segmentos nodales; evaluar las diferentes concentraciones de reguladores, así como determinar la concentración óptima para el establecimiento, considerando el número de brotes y longitud del mismo, proliferación y enraizamiento del clavel y evaluar la concentración de sales de minerales del medio de cultivo (Murashige y Skoog) en la fase de establecimiento.

El medio utilizado fue el de Murashige y Skoog al 100 % y 50 % de sales minerales; empleando segmentos nodales de las variedades Concheta y Nkita rose, la siembra fue hecha el 22 de abril de 1993, con el fin de establecer el clavel in vitro, fue subcultivado después de 8 semanas y colocado en el medio de proliferación con 0.1 mg/lit AIB y 1.0 mg/lit de BA. En el enraizamiento se utilizaron 5 tratamientos con el fin de evaluar porcentajes de enraizamiento.

El diseño experimental en la primera fase fue de parcelas divididas con 14 tratamientos por variedad y 10 repeticiones. En la fase de enraizamiento se utilizó el diseño completamente al azar con 5 tratamientos utilizando la variedad Concheta.

El método de desinfección utilizado resulto ser eficiente en un 79.29 %. En general el MS al 50 % de sales minerales resulto tener mejor respuesta a la inducción de brotes, mientras la kinetina promueve un mejor crecimiento y en longitud. Existen

diferencias entre las variedades en número y longitud de brotes, siendo la variedad Concheta mejor en número de brotes y la variedad Nikita rose en longitud del brote.

Teniendo una concentración óptima de 0.1 mg/lit AIB y 1.0 mg/lit de BA con 11 brotes en el tratamiento 6 de la variedad Concheta. Al realizar el primer subcultivo se observó una tendencia a incrementarse el número de brotes por tubo, con un máximo de 20.7 brotes del tratamiento 11 de la variedad Concheta.

En el enraizamiento la concentración óptima fue de 0.3 mg/lit de AIB teniendo un 70 % de enraizamiento, presentando 9 días para emitir raíces, de 12 a 14 días para tener un buen sistema radicular, con una óptima calidad del brote.

I.- INTRODUCCION

El clavel es la planta mundialmente más cultivada para la producción de flor cortada, ya que presenta excelentes características estéticas y, desde el punto de vista comercial, su resistencia durante el embalaje y transporte, y por su capacidad de producir flor durante todo el año, esta última característica exclusiva del clavel.

En México la horticultura ornamental se impulsó en el periodo de 1989 a 1991, manteniéndose la superficie cultivada arriba de las 10,000 has. Los Estados productores son Edo de México, Puebla, Guanajuato, Jalisco, B.C.N., Morelos etc; y su producción se consume en las grandes ciudades. Por lo que respecta a la exportación el Edo de México exporta el 80 % de su producción, seguido por Puebla, B.C.N. y Morelos, principalmente hacia los Estados Unidos en un 90 % de la exportación. (SARH 1991). De clavel México exportó hacia los Estados Unidos en 1990, según Bancomext 949.000 US\$ solamente rebasado por las rosas con 1,901.000 US\$. Las principales especies exportables son las rosas, claveles, crisantemos, pompones, margaritas, statices, nardos, gladiola, liliis, iris, gysophylas y palma camedor.

Es una planta herbácea perenne que es propagada por esquejes terminales, los cuales son enraizados en cámaras de nebulización obteniéndose de 10 a 50 esquejes por año, lo que depende de la densidad y época de plantación.

Uno de los principales problemas para los productores de clavel es la obtención del material vegetal de buena calidad fitosanitaria, debido a que en la mayoría de los casos el

productor no produce su material, principalmente esquejes, teniendo que adquirir esquejes en el mercado nacional siendo estos de dudosa calidad fitosanitaria o adquirirlos de empresas especializadas que los importan de países como Holanda y Estados Unidos.

La producción por medio de la propagación in vitro facilita la propagación clonal rápida de especies que se ven limitadas en su propagación vegetativa tradicional. El clavel ha sido trabajado por la propagación in vitro para producir clones de plantas libres de enfermedades por medio de la técnica de cultivo de meristemas, con el fin de producir un gran número de plantas de buena calidad, que pueden ser excelente material para la producción comercial de esquejes enraizados (plantas madres). Esta técnica podría resolver en parte la importación de esquejes de los productores florícolas del país.

II.- OBJETIVOS

- 1).- Determinar la metodología y factores que afectan el establecimiento del clavel a partir de segmentos nodales.
- 2).- Evaluar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y determinar la concentración óptima para el establecimiento considerando el número de brotes y longitud del mismo, proliferación y enraizamiento del clavel.
- 3).- Evaluar la concentración de sales minerales del medio de cultivo (Murashige y Skoog) en la fase de establecimiento del clavel in vitro.

III.- REVISION BIBLIOGRAFICA

3.- GENERALIDADES DE LA ESPECIE

3.1.- IMPORTANCIA

El clavel es una planta, que debido a sus características estéticas y a su capacidad de producir flor durante todo el año, es de las especies que más se cultivan para flor cortada en México y en el mundo. (Arango 1988)

Las principales áreas de producción incluyen a Europa, Norte y Sur de America y la parte oriental de Asia; la producción de clavel en Italia y Francia que eran los principales productores ha decrecido lentamente, mientras los nuevos países productores como México, Israel y Colombia han incrementado su producción y abarcando gran parte del mercado mundial, debido a los bajos costos de producción, particularmente por mano de obra y energía. (Konishi 1980 citado por Mii et al 1989; Besemer 1988).

En México, la horticultura ornamental es considerada una actividad productiva que en los últimos años se ha incrementado; y de acuerdo a diferentes fuentes se dedican 12,700 has (SARH 1991), para ésta actividad agrícola, proyectándose un crecimiento más acelerado para los próximos años, considerándose una actividad importante que puede contribuir a promover el desarrollo de diversas regiones de nuestro país y generar divisas.

De las especies ornamentales que más posibilidad tienen de exportarse son : clavel, crisantemo, gladiola, rosa, etc. Principalmente al mercado de Estados Unidos, ya que existen condiciones agroclimáticas favorables para la producción de ornamentales y cercanía geográfica. (Duran 1993).

3.2. - ORIGEN E HISTORIA

El cultivo del clavel, parece tener su origen en el sur de Europa, aunque es muy difícil determinar su antigüedad (Albertos 1981), ya que ésta parece remontarse a los griegos, 300 años A.C.; quienes utilizaban la flor para aromatizar vinos. (Guerrero 1987; Besemer 1988).

A fines del siglo XV ya existía un gran número de variedades cultivadas. después de 1700 el cultivo del clavel se difundió por toda Europa occidental y central, pero esa planta sólo producía flores en primavera y ocasionalmente en otoño y a principios de invierno.

En 1846 el floricultor lionés Dalmais después de efectuar diversas hibridaciones, de la variedad Mahon obtuvo la primera planta de clavel refloreciente, es decir, una planta que producía flor durante todo el año. Simultáneamente en Estados Unidos un floricultor francés que cultivaba claveles de origen lionés, obtuvo el llamado American tree carnation o Sim, denominado así por su creador y también con carácter refloreciente. A partir de entonces se ha venido trabajando en la creación de nuevas razas partiendo del material americano y europeo. (Guerrero 1987).

En 1753 Linneo clasifica al clavel con el nombre genérico de *Dianthus*, su nombre científico procede del griego *dios* divino y *anthos* flor o sea flor divina; su nombre en castellano se deriva del clavo, ya que antiguamente se usó como sustituto del clavo aromático. (Albertos 1981; Guerrero 1987.).

El género *Dianthus* abarca de 250 a 300 especies, siendo de interés solamente 30, entre las que destacan: *Dianthus caesiuss*, *D. barbatus*, *D. chaband*, *D. sinensis*, *D. deltoides*, *D. plumarius* y *D. caryophyllus* del cual proceden los claveles refrlorecientes. (Albertos 1981).

3.3.- DESCRIPCION BOTANICA Y TAXANOMICA

El clavel pertenece a la familia de las cariofiláceas, es una planta herbacéa, de tallos articulados y nudosos; sus hojas son lineales, opuestas, rígidas, paralelinervas y de color verde glauco, revestidas de pruina cerosa. Las flores son terminales, persistentes y hermafroditas, con cáliz gamosépalo, verde coriáceo, pétalos, fuertemente sujetos por el cáliz, de colores muy diversos, estambres en número de 10 y ovario unilocular. El fruto, caja, puede contener de 60 a 90 semillas de color negro o marrón y de forma irregular. un tanto achatada, siendo su diámetro de 2-3 mm. (Albertos 1981).

REINO : VEGETAL
DIVISION : EMBRYOPHYTA
SUBDIVISION : ANGIOSPERMAE
CLASE : DICOTYLODANEAE
ORDEN : CENTROSPERMAE
FAMILIA : CARYOPHYLLACEAE
GENERO : DIANTHUS
ESPECIE : CARYOPHYLLUS L.

FUENTE: SANCHEZ 1984

3.4. - PROPAGACION DEL CLAVEL

La propagación del clavel se puede ser de dos formas por semilla y vegetativamente por medio de esquejes ó de la micropropagación.

3.4.1.- REPRODUCCION SEXUAL

La reproducción sexual está caracterizada por la fecundación, es la producción de un cigoto con 2N cromosomas por fusión de 2 gametos que conduce a la formación de individuos diferentes, puesto que su constitución genotípica es diferente de la de los progenitores. Esta permite la recombinación de genes, así pues es una fuente de variabilidad, facilitando la capacidad de adaptación y la supervivencia de la especie cuando cambian las condiciones del medio ambiente. (Margara 1986).

La reproducción por semilla se utiliza fundamentalmente para la obtención de nuevas variedades. Para la obtención de nuevas semillas se utiliza la polinización cruzada; las flores son seleccionadas de plantas de buen crecimiento y buena floración invernal, con varas firmes, derechas y flores grandes. Así como el llenado del capullo, forma de los pétalos, aroma, resistencia a enfermedades, duración de la flor cortada, poca propensión al estallado del cáliz y resistencia del color tanto en invierno como en verano. (Herreros 1978; Albertos 1981).

3.4.2.- PROPAGACION ASEJUAL

La propagación asexual consiste en la obtención de individuos a partir de porciones vegetativas de las plantas que es posible porque en muchas de éstas los órganos vegetativos tienen la capacidad de regeneración. Se caracteriza por la obtención de individuos genéticamente idénticos a la planta madre, conduciendo así a la constitución de clones homogéneos, siempre que no sobrevengan ni mutaciones, ni variación. (Hartmann 1988; Margara 1988).

Este tipo de propagación es posible debido a que cada una de las células de la planta contiene todos los genes necesarios para el crecimiento y desarrollo, en la división celular (mitosis) que se efectúa durante el crecimiento y regeneración, los genes son replicados en las células hijas, en consecuencia las características de esta nueva planta serán las mismas de aquella de la cual se originó. (Hartmann 1988).

3.4.2.1.- ESQUEJES

El esqueje es un brote con dos o tres pares de hojas bien formadas y el resto en desarrollo, capaz de emitir raíces por su parte inferior. (Herreros 1978). Un buen esqueje debe tener dos nudos bien desarrollados y otro en formación. Al realizar el corte del esqueje se dejan en la planta madre un par de hojas para favorecer la nueva formación de brotes. (Arango 1986).

Para la obtención de esquejes se requiere del establecimiento de la planta madre, en cuyo caso es necesario partir de material certificado, proveniente de cultivo de meristemas o tratados con termoterapia para que se encuentren libres de enfermedades

producidas por hongos, bacterias y principalmente por virus. (Arango 1986; Herreros 1978; Guerrero 1987).

Para adelantar la emisión de raíces y disminuir el porcentaje de esquejes muertos, se trata la base del esqueje con un producto hormonal, este puede ser líquido o en polvo. Si el producto no lleva fungucida debe mezclarse para prevenir pudriciones en el tallo. Después de tratada la base del esqueje se pone a enraizar. El enraizamiento debe hacerse en una instalación que proteja del sol y del viento a los esquejes y la humedad ambiental debe ser bastante elevada, pero estos pueden estar infectados por virus. (Aquino 1987; Albertos 1981).

3.5.- CULTIVO IN VITRO

3.5.1.- DEFINICION

La Micropropagación o cultivo in vitro, se ha definido como el cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallos, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja, y en algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen. (Street 1977 citado por Navarro y Vera 1989).

Pierik en 1990 lo definió como el cultivo sobre un medio nutritivo en condiciones estériles, de plantas semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores.

La micropropagación es una técnica que permite la multiplicación rápida de células no diferenciadas de los vegetales sobre un medio nutritivo y aséptico, el cual permite desarrollar y diferenciar órganos a plantas completas. (Villalobos 1980; Bengochea y Dodds 1983 citados por Arellanos 1985).

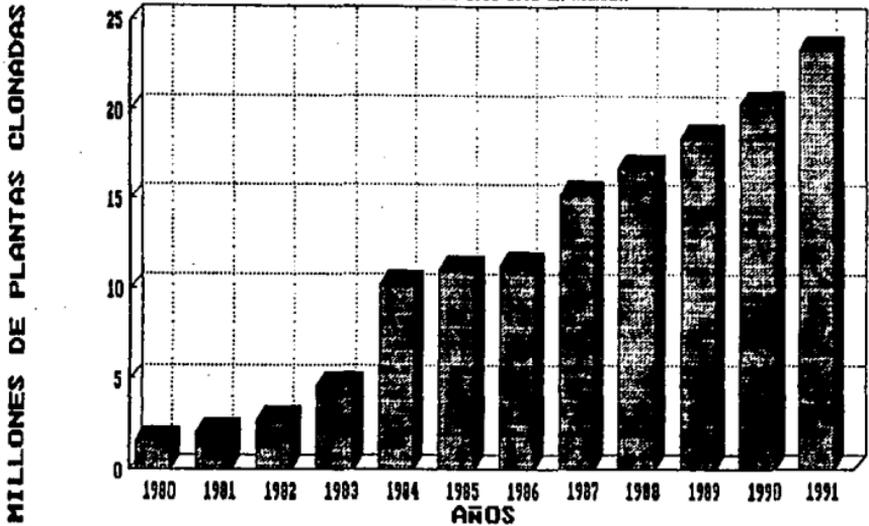
3.5.2.- IMPORTANCIA DEL CULTIVO IN VITRO EN CLAVEL

En las últimas décadas 60 - 80 el cultivo in vitro o micropropagación ha generado técnicas para resolver los problemas fitosanitarios, principalmente de enfermedades vasculares transmitidas por virus, por los métodos tradicionales de propagación. El clavel ha sido clonado in vitro para producir plantas libres de virus por medio del cultivo de meristemas. (Besemer 1988).

En Holanda en donde la industria ornamental mediante la técnica de la micropropagación ha alcanzado su máximo desarrollo, en lo que respecta a flores de corte. (figura No 1)

FIGURA No 1

MICROPROPAGACION DE FLORES DE CORTE EN
EL PERIODO DE 1980-1991 EN HOLANDA



En 1988 alcanzó a producir arriba de los 18 millones de plantas clonadas in vitro. De estas especies el clavel se encuentra entre las primeras diez de importancia. (Cuadro No 1)(Zimmerman 1991)

La micropropagación es una técnica sumamente promisoría, aun para un país como México. El desarrollo de esta nueva tecnología ha dado grandes frutos en los países industrializados, ya que la producción en gran volumen de material libre de virus, de gran vigor y homogeneidad genética, ha permitido no sólo incrementar la productividad de numerosos cultivos hortícolas, sino la calidad de muchas flores de ornato de gran valor estético y comercial. (Hurtado y Merino 1987).

CUADRO No 1 FLORES DE CORTE QUE FUERON CLONADAS
IN VITRO EN HOLANDA EN 1988

Gerbera	16,341,100
Anthurim	509,300
Rosa	505,000
Alstroemeria	313,000
limonium	303,600
Gentiana	145,650
Chrysanthemum	76,880
Aster	18,372
Dianthus (plantas madres)	6,640
Gysophila	4,400

FUENTE : ZIMMERMAN 1991

3.5.3. - ANTECEDENTES DEL CLAVEL IN VITRO

Aun cuando es difícil determinar el origen del cultivo de tejidos, importantes antecedentes se remontan a 1838 cuando Schawnn y Schleiden lanzaron la teoría de la totipotencia, la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa. Los primeros intentos por Haberlandt en 1902 que cultivo células aisladas de monocotiledóneas sin éxito y no fue hasta 1934 cuando White cultivo ápices de raíz de tomate con éxito. (Pierik 1990; Navarro y Vera 1988; Villalobos 1990).

Los métodos de cultivo de tejidos y células para clavel han sido desarrollados recientemente en comparación con otras plantas, y han tenido una aceptación rápida por su importancia económica y

ahora el material obtenido es usado con frecuencia por los cultivadores. Particularmente el cultivo de meristemas, que es usado para obtener plantas libres de virus y para una rápida microporpagación. (Mii et al 1989).

Los trabajos referentes a la propagación in vitro del clavel se pueden resumirse en el (Cuadro No. 2).

3.5.4.- FASES DEL CULTIVO IN VITRO

En la propagación de plantas a travez del cultivo in vitro, se han establecido una series de fases, cada una con un objetivo específico y requerimientos diferentes. (Murashige 1974).

Villegas (citado por Ochoa 1983) caracteriza 4 fases; 3 in vitro y una ex vitro, sin embargo Pierik 1990; Debergh y Read 1991, establecen las 4 fases, pero incluyen la fase 0 en donde la planta madre o donadora de los explantos, se encuentran en un preacondicionamiento.

1.- FASE 0 Ó PREACONDICIONAMIENTO

La fase 0 se puede referir a lo que ocurre antes de que el cultivo in vitro comience y los aspectos a considerar son:

a) Crecimiento de la planta madre bajo condiciones de cierta limpieza en invernaderos, teniendo un especial cuidado en la prevención de enfermedades y ataques por insectos, así como de la temperatura y la humedad. (Pierik 1990).

b) Cambios fisiológicos asociados a la planta madre, en el estado 0 incluye también algunas manipulaciones, de tal manera que las plantas madres o donadoras de los explantos tengan mejores condiciones para el desarrollo in vitro, una de ellas es la luminosidad y el pretratamiento con reguladores de crecimiento. (Debergh y Read 1991).

CUADRO No 2 INVESTIGACIONES REALIZADAS EN CLAVEL IN VITRO

ANO	AUTOR	EVENTO
1957	Quak ₁	Eliminación de virus
1962	Baker y Phillips ₁	Eliminación de virus
1963	Stone _{2,3}	Eliminación de virus
1964	Van Os ₁	Eliminación de virus
1965	Phillips y Mathews _{2,3}	Eliminación de virus
1965	Zenktele ₁	Fertilización de ovulos
1965	Alpi ₁	Eliminación de virus
1965	Hollings _{1,2}	Eliminación de virus
1967	Hackett y Anderson _{1,2}	Multiplicación clonal
1968	Stone _{2,3}	Eliminación de virus
1969	Maia et al ₁	Eliminación de virus
1970	Kakehi ₁	Cultivo de callos
1972	Debergh ₁	Cultivo de callos
1972	Engvild ₁	Cultivo de callos
1974	Kowalska _{2,3}	Eliminación de virus
1974	Takeda ₁	Multiplicación clonal
1974	Petru y Landa ₁	Multiplicación clonal

CONTINUACION DEL CUADRO No 2

1975	Earle y Langhans	Multiplicacion clonal
1977	Jelaska y Sutina	Eliminacion de virus
1977	Davis et al	Multiplicacion clonal
1977	Shadbé y Murashige	Multiplicacion clonal
1977	Roest ₁	Multiplicacion clonal
1978	Takeda ₁	Multiplicacion clonal
1979	Hempel	Multiplicacion clonal
1979	Dabski et al	Multiplicacion clonal
1979	Villalobos	Eliminacion de virus
1981	Roest y Bokelman	Multiplicacion clonal
1981	Villalobos ₁	Plantas haploides-anteras
1982	Mii y Chen ₁	Cultivo de callos
1985	Navarro	Eliminación de virus
1989	Kim et al	Multiplicacion clonal
1990	Radojevic	Multiplicacion clonal
1990	Ioannov	Multiplicacion clonal

FUENTE : 1=MII ET AL 1990, 2=HURTADO Y MERINO 1987, 3=MARGARA 1988

2.- FASE 1 Ó ESTABLECIMIENTO ASEPTICO

La finalidad de esta fase es evitar la contaminación del material vegetal, por lo cual se debe realizarse una adecuada esterilización, y llevar a cabo un crecimiento y desarrollo del explante, por lo que se deben considerar los siguientes aspectos :

A).- ESTERILIZACION

Existen 4 fuentes de infección de la planta, su exterior o su interior, el medio de cultivo insuficientemente esterilizado, el aire y la poca destreza del operador. (Pierik 1990).

Para la esterilización del material vegetal se deben seguir los siguientes pasos, esto está en función del material vegetal, tipo, edad y del interés del investigador. (Pierik, 1990; Kyte 1987).

- 1) Eliminar el suelo y porciones muertas de la planta.
- 2) Lavado de la planta con agua corriente y con algún detergente comercial por varios minutos.
- 3) Sumergir en una solución de alcohol, que generalmente es al 70% con la finalidad de eliminar las burbujas de aire y disolver la capa epicuticular del explante.
- 4) Sumergir en una solución de hipoclorito de sodio ó calcio, con agua destilada, los agentes desinfectantes son eliminados por medio de varios lavados con agua destilada esterilizada.

La elección del tiempo de esterilización y la concentración de las soluciones estará en función de cada caso. La efectividad de los agentes desinfectantes puede ser mejorada con adicionando una gota de detergente biológico (tween 20, 80, etc.), esto ayuda a romper la tensión superficial y permite que el agente elimine los microorganismos. (Pierik 1990; Kyte 1987; Merino 1987).

Villalobos (1979) Desinfecto su material vegetal de clavel preparando un solución con alcohol al 70 % donde se sumergieron por 2 min., inmediatamente después se pasaron a una solución de hipoclorito de calcio al 4 %. En esta suspensión los ápices permanecieron 10 min., al cabo del cual fueron enjuagados 3 veces con agua esterilizada.

Pennazio (1975) solamente los desinfecto con hipoclorito de sodio al 1 % durante varios minutos, posteriormente quedaron listos para ser transferidos a medio líquido.

Shabdé y Murashige (1977) utilizaron una solución de 0.5 % de hipoclorito de sodio añadiendo dos gotas de tween 20, después de 5 min en la solución desinfectante, fueron enjuagados 3 veces en agua destilada esterilizada.

Earle y Langhans (1975) mencionan que sus plantas donadoras y explantos provenían de invernaderos, por lo cual no necesitaron esterilizar su material especialmente los ápices para clonarlos in vitro.

Roest y Bokelmann (1981) desinfectaron su material utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 20 min. posteriormente enjuagaron en 3 tiempos durante 30 a 45 min. con agua destilada esterilizada.

Navarro (1985) desinfectó el material siguiendo una combinación de los propuestos por Shabdé y Murashige (1977) y Villalobos (1979). Pero lo mantuvo en una solución antioxidante de ácido ascórbico (100 mg/l) y ácido cítrico (150 mg/l), hasta el momento de la siembra.

Kyle (1987) lavó el material vegetal de clavel con detergente y agua corriente y posteriormente se realiza una mezcla de 1/10 de blanqueador con 0.1 % de tween 20 por 5 min. y enjuagó 2 veces con agua destilada esterilizada por 3 min.

3.3.2.2.- SELECCION DEL INOCULO

Se denomina inóculo o explanto a la pequeña porción de tejido de la planta utilizada para iniciar el cultivo in vitro. (Hartmann 1988).

Para seleccionar el explanto adecuado se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos:

a) Edad de la planta.- Conforme una planta envejece, su capacidad regenerativa disminuye por lo que se deben utilizar plantas jóvenes.

b) Edad del órgano o tejido.- los tejidos jóvenes son más apropiados para el cultivo in vitro, que los lignificados.

c) Estado fisiológico.- Los tejidos o fragmentos de plantas en estado vegetativo regeneran in vitro con mayor facilidad que los provenientes de plantas en estado reproductivo.

d) Estado fitosanitario.- las plantas provenientes de invernadero tienen menores problemas fitosanitarios que las cultivadas en campo.

e) Tamaño del explanto.- Cada fracción aislada de una planta tiene su propia porción de reservas y hormonas, y es obvio que cuanto mayor sea el fragmento vegetal más fácil es inducir el crecimiento y regeneración. (Pierik 1990; Debergh y Read 1991; Navarro 1987).

Diferentes resultados se han obtenido del cultivo de meristemas del clavel dependiendo de la época de colecta, del genotipo y de la técnica usada en el crecimiento del material inicial. (Cuadro No 3)

Sobre el primer factor se realizó un estudio sobre 6,000 meristemas que fueron colectados en diferentes épocas del año (Stone (1963), Hollings y Stone (1968)). Los mejores resultados fueron obtenidos en marzo-abril y el porcentaje de plantas enraizadas obtenidas decreció hasta julio-agosto, alcanzando otro máximo en septiembre-octubre, y decreció otra vez en diciembre, cuando los resultados fueron no satisfactorios. Estas diferencias no están correlacionadas con la época de colecta en relación con la floración o con el fotoperíodo (plantas que crecieron bajo luz artificial continua) y fueron atribuidos a ritmos biológicos intrínsecos de la planta madre. Un similar experimento realizado por Kowalska (1974) tuvo mejores resultados en Junio y otra vez resultados no satisfactorios en diciembre y febrero. marzo, abril y mayo fueron los mejores y diciembre resultados no satisfactorios. (Izvorska y Kacharmov (1977)). En general se puede recalcar que la época de recolección de material y el crecimiento del mismo, no depende el porcentaje de meristemas obtenidos. (Mii et al 1990).

Por lo que respecta a las diferentes variedades de clavel usadas en la regeneración de meristemas existen pocos estudios específicos entre lo que se encuentran los de Van Os (1964) y Van Hoof (1971), que concluyeron que no existen diferencias significativas entre las variedades usadas. Maia et al (1959) recalco la presencia de diferentes requerimientos nutricionales

entre los claveles de tipo Mediterraneo y del Sim. Izorvaska y Kacharmazov (1977) obtuvieron resultados más estables con la variedad Crowley que con William y White Sim.

3.- FASE 2 O MULTIPLICACION DEL PROPAGULO

En esta fase se busca una rápido desarrollo, por medio de la inducción de brotes adventicios o brotes axilares, lo que son estimulados con altas concentraciones de citocininas, en menor presencia de concentración de auxinas, buscando el nivel hormonal más apropiado en cada caso. (Ochoa 1983; Debergh y Read 1991).

Consiste además de una serie de subcultivos o repicados periódicos que permiten una rápida multiplicación de los propágulos, optimizando la concentración del nivel hormonal, debido a que de esta depende la formación de brotes. (Murashige 1974; Debergh y Read 1991). (Cuadro No 4).

Un objetivo más en esta fase es conseguir la propagación sin perder la estabilidad genética, por lo cual se recomienda no excederse de cinco subcultivos, ya que el vigor de la planta y la calidad de la misma puede decrecer. (Navarro 1987).

CUADRO No 2 DE DIFERENTES TIPO DE INOCULOS O EXPLANTOS
Y SU RESPUESTA DE CRECIMIENTO

INOCULO	RESPUESTA DE CRECIMIENTO	INVESTIGADOR
Meristemo Puntas Terminales	Plantas Plantas	Shabdé y Murashige 1977 Quak 1957 Baker y Phillips 1962 Stone 1963 Van Os 1964 Phillips y Matthews 1964 Morel 1964 Hollings 1965 Alpi 1965 Miai et al 1969 Takeda 1974 Jelaska y Sutina 1977 Hackett y Anderson 1967 Petru y Landa 1974 Takeda 1974 Earle y Langhans 1975 Davis et al 1977 Jelaska y Sutina 1977 Hempel 1979 Kakehi 1970 Petru y Landa 1974 Earle y Langhans 1975 Roest 1977 Roest y Bokelmann 1981 Kakehi 1970 Engvild 1972 Debergh 1972 Malcewska et al 1979 Petru y Landa 1974
Nudos de tallos Entrenudos	Multiplicación de brotes y plantas	
	Callos	
Hipocotilo	Multiplicación de brotes y plantas	Takeda 1978
Hoja	Multiplicación de brotes y plantas	Kakehi 1978 Gimelli et al 1983 Villalobos 1981
Petalo	Multiplicación de brotes y plantas	
Antera	Multiplicación de brotes y plantas	Mii y Cheng 1982
Mesofilo	Callos	
Protoplasto	Fertilización en tubo y plantas	Zenkter 1965
Ovulo		

FUENTE : MII ET AL 1990

CUADRO No 4 DE PROLIFERACION CON LAS CANTIDADES, TIPO DE REGULADORES, Y TIPO DE EXPLANTO UTILIZADO

Apices terminales			
Hackett y Anderson	1967	0.1 mg/lt ANA	0.3 mg/lt KIN
Earle y Langhans	1975	0.1 mg/lt ANA	0.5 mg/lt KIN
Davis et. al.	1977	1.0 mg/lt ANA	10 mg/lt KIN
Shabdé y Murashige	1977	0.3 mg/lt AIA	1.0 mg/lt KIN
Jelaska y Sutina	1977	0.02 mg/lt ANA	2.0 mg/lt KIN
Hempel	1979	0.1 mg/lt ANA	1.0 mg/lt BA
Navarro	1985	0.3 mg/lt AIA	1.0 mg/lt KIN
Ioannov	1990	0.02 mg/lt ANA	2.0 mg/lt KIN
Nudos de tallo			
Roest y Bokelman	1981	0.1 mg/lt AIA	1.0 mg/lt BA
Kim y Kang	1989	0.1 mg/lt ANA	1.0 mg/lt BA
Hipocotilo			
Petru y Landa	1974	4.0 mg/lt AIA	3.0 mg/lt KIN
Hoja			
Takeda	1978	1.0 mg/lt ANA	1.0 mg/lt BA
Petalos			
Takehi	1978	1.0 mg/lt ANA	1.0 mg/lt BA
Gimelli et. al.	1983	1.0 mg/lt ANA	1.0 mg/lt BA
Antera			
Villalobos	1981	1.0 mg/lt AIA	1.0 mg/lt KIN

3.3.4. - FASE 3 Ó ENRAIZAMIENTO

En esta fase se involucra la inducción y diferenciación de raíz, en los brotes obtenidos durante la proliferación, dándose así la conversión de un estado heterotrófico a un autotrófico al desarrollar sus raíces, confiriéndole además una determinada tolerancia a la tensión de humedad. (Cruz 1983).

También incluye la preparación de los vástagos y plantas que se obtienen en la fase de proliferación, es decir la iniciación de la elongación del vástago e inducción a la formación de raíces, ya sea in vitro o posteriormente in vivo. (Navarro 1987).

Los factores que afectan el enraizamiento son:

a) Especie.- Existen diferentes respuestas al enraizamiento de las plantas in vitro dependiendo de la especie y aún de la variedad. (Ochoa 1983).

b) Cofactores de enraizamiento.- Se utilizan compuestos fénolicos durante esta etapa. (Welander y Hutrieser 1981 citados por Ochoa 1983), sin embargo, otros autores encontraron que no tienen ventajas y que son inhibitorios. (Zimmermann y Brome 1981 citados por Ochoa 1983).

c) Carbón activado.- La adición al medio de este produce efectos favorables en la fase de enraizamiento, ya que incrementa la longitud de raíz, así como el porcentaje y velocidad de enraizamiento. (Ochoa 1983).

d) Concentración de reguladores de crecimiento.- El crecimiento y desarrollo de las plantas es ejercido, particularmente por la concentración relativamente alta de auxinas con respecto a las citocininas, para promover la inducción de la raíz. (Pierik 1980; Debergh y Read 1981).

Para su enraizamiento el clavel in vitro, se han empleado el medio de Morel sin reguladores de crecimiento con una baja concentración de ANA 0.4 mg/lit. (Petru y Landa); la kinetina no es requerida para el enraizamiento, y en altas concentraciones inhibe la formación de raíz. (Shabdé y Murashige 1977).

Otros investigadores han empleado el medio de Murashige y Skoog al 50 % de su concentración de sales minerales, sin reguladores de crecimiento, ya que las concentraciones endógenas de reguladores del clavel son suficientes para inducir a la formación de raíz. (Hackett y Anderson 1967; Kyte 1987; Navarro 1987). El enraizamiento en medio sin reguladores de crecimiento ocurre usualmente a las dos semanas. (Earle y Langhans 1975).

Investigadores como (Earle y Langhans 1975, y Davis et. al 1977) no utilizan esta fase puesto que los brotes de 2 cm de longitud fueron enraizados in vivo, como esquejes tradicionales en bloques de sustrato sintéticos denominados pellets y en cámaras de nebulización para evitar la desecación de los brotes.

5. - FASE 4 ó ACLIMATIZACION

Una planta que se ha originado in vitro difiere en varios aspectos de las que se originan in vivo.

a) Las plantas cultivadas in vitro tienen escasamente desarrollada la cutícula debido a la alta humedad relativa, en consecuencia, cuando se transfiere a suelo se produce una transpiración cuticular extra ya que la humedad del aire es más baja.

b) Las hojas de una planta producida in vitro son blandas y fotosintéticamente poco activas, y por lo tanto mal adaptadas a las condiciones que pueden encontrar in vivo.

c) Las hojas presentan las células empalizadas con grandes espacios intercelulares, baja frecuencia de estomas y poco operativos, por lo que las plantas son más sensibles a la pérdida de agua.

d) Las raíces originadas in vitro son vulnerables y no funcionan bien, por lo que mueren rápidamente y deben ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas. (Rosell y Villalobos 1990; Pierik 1990)

Un aspecto importante para la fase 4 es el sustrato, el cual debe estar esterilizado y presentar características de porosidad, buen drenaje, aireación y un pH adecuado. En algunos casos se adicionan nutrientes al sustrato para incrementar la sobrevivencia de las plantas. (Navarro 1987).

Para mantener la humedad relativa se han utilizado bolsas de polietileno, así como vasos de precipitado que cubren de manera individual a una planta, éstos últimos se utilizan a menor escala y en ensayos de laboratorio. En los últimos años los sistemas de neblina ó nebulización se han generalizado para la aclimatización de plantas in vitro, manteniendo una humedad relativa alta e incrementando la humedad del suelo y por lo consiguiente elevando el nivel de sobrevivencia de las plantas in vitro. (Pierik 1990; Debergh y Read 1991).

Hurtado en 1987 estableció la metodología para aclimatar plántulas de clavel, la cual consiste ensacarlos de los tubos, lavar raíces y sumergirlas posteriormente en una solución de

Promyl al 26 %, y colocarlas posteriormente en vasos de unicel, que contienen sustrato previamente esterilizado. Las plántulas se siembran en los vasos, añadiendo sustrato hasta cubrir totalmente sus raíces y una vez sembradas se les da un ligero riego con sales inorgánicas de Murashige y Skoog al 50 % y se les coloca una bolsa de polietileno transparente.

Los vasos con las plántulas son colocados en el cuarto de incubación durante tres semanas, haciendo un orificio pequeño en el extremo superior de la bolsa a la semana de haberse realizado el trasplante y uno más en el otro extremo a la segunda semana, con la finalidad de ir disminuyendo la humedad relativa dentro de la bolsa.

A las tres semanas los vasos se transfieren al invernadero, colocándose sobre bancales y se les proporcionan un sombreado colocando mallas encima de las mesas del invernadero, las cuales se irán quitando hasta que la planta se adapte a luz solar directa.

3.6.- MEDIO DE CULTIVO

El éxito del cultivo de plantas depende del uso del medio nutritivo adecuado, y de la composición química del mismo y de otros factores como: tejidos viables, incubación y calidad de reactivos. (Merino 1987; Lopez 1990)

El medio de cultivo es una solución acuosa que está formada por tres clases de sustancias: compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte.

3.6.1.- SALES MINERALES

Las sales minerales se dividen en dos grandes grupos macroelementos y microelementos.

3.6.1.1.- MACROELEMENTOS

Los tejidos requieren de una fuente continua de compuestos orgánicos. Además de carbono, hidrógeno y oxígeno; son sustancias que se agragan al medio en cantidades en gr. y son N, P, K, Ca, S, y Mg.

NITROGENO

Influye en el índice de crecimiento de la planta, elemento esencial en la composición molecular de la clorofila, alcaloides, ácidos nucleicos y aminoácidos. Las fuentes de N para el medio de cultivo son compuestos de amonio y nitratos. (Kyte 1987; Lopez 1990).

FOSFORO

Su principal utilidad es como activador de enzimas; las fuentes de fosforo utilizadas in vitro son el fosfato de sodio y de potasio. (Kyte 1987; Lopez 1990)

POTASIO

Influye en la división celular, en la síntesis de carbohidratos y proteínas y sus fuentes para el medio cultivo son el nitrato de potasio y fosfato de potasio. (Kyte 1987; Lopez 1990).

CALCIO

Es parte integral de la pared celular de la planta y juega un papel en la permeabilidad de misma. Facilita el movimiento de los carbohidratos y aminoácidos, generalmente incluido como cloruro de calcio y nitrato de calcio. (Kyte 1987; Lopez 1990).

MAGNESIO

Elemento central de la molécula de la clorofila, es importante como activador de enzimas y se suministra como sulfato de magnesio.

AZUFRE

Presente en algunas proteínas, promueve el desarrollo de raíces y de follaje verde, se suministra en forma de sulfatos. (Kyte 1987; Lopez 1990).

3.6.1.2.- MICROELEMENTOS

Para una adecuada actividad metabólica, las células requieren de microelementos, como el Fe, Cl, I, Mn, Zn, Bo, Cu, Co, y Mo, siendo los últimos cinco elementos fundamentales para la síntesis de la clorofila y en la función de los cloroplastos, y se agregan al medio de cultivo en cantidades pequeñas (mg).

FIERRO

Participa en la síntesis de la clorofila, en la conversión de energía en la fotosíntesis y la respiración, es incluido como sulfato ferroso y es mezclado con la sal EDTA, que lo libera poco a poco siendo así más asimilable por la planta. (Kyte 1987; Lopez 1990).

MANGANESO

Es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético. Además esencial en la membrana del cloroplasto y es utilizado como sulfato de manganeso.

ZINC

Elemento vital en varias enzimas, involucrado en la formación de la clorofila, así como en la síntesis del ácido indolacético, suministrado como sulfato de zinc. (Kyte 1987; Lopez 1990).

BORO

Necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, es adicionado como ácido bórico. (Kyte 1987; Lopez 1990).

COBRE

Es necesario en la conversión de energía como alternante de los estados cuproso y cupricó e incluido como sulfato de cobre.

COBALTO

Elemento de la molécula de la vitamina B₁₂ que es esencial para la fijación de N, suministrado como cloruro de cobalto.

MOLIBDENO

Participa en la conversión del N en amoníaco y en la fijación del N, suministrado como molibdanato de sodio.

CLORO

Esencial para estimular la fotosíntesis, está incluido en grandes cantidades como cloruro de calcio. (Kyte 1987; Lopez 1990).

YODO

Adicionado como yoduro de potasio, no es considerado como esencial, aunque es componente de algunos aminoácidos. (Kyte 1987; Lopez 1990).

3.6.2.- VITAMINAS

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las vitaminas suministradas in vitro pertenecen al grupo B y son:

Tiamina.- Ayuda a la respiración en el ciclo de krebs.

Acido nicotínico.- Constituyente de coenzimas en las reacciones luminosas.

Piridoxina.- Sirve como coenzima en las vias metabolicas.

Acido pantotenico.-Coenzima en el metabolismo de las grasas.

Acido fólico.- Su función como vitamina B₂ demuestra su actividad como coenzima.

Inositol.- No es del complejo B, sino un azúcar-alcohol, estimula la morfogénesis, participa en la vía biosintética del ácido galacturónico.(Kyte 1987; Lopez 1990).

3.5.3.- AMINOACIDOS

Los aminoácidos no son esenciales para el cultivo de tejidos, pero proporcionan una fuente inmediata de N y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado al medio. A continuación se indican las funciones de los aminoácidos in vitro la glutamina y la aspargina son transportadoras de nitrógeno la arginina estimula la raíz; la serina empleada en el cultivo de microesporas y la cisteína es agente reductor.(Lopez 1990).

3.6.4.- AZUCAR

Los tejidos en cultivo in vitro, son heterotróficos con respecto al carbono, debido a su baja eficiencia en la actividad fotosintética por lo que resulta indispensable añadir glúcidos al medio de cultivo.(Margara 1988).

Las plantas que crecen in vitro no pueden sintetizar sus propios carbohidratos, por eso requieren de una alta concentración de azúcar, que puede ser de 20-45 gr/lit dependiendo de las fórmulas de los medios de cultivo. (Kyte 1987).

3.6.5. - AGUA

El agua es uno de los componentes químicos más importantes, ya que constituye el 95 % del medio nutritivo. (Pierik 1990).

El agua utilizada para la elaboración de medio debe ser destilada, bidestilada o desmineralizada y su almacenamiento debe ser por poco tiempo, debido a que puede disolverse sustancias químicas de los recipientes. (Lopez 1990).

3.5.6. - AGENTES GELIFICANTES

Comúnmente se ha empleado el agar como agente gelificante para la preparación de medios sólidos o semisólidos. El agar es una mezcla de polisacáridos derivados de extractos de varias algas rojas.

Sus ventajas son :

- a) Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C, siendo estable en todas las temperaturas de incubación.
- b) No es alterado por las enzimas vegetales.
- c) No reacciona con los constituyentes del medio.
- d) No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio. (Lopez 1990).

Por lo general se utiliza 6 gr/lit, pero la solidez varía con la fórmula del medio usado, la fuente y el origen del agar. (Kyte 1987).

Se han empleado otros compuestos para sustituir el agar, sin embargo pocos han tenido éxito. El gelrite es que más popularidad tiene; este se utiliza a la mitad de la concentración del agar; los geles del gelrite son más caros y también cuajan más rápido que el agar, se utiliza 2 gr/lit. (Pierik 1990; Lopez 1990).

3.6.7. - CONSTITUYENTES NO DEFINIDOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

Existen dos fuentes de estos constituyentes no definidos de origen vegetal como el agua de coco, machacados de tomate, uva, pifia, savia de abedul y pure de plátano entre otros. Estas pueden ser evitadas, debido a que composición es muy variable, ya que existe diferencias entre la edad de los frutos e incluso en frutos misma edad.

Las fuentes de nitrógeno orgánico son otra fuente, y son la caseína hidrolizada, peptona, triptona, extracto de malta y el extracto de levadura como fuente de vitamina B. (Pierik 1990).

3.6.8. - REGULADORES DEL CRECIMIENTO

En el cultivo in vitro, los reguladores especialmente las auxinas y citocininas, son importantes, y se puede decir que sin reguladores el cultivo in vitro es imposible. (Pierik 1990).

La expansión actual de la investigación sobre la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa in vitro está ligada a las auxinas y citocininas. mientras que la importancia de las giberelinas parece tener poco efecto en el cultivo in vitro. (Margara 1988).

3.6.8.1.- AUXINAS

Las auxinas promueven la elongación celular y la expansión de los tejidos, división celular (formación de callos) y formación de raíces adventicias, inhiben la formación de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente inhiben la embriogénesis en cultivos en suspensión. (Kyte 1987; Pierik 1990).

Las auxinas son comúnmente usadas en el medio de cultivo combinadas con citocininas durante la fase de multiplicación y sin citocininas en la fase de enraizamiento. (Kyte 1987).

La baja concentración de auxinas inducen a la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones inducen a la formación de callo. (Lopez 1990).

Las auxinas que más frecuentemente se utilizan en la elaboración del medio son:

* Acido Indolacético	(AIA)
* Acido Indolbutírico	(AIB)
* Acido Naftalenacético	(ANA)
* Acido 2,4 Diclofenoxiacético	(2,4-D)

El AIA y el AIB son auxinas relativamente débiles, el primero se produce de forma natural en las plantas, mientras que las demás auxinas son sintéticas y son relativamente más estables y activas. El ANA es una auxina fuerte y el 2,4-D es muy fuerte. (Margara 1987; Pierik 1990).

Las propiedades de los distintos compuestos son bien diferentes, el AIA se utiliza en investigaciones de tipo fisiológico, ya que es una sustancia natural, pero por la misma razón, es sensible a los sistemas enzimáticos de degradación de la auxina y sus soluciones no tienen estabilidad y se oxidan con la luz.

El AIB es utilizado para trabajos dirigidos a la multiplicación vegetativa. El ANA es un sustancia fuerte, muy estable, utilizada para provocar la rizogénesis y el 2,4-D es muy fuerte, ya que es tóxico en concentraciones elevadas, ya que induce a la formación de callo y a mutaciones. (Margara 1988).

3.6.8.2.- CITOCININAS

Las citocininas estimulan la división celular; si van acompañadas de una auxina inducen a la formación de vástagos adventicios, en concentraciones elevadas (1 a 10 mg/l) sin embargo inhiben la formación de raíces, la dominancia apical y retardan el envejecimiento. (Kyle 1987; Pierik 1990).

Las citocininas que más se emplean en el cultivo in vitro son :

- * Kinetina (K)
- * Bencilaminopurina (BA)
- * 2- isopentiladenina (2IP)
- * Zeatina (Z)

La BA se emplea con frecuencia debido a su gran actividad y su bajo costo y algunos investigadores prefieren la zeatina por ser una sustancia natural. Aunque la elección de la citocinina pueda ser importante en algunos casos, por lo general no es necesario realizar estudios tan rigurosos como en el caso de las auxinas. (Margara 1988).

3.6.8.3.- OTROS REGULADORES

Las giberelinas no son utilizadas usualmente en el cultivo in vitro, debido a que no son esenciales. Se debe tener en cuenta que son muy sensible al calor y pierde el 90 % de su actividad biológica después del autoclaveado. (Van Bragt et al 1971 citado por Pierik 1990). El ácido abscísico y el etileno producen efectos

negativos en el cultivo in vitro, el primero todavía no se tiene claro su efecto, mientras que el etileno detiene el crecimiento, cuando los tubos de ensaye son cerrados herméticamente. (Pierik 1990).

El medio utilizado para el cultivo in vitro de clavel puede dividirse en 2 grupos. El medio nutritivo usado por los primeros investigadores está basado en la solución de Knop a la mitad o al 100 % de concentración y fue suplementado con elementos menores, y constituyentes orgánicos (Phillips 1962, Baker y Phillips 1962, Stone 1962, Van Os 1964 citados por Mii et al 1990). El otro está basado en una alta concentración de sales minerales, La solución de Murashige y Skoog, que estimula el crecimiento de explantos vigorosos, ahora es muy usado para varios cultivos de órganos, tejidos ,células y es muy usado para la micropropagación. (Hackett y Anderson 1967, Petru y Landa 1974, Shabdé y Murashige 1977, Kim et al 1987, Ioannov 1990).

Diferentes autores mencionan que el pH del medio de cultivo varía desde 5.2 (Peña 1979) a 6.5 (Phillips y Matthews 1964), sim embargo otros estudios realizados por Paludían (1971) y Kowalska (1974) demostraron que el pH 5.5 es el óptimo para el enraizamiento y producción de plantas. (Mii et al 1990)

Las combinaciones de hormonas usualmente son altas en citocininas (2 a 10 μ M) y bajas enauxinas (0.1 a 0.5 μ M) han sido efectivas para la producción de brotes. (Petru y Landa 1974, Earle y Langhans 1975, Hempel 1979, Dabski et al 1979, Kozark y Hempel 1979 citados por Mii et al 1990).

3.7.- CONDICIONES DE CULTIVO

Los principales factores físicos que influyen a lo largo de las distintas fases in vitro son la luz, temperatura y humedad entre otros.

LUZ

Es un factor importante que depende de la duración del día, irradiación o luminosidad y composición. Poco se sabe sobre el efecto de la duración del día en el cultivo in vitro, generalmente se utiliza un fotoperíodo de 14-16 horas luz, aunque también se usa luz continua. En principio el mejor fotoperíodo in vitro sera el que funcione mejor en esquejes o plantas intactas.

La luminosidades altas que se producen en campo (30-70 Wm^2) son dafinas para el cultivo in vitro. El crecimiento tiene lugar a una luminosidad de 8-15 Wm^2 o a veces a una luminosidad muy baja, para esto se utilizan tubos fluorescentes de tipo blanco frío, aunque se han observado mejores resultados con luz de sodio de alta presión. (Norton y Norton citados por Pierik 1990).

TEMPERATURA

Se mantiene generalmente constante de 24 a 26°C, a veces dependiendo de la fase y especie. La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo in vitro, es de 3-4°C más alta que para el crecimiento in vivo, debido a que la temperatura en los tubos de ensaye es 3-4°C más alta que en la cámara de crecimiento debido al efecto de la irradiación. Para procesos especiales, como la formación de yemas florales, ruptura de la dormancia y germinación de semillas, se deben elegir temperaturas más bajas. (Pierik 1990)

HUMEDAD

Sobre la influencia de la humedad de la cámara de crecimiento y desarrollo in vitro, existe poca información. Teniendo en cuenta que la humedad de los tubos de ensaye es relativamente alta, la humedad de la cámara de crecimiento probablemente influiría en un mayor cantidad de infecciones. (Pierik 1990).

OXIGENO

Una buena aireación es un factor importante para el crecimiento de células, tejidos, etc. El suministro de oxígeno en el tubo de ensaye puede mejorarse utilizando sólo tapones metálicos y no tapones de algodón y utilizando medios líquidos. (Pierik 1990).

DIOXIDO DE CARBONO

Aunque el CO_2 se puede utilizar como una fuente de carbono, la sacarosa es una fuente mucho mejor. La adición de CO_2 in vitro tiene escaso valor, debido a que la concentración del mismo es muy alta en tubo de ensaye bien sellados. Sin embargo debe tomarse en cuenta que la fotosíntesis in vitro es muy inferior a la normal, debido a la baja irradiación siendo de poco interés el suministro de CO_2 . (Pierik 1990).

La temperatura para establecer el clavel varía desde $22 \pm 2^\circ C$ (Davis et al 1977) hasta $26^\circ C$ (Jelaska y Sutin 1977). En cuanto a la intensidad lumínica ésta ha sido muy diferente de acuerdo al autor y va desde 2000 a 10000 lux y varios autores han sugerido usar un fotoperíodo de 16/8 horas luz (Jelaska y Sutin 1977) y 14/10 (Hempel 1979), (Davis et al (1977); sugirieron incrementar la intensidad lumínica de 2000 a 8000 lux y la temperatura de $22^\circ C$ a $25^\circ C$ cuando se pasa de la fase de iniciación a la de multiplicación. (Mii et al 1990).

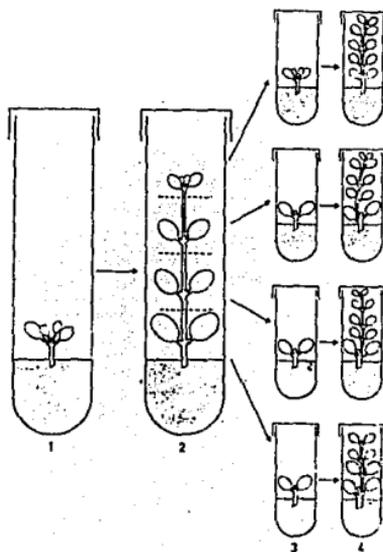
Navarro y Vera 1987, utilizaron en las fase I y II una intensidad lumínica de 1000 a 2000 lux, un fotoperíodo de 16 horas luz por día y una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Mientras en la fase III la intensidad lumínica fue de 8000 a 10000 lux, el fotoperíodo de 10/8 horas aluz por día y la temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.8. - METODO DE PROPAGACION IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES

Con este nombre se conoce al aislamiento de una yema junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este método es el más natural en la propagación vegetativa de las plantas in vitro. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a las del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, realizándose los repicados necesarios. Cuando se aplica este método se deben tener en cuenta los siguientes puntos.

- 1) El aislamiento por este método es prácticamente imposible cuando se trata de plantas en roseta y cuando las posibilidades de infección son altas.
- 2) Para reducir las posibilidades de infección es mejor aislar yemas cerradas. En el caso de que existan infecciones internas este método es impracticable, siendo necesario acudir al cultivo de meristemas.
- 3) La velocidad de propagación depende del número de yemas disponibles, si este número es pequeño la velocidad de multiplicación resulta lenta. (Pierik 1990), (figura No 2).

FIGURA No 2 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL METODO DE
EXPLANTOS NODALES PARA LA PROPAGACION VEGETATIVA



FUENTE : PIERIK 1990

3.9.- PROBLEMÁTICA DEL CLAVEL IN VITRO

3.9.1.- VITRIFICACION

Las plantas herbáceas y leñosas propagadas in vitro son frecuentemente afectadas por desarreglos morfológicos y fisiológicos por varios factores de cultivo. Las anomalías anatómicas, morfológicas y fisiológicas han sido descritas por varios términos: vitrificación, translucencia, hiperhidratación, succulencia y cristalización. Vitrificación es el término más empleado pero se refiere a procesos fisiológicos y no a cambios biológicos. (Maene y Debergh 1984 citados por Ziv 1991). Los desórdenes se manifiestan mayormente en las hojas, afectando los procesos de la fotosíntesis y el intercambio de gases (CO_2 , vapor de agua). Las anomalías anatómicas se manifiestan por la menor extensión de tallos y raíces. Estos desórdenes impiden establecer plantas micropropagadas a la fase *ex vitro*. (Ziv 1991)

Los requerimientos especiales para la proliferación in vitro, la alta humedad, factores nutricionales, así como minerales y carbohidratos, altos niveles de reguladores de crecimiento y la menor intensidad de luz son las mayores causas que inducen a la malformación de brotes (Ziv 1986, Gaspar et al 1987). Debergh (1987) indica que la humedad relativa y el potencial del agua son factores que se involucran en la morfogénesis anormal in vitro. (Ziv 1991).

En hojas hiperhidratadas examinadas en microscopio revelaron que en mucho de los casos poseían un tejido de empalizada muy delgado o carencian del mismo. El mesófilo no organizado consiste en parenquima esponjoso, con abundancia de espacios intercelulares.

En el clavel se incrementaron los espacios intercelulares debido al contenido de agua del protoplasto. (Kevers y Gaspar 1986), El contenido de clorofila fue menor en hojas vitrificadas que en hojas normales. (Ziv et al 1983). Las hojas vitreas estuvieron asociadas con tejido de la epidermis en donde la deposición defectuosa de la cera epicuticular se manifestó, diferencia en cantidad y calidad con respecto a hojas normales. (Sutter y Langhans 1979, Ziv et al 1981, 1983).

En estudios histoquímicos las células guardias de hojas de clavel vitreas revelaron un nivel bajo de pectina, cutina y celulosa. (Ziv y Ariel 1987, Werker y Leshem 1987). El estoma se daña alrededor de la pared, esto se debe a que las células guardias se dañan por la deformación de la lámina de la célula durante la división primaria de las células madres del estoma en medio líquido. (Leshem 1983).

Las células hiperhídricas en hojas vitreas pueden ser atribuidas a la defectuosa lignificación (Kevers 1987). La relación célula-agua en las plantas es regulada por las propiedades de elasticidad y plasticidad de la pared celular, los cambios en la celulosa y la biosíntesis de lignina pueden alterar la extensibilidad de la pared celular, resultando en una reducción de la presión de turgencia de la célula. (Kevers 1987)

Dos importantes factores de las condiciones de cultivo han sido asociados a una morfogénesis anormal; la fase física y química del medio y la atmósfera de cultivo, en particular el vapor de agua, CO_2 y el etileno en su fase gaseosa. (Ziv 1986, Debergh 1987). El incremento del agar reduce la vitrificación,

pero también disminuye el índice de propagación, debido a que también se reduce la absorción de otros componentes del medio por el explanto. (Ziv 1981, Debergh 1983).

El efecto de los reguladores de crecimiento en la vitrificación no ha sido estudiado lo suficiente y algunas de las evidencias presentadas son contradictorias. (Ziv 1990). En el cuadro No 5 se hace referencia a investigaciones en claveles en donde se estudia la vitrificación.

CUADRO No 5 INVESTIGACIONES REALIZADAS EN DONDE SE ESTUDIA LA VITRIFICACION EN CLAVEL

AÑO	AUTOR	SUCESO
1981	Ziv	Reducción de la vitrificación (V) por el aumento del agar al medio.
1982	Mele et al	V. por el uso de medios líquidos y semisólidos
1983	Hakkarri y Versilus	V. por el uso de medios líquidos y semisólidos.
1983	Leshem	Reducción de la V. por agentes gelificantes.
1983	Ziv	Reducción de la V. por el aumento de sacarosa.
1984	Kevers et al	V. por uso de medios líquidos.
1985	Gaspar y Kevers	V. por uso de medios líquidos.
1985	Kevers y Gaspar	Reducción de la V. por el incremento de CO ₂ .
1986	Kevers y Gaspar	Hiperhidratación.
1987	Ziv et al	Reducción de la V. al usar medio al 50 % de sales minerales.
1987	Dencso	Brotos vitrificados.
1988	Ariel y Ziv	Incremento de BA brotes vitrificados
1988	Leshem et al	Incremento de Ba brotes vitrificados
1988	Kozai e Iwanami	Incremento de la V.
1989	Kim et al	Prevención de la V.

3.9.2. - VARIACION SOMACLONAL

La mayor desventaja de algunos métodos de propagación vegetativa in vitro, consiste en el riesgo de que se produzcan mutaciones y variaciones genéticas. Cuando se observa una variación genética en plantas que se han generado in vitro, generalmente como resultado de la inestabilidad genética, se utiliza el término de variación somaclonal propuesto por Scowcroft en 1995.

La aparición de mutaciones no resulta fácil de determinar debido a que:

- 1.- La expresión de las mutaciones depende, en gran medida de las condiciones ambientales.
- 2.- Algunas veces ocurren micro-mutaciones que son difíciles de identificar.
- 3.- Se necesitan métodos citológicos para la identificación de los mutantes, lo que implica técnicas especializadas y laboriosas.

En los últimos años, tanto investigadores en el área básica, como en la aplicada, han estado de acuerdo en que los factores que determinan la probabilidad de mutación y su frecuencia durante el cultivo in vitro, son los siguientes:

El método de propagación vegetativa se puede decir que cuanto más se destruye la estructura organizativa de una planta, mayor es la posibilidad de mutación. La estabilidad genética es casi seguro que permanece intacta, si se utiliza el método de segmentos nodales o yemas axilares. Si se producen vástagos adventivos, como el resultado del uso de reguladores, se incrementan las posibilidades de que se produzcan mutaciones y depende de :

La forma de producción de los vástagos adventicios. Si un vástago se origina a partir de una célula, las posibilidades de mutación son mayores que si se origina de un grupo de células, como en el caso de la cebolla. (Hussey y Falavigna 1980 citados por Pierik 1990).

Si se utiliza una quimera, generalmente se obtienen características diferentes de aquella, debido a que los vástagos adventicios suelen originarse a partir de una célula, como es el caso del clavel. (Hackett y Anderson 1967, Dommergues y Guillot 1973 citados por Pierik 1990).

El uso de reguladores como el 2,4-D, ANA y citocininas sintéticas producen un fuerte incremento en mutaciones. La kinetina induce de forma selectiva la división celular en células, que son poliploides en su forma natural. (D'amato 1977 citado por Pierik 1990).

La probabilidad de que aparezcan mutaciones es menor cuando el material inicial es un tejido indiferenciado como el procambium y cambium, que si se compara con un tejido diferenciado como la médula (Pierik 1990).

El material inicial presenta un efecto importante en las mutaciones, las especies poliploides presentan anomalías cromosómicas con más frecuencia que las diploides. (Scowcroft 1985 citado por Pierik 1990).

El número de repicados in vitro incrementa la posibilidad de que se produzcan mutaciones, esto sucede en la formación de vástagos axilares y adventicios, y especialmente en los cultivos de callos, en suspensión y de células aisladas, por lo cual se debe evitar los repicados sucesivos, se debe admitir que se sabe

relativamente poco acerca de las causas por las cuales número de repicados provoca mutaciones.

Hasta ahora no se ha conseguido una mejora genética importante por medio del cultivo de tejidos en ningún cultivo de importancia económica, utilizando variantes somoclonales. (Vasil 1986 citado por Pierik 1990).

3.9.3. - VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS

El uso extendido del clonado o multiplicación in vitro presenta sus ventajas que se indican a continuación. (Pierik 1975, Van Assche 19893, Gebhard et al 1983 citados por Pierik 1990, Margara 1988).

1. - La multiplicación in vitro es más rápida que la multiplicación in vivo, debido a que el nivel de proliferación es elevado y en un tiempo relativamente corto.

2. - Es posible propagar especies in vitro que no pueden multiplicarse in vivo por los métodos clásicos, debido al fenómeno de rejuvenecimiento, que solo es posible realizarlo in vitro

3. - El crecimiento de las plantas propagadas in vitro son más vigorosas que las clonadas in vivo, por el rejuvenecimiento y por estar libres de enfermedades.

4. - Utilizando el cultivo in vitro, es posible multiplicar plantas libres de enfermedades, lo que constituye un material de calidad que justifica un costo de obtención relativamente caro.

5. - Se necesita una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar el cultivo in vitro.

6. - La propagación in vitro puede suponer el ahorro de combustible y espacio, debido a que en poco espacio se tiene un gran número de plantas y en tiempo relativamente corto.

7.- La existencia de condiciones perfectamente controladas, permite una gran precisión en el calendario de producción de plantas y conseguir una producción a lo largo del año.

8.- El cultivo in vitro es especialmente útil para el establecimiento de bancos de germoplasma, por medio de la criopreservación.

El clonado in vitro puede tener sus desventajas.

1.- El riesgo de obtención de variación somaclonal y en algunos de los sistemas de propagación in vitro la estabilidad genética es débil.

2.- Las plantas producidas in vitro pueden mostrar características poco convenientes in vivo, excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.

3.- Las plantas leñosas son muy difíciles de inducir a la formación de raíces y las mismas pueden resultar no funcionales in vivo.

4.- La transferencia de las plantas del tubo de ensayo al suelo es algo complicado.

5.- Las plantas clonadas in vitro pueden morir por la acción de patógenos al ser transplantadas al suelo.

6.- EL clonado in vitro exige una aportación de mano de obra importante, lo que readunda en precios relativamente altos para las plantas que se produ: en de esta forma.

Por lo anteriorse deben considerar ciertos criterios para conseguir el éxito:

- 1.- Estabilidad genética.
- 2.- Selección cuidadosa del material inicial libre de enfermedades.
- 3.- La transferencia a suelo no debe ser complicada.
- 4.- La capacidad de regeneración no debe perderse.
- 5.- El método de propagación in vitro no debe ser demasiado complicado sino será rechazado.
- 6.- Debe ser económicamente viable. (Pierik 1990).

IV. - MATERIALES Y METODOS

4.1. - LOCALIZACION

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Micropropagación del Departamento de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Mex.

4.2. - MATERIAL VEGETAL EMPLEADO

El Material de clavel fue proporcionado por los invernaderos del Estado de Morelos, en la localidad de Tetela del Volcán. Las variedades utilizadas fueron 'Concheta' y 'Nikita rose'.

La variedad Concheta presenta un color salmón anaranjado, longitud de la planta normal de 50 cm o más, rigidez del tallo buena, erecta, y flexible, tamaño de la flor de 6 cm o más, con crecimiento vigoroso y productiva.

La variedad Nikita rose presenta un color de flor rosa, longitud de planta normal de 50 cm o más, rigidez de tallo bueno, erecto y flexible, tamaño de flor de 6 cm o más y con un crecimiento vigoroso.

4.3. - DESINFECCION DEL MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron tallos de 8 a 10 nudos, a los cuales se les eliminaron las hojas, lavándose con una solución acuosa de detergente con agua tibia para eliminar la cera de la epidermis de la planta, enjuagándose posteriormente en agua corriente por 1 min. Se colocaron en un solución de alcohol por 3 min. agregándole una gota de Tween 80, posteriormente se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio por 20 min. enjuagándose a 3 tiempos con agua destilada esterilizada, esta operación se realizó en la campana de aire de flujo laminar.

4.4. - MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo empleado en todo el experimento fue el de Murashige y Skoog (1962) al 100 % y al 50 % de su concentración de sales minerales, complementado con reguladores de crecimiento como es el ácido indolbutírico (AIB) como auxina y kinetina (K) y Bencilaminopurina (BA) como citocininas. Se tomó como base el cuadro de composición del medio de MS.

Cuadro No 6 Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

SALES INORGANICAS			
MACROELEMENTOS (mM/lit)		MICROELEMENTOS (μ M/lit)	
NH_4NO_3	20.6	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100
KNO_3	18.8	H_3BO_3	100
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.0	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	KI	5.0
KH_2PO_4	1.25	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Na_2 - EDTA	100 μ M/lit	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 μ M/lit	$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
COMPUESTOS ORGANICOS			
Myo-inositol	100 mg/lit	Tiamina	0.1 mg/lit
Ac. Nicotínico	0.5 mg/lit	Glicina	2.0 mg/lit
Piridoxina	0.5 mg/lit	Sacarosa	30.0 g/lit
		Agar	6.0 g/lit

FUENTE : GAMBORG ET AL 1976.

4.5.- CONDICIONES DE INCUBACION

Después de haber realizado la siembra, se colocan los tubos en el cuarto de cultivo en donde existe un ambiente controlado, se tiene un fotoperíodo de 16 hrs de luz con una intensidad lumínica de 3000 lux, la temperatura dentro del cuarto se encuentra dentro de un rango de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.6.- IMPLANTACION DEL MATERIAL VEGETAL

Para la siembra del material vegetal se utilizó la campana de aire de flujo laminar y mecheros de alcohol para mantener el mejor ambiente aséptico. Los nudos de las plantas se colocaron en una caja de petri esterilizada en donde se separaron los restos de hojas hasta dejar al descubierto la yema, cortando la parte basal de la yema junto al tallo y lo mismo pasó con la parte de arriba, sin lesionar a la misma, el bisturí y pinzas fueron flameados en cada corte con alcohol al 96 %. Cada yema se colocó en un tubo.

4.7.- FECHA DE SIEMBRA

La fecha de siembra de los tratamientos fue el 22 de Abril de 1993 para la variedad Concheta y el 23 de Abril de 1993 para la variedad Nikita rose.

Durante la fase de multiplicación, la fecha de siembra fue el día 22 de Junio de 1993 utilizando las dos variedades de clavel.

Para la fase III de la investigación la fecha de siembra fue el 28 de Septiembre de 1993 utilizando solamente la variedad Concheta.

4.8. - DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se utilizó para el análisis de los datos fue un parcelas divididas. El diseño consistió en las parcelas grandes que fueron las dos variedades de clavel y las parcelas chicas que fueron las diferentes dosis de reguladores de crecimiento. En total fueron 14 tratamientos con 20 repeticiones para cada uno, en donde la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye, dando un total de 280 unidades experimentales. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey al 0.05 % de significancia. En el cuadro No 7 se muestra la organización del experimento.

CUADRO No 7 DE LA ORGANIZACION DEL EXPERIMENTO EN PARCELAS
DIVIDIDAS EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO

A / C		AIB	AIB	AIB	AIB
MS 50 %	K	Trat. 1 0.0 / 0.0	Trat. 2 0.1 / 0.5	Trat. 3 0.1 / 1.0	Trat. 4 0.1 / 2.0
	BA	0.0 / 0.0	Trat. 5 0.1 / 0.5	Trat. 6 0.1 / 1.0	Trat. 8 0.1 / 2.0
MS 100 %	K	Trat. 8 0.0 / 0.0	Trat. 9 0.1 / 0.5	Trat. 10 0.1 / 1.0	Trat. 11 0.1 / 2.0
	BA	0.0 / 0.0	Trat. 12 0.1 / 0.5	Trat. 13 0.1 / 1.0	Trat. 14 0.1 / 2.0

En la fase II, la investigación se dirigió hacia la multiplicación masiva de los propágulos, por lo cual se eligió el tratamiento que tuvo mejor resultado en la primera fase, para su proliferación. Los tratamientos de la fase I no se perdieron para poder cuantificar la proliferación de cada tratamiento.

En la fase III se utilizó el diseño experimental completamente al azar. El diseño se compuso de una sola variedad de clavel la cual fue Concheta, en total fueron 5 tratamientos con 20 repeticiones por cada uno, dando un total de 100 unidades experimentales. En el cuadro No 8 se muestra la organización de la investigación en la fase III.

CUADRO No 8 ORGANIZACION DEL EXPERIMENTO EN LA FASE III

TRATAMIENTO 1	AIB 0 mg/lt	BA 0 mg/lt
TRATAMIENTO 2	AIB 0.3 mg/lt	BA 0 mg/lt
TRATAMIENTO 3	AIB 0.5 mg/lt	BA 0 mg/lt
TRATAMIENTO 4	AIB 0.3 mg/lt	BA 0.1 mg/lt
TRATAMIENTO 5	AIB 0.5 mg/lt	BA 0.1 mg/lt

4.9.- TOMA DE DATOS

La toma de datos se realizó de acuerdo a las siguientes variables :

FASE I

AD Porcentaje de contaminación.- esta variable se cuantificó en la primera semana, unidad experimental contaminada era eliminada del experimento.

BD Longitud del brote y/o de brotes por tubo.- esta variable se cuantificó a las 8 semanas de haber sido establecido el experimento.

CD Número de brotes .- esta variable se cuantificó a las 8 semanas de haber sido establecido el experimento.

FASE II

En esta fase se cuantificó el número de brotes por tratamiento, debido que los tratamientos de la fase anterior no se perdieron y se colocaron en el medio de proliferación.

FASE III

En esta fase se evaluaron las siguientes variables:

AD Días de aparición de emisión de raíces.

BD Porcentaje de enraizamiento.

Estas variables se cuantificaron a las 2 semanas de haber sido establecido el experimento.

V. - RESULTADOS Y DISCUSION

5.1.- ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASEPTICO

5.1.1.- DESINFECCION DEL MATERIAL VEGETAL

El método de desinfección del material vegetal resultó ser efectivo en un 79.29 % en todo el experimento. En la variedad Nikita rose fue del 82.86 % de sobrevivencia y presentó un porcentaje de contaminación del 17.14 %. La variedad Concheta presentó un 75.71 % de sobrevivencia y un 24.29 % de contaminación.

Los tratamientos 8 y 11 de la variedad Concheta fueron los que presentan una mayor contaminación con un 40 %, mientras en la variedad Nikita rose los tratamientos 7, 8, 11, 12 y 14 presenta una contaminación del 30 %. (Ver figura No 3). Los tratamientos que presentaron un 100 % de sobrevivencia fueron 1, 4, 5 de la variedad Nikita rose y el más alto índice de sobrevivencia de la variedad Concheta se presenta en los tratamientos 1, 3 y 10 con un 90 %. (Ver figura No 4.)

Pierik 1990 Menciona que existen factores que influyen en la contaminación de los cultivos como: la procedencia del inóculo o explanto, si éste procede de campo existe mayor posibilidad de tener índices de contaminación altos, que si éste creció bajo condiciones de invernadero, la anatomía de la yema, debido a que ésta se localiza en el nudo y envuelta por la hoja con lo cual es más complicado tener buenas condiciones de asépsia bajo este método de propagación in vitro, y el factor humano que es la destreza para extraer las yemas y el trabajar en la campana de flujo laminar.

Pennazio 1975 obtuvo resultados similares de sobrevivencia con 87.82 % trabajando con meristemos. Jelaska y Sutina 1977 obtuvieron un porcentaje de sobrevivencia de 50.32 % trabajando con meristemos y Roest y Bokelman 1981 presentaron los mejores resultados de sobrevivencia con 95.6 % también trabajando con meristemos, que es una estructura más pequeña y es más factible tener mejores resultados de asépsia.

FIGURA No 3

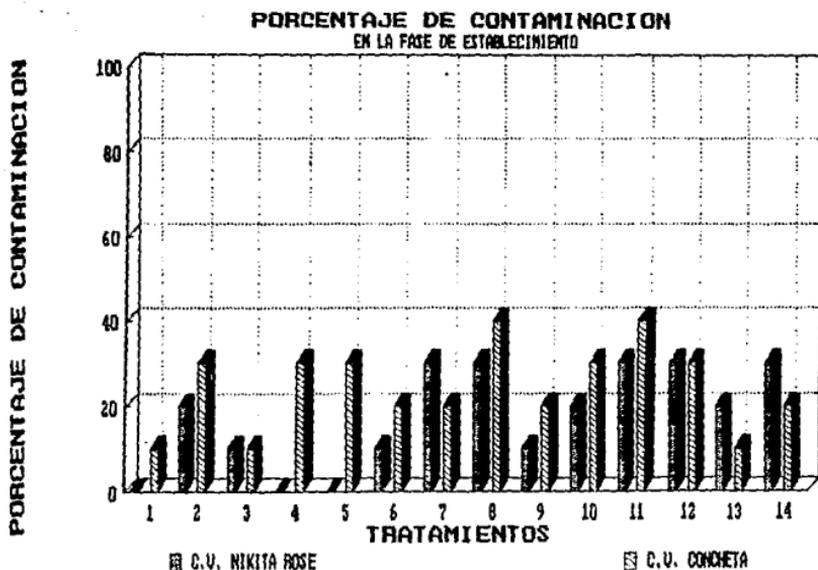
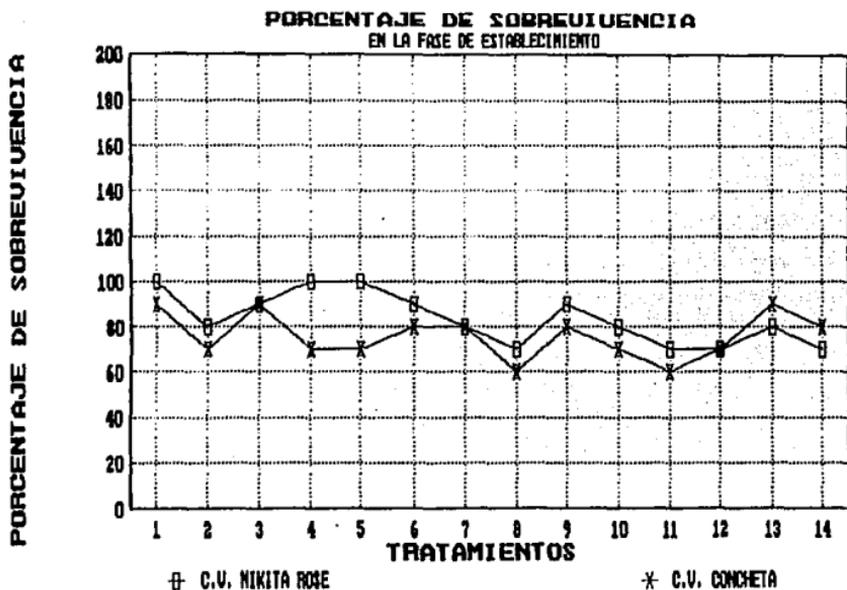


FIGURA No 4



5.2. - MEDIO DE CULTIVO

En el presente trabajo se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos. En brotes el mejor fue el tratamiento 6 de la variedad Concheta en medio de MS al 50 % de sales minerales con 11 brotes y en la longitud fue el tratamiento 10 de la variedad Nikita rose con 2.57 cm en promedio que se estableció en MS al 100 % de sales minerales. En el cuadro No 8 se puede observar la respuesta del explanto en las diferentes

concentraciones del medio en número de brotes y longitud del mismo estableciendo la diferencia en las concentraciones del medio al 50 % con mayor número de brotes, pero menor longitud del mismo y el MS al 100 % menor número de brotes, pero vigorosos en longitud.

En el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) se encontró una respuesta favorable para en el establecimiento y proliferación del clavel, confirmando que este medio puede ser usado en cultivo de células, tejidos y en la micropropagación de diferentes especies.

Por lo que respecta a su composición en medio MS. (Vasil et al 1976) mencionan que el MS contiene altas concentraciones de nitratos así como potasio y amonio en relación con otros medios. La respuesta positiva de las plantas se debe al incremento en las concentraciones de sales minerales particularmente del nitrógeno, así como de la sacarosa y vitaminas.

En trabajos anteriores se ha investigado la dilución del MS a la mitad de su concentración de sales minerales. (Cruz 1983) no encontró diferencias entre el 100 % y 50 % de sales minerales en manzano. En otros trabajos con el de Alpi y Garibaldi (citados por Mii et al 1990) menciona que principalmente el MS estimula brotes vigorosos de los explantos. En comunicación personal (Cruz 1993) menciona que esto se debe principalmente a las altas concentraciones de nitrógeno, en forma de nitratos y amonio, lo que repercute en la disminución del número de brotes y el aumento de longitud del brote, sin olvidar la interacción de la dosis de los reguladores. (Plancarte y Vieyra 1993) estudiaron el efecto de las concentraciones de dos fuentes de nitrógeno NH_4NO_3 y $CaNO_3$ en

fresa, encontrando diferencias entre las concentraciones de N, el medio utilizado fue el MS al 50 % de sales minerales.

CUADRO No 9 RESPUESTA DEL EXPLANTO A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE REGULADORES, EN NUMERO Y LONGITUD DE LOS BROTES EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO C.V. C=CONCHETA Y N=NIKITA ROSE

TRAT.	AIB mg/lit	BA/K mg/lit	No DE BROTES. PROMEDIO	LONGITUD DE BROTE PROMEDIO (cm)
1 C	0.0	0.0	2.5	0.61
2 C	0.1	0.5 K	2.0	0.67
3 C	0.1	1.0 K	2.0	1.04
4 C	0.1	2.0 K	2.0	0.90
5 C	0.1	0.5 BA	5.0	1.05
6 C	0.1	1.0 BA	11.0	1.19
7 C	0.1	2.0 BA	5.0	0.96
8 C	0.0	0.0	5.0	2.57
9 C	0.1	0.5 K	6.5	1.15
10 C	0.1	1.0 K	4.0	1.06
11 C	0.1	2.0 K	3.0	0.90
12 C	0.1	0.5 BA	2.0	1.20
13 C	0.1	1.0 BA	1.0	0.54
14 C	0.1	2.0 BA	4.0	1.20
1 N	0.0	0.0	3.0	1.38
2 N	0.1	0.5 K	1.0	2.00
3 N	0.1	1.0 K	3.0	1.71
4 N	0.1	2.0 K	4.0	1.64
5 N	0.1	0.5 BA	4.2	1.18
6 N	0.1	1.0 BA	3.6	1.06
7 N	0.1	2.0 BA	2.6	1.13
8 N	0.0	0.0	1.0	1.20
9 N	0.1	0.5 K	5.0	2.13
10 N	0.1	1.0 K	1.0	2.72
11 N	0.1	2.0 K	3.0	1.68
12 N	0.1	0.5 BA	3.0	1.15
13 N	0.1	1.0 BA	6.0	1.13
14 N	0.1	2.0 BA	4.0	1.08

5.3 VARIEDADES

Al realizar el anova del número de brotes y longitud del mismo, se obtuvo alta significancia en cuanto a la respuesta de las variedades de clavel al medio de cultivo y a las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. El promedio general de la variedad Concheta presentó una tasa de proliferación de 3.93 brotes, teniendo su mejor respuesta en el tratamiento 6 con un promedio de 11 brotes, en cuanto a la variedad Nikita rose esta presentó una tasa de proliferación de 3.17 brotes y su mejor tratamiento fue el 13 con 6 brotes en promedio.

En cuanto a la longitud la Nikita rose presentó una mayor elongación del propagulo con 1.51 cm como promedio general en detrimento de la proliferación. La variedad Concheta presentó un promedio de longitud de 1.07 cm en general.

Roest y Bokelman (1981) concluyeron que las diferencias entre las variedades pudo haber sido por las condiciones de cultivo y características propias de la variedad; teniendo un óptimo desarrollo en las variedades Scania-3C y Red Ivette con un 96.6 % y 81.4 % de proliferación, mientras la variedad Jolivette presentó el porcentaje más bajo de proliferación con 62.1 %.

Navarro 1985, utilizó dos variedades de clavel, Scania-3C, Improved W, para obtener plantas libres de virus, en las cuales no encontró diferencias en cuanto el número de brotes o tasa de proliferación.

Radojevic (1990) encontró diferencias entre 7 variedades evaluando, número de brotes por subcultivo, y transferencia de brotes a suelo; concluyendo que las diferentes variedades requieren diferentes condiciones de cultivo.

5.4. RESPUESTA DEL INOCULO A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO

5.4.1. AUXINAS

La acción de las auxinas en el establecimiento y proliferación debe ser en concentraciones bajas para promover a la inducción de brotes. Esto se ratifica en trabajos anteriores en donde la concentración va de un rango de 0.02 mg/Lt de ANA (Jelaska y Sutina 1977, Ioannov 1990) a 1.0 mg /Lt de ANA, (Davis et al 1977, Kim y Kang 1989); en donde predomina el ANA como regulador de crecimiento. Shabdé y Murashige (1977), Roest y Bokelman (1981) son los únicos que han utilizado AIA en concentraciones de 0.3 y 0.1 mg/Lt, por estas razones se utilizó una concentración baja de auxina de 0.1 mg/lit de AIB en todo el experimento.

5.4.1.2. CITOCININAS

La combinación de las citocininas K y BA con el AIB, en la fase de establecimiento, mostró diferentes respuestas sobre las yemas, observándose una mejor respuesta de proliferación cuando se adicionó al medio BA en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/lit en MS al 50 % de sales minerales, mostrando diferencias significativas con la K que tuvo su mejor respuesta en una concentración de 0.5 mg/lit en MS al 100 % de sales minerales.

Las citocininas estimulan la brotación de vástagos adventicios de clavel en un rango de 0.3 mg/Lt de K (Hackett y Andersona 1967) a 10 mg/Lt (Davis et al 1977). La relación auxina/citocinina también varía en un rango de 1:100 (Jelaska y Sutina 1977, Ioannov 1990) a 1:3 (Hackett y Anderson 1967), pero la relación que más se utiliza es de 1:10 (Davis et al 1977, Hempel 1979, Roest y Bokelman 1981 y Kim y Kang 1989), utilizando como explanto a

meristemas y nudos. Esta relación cambia cuando se utiliza otro tipo de explanto a 1:1 Takeda (1978) utiliza hojas; Kakehi (1978) utiliza pétalos con similares reguladores y concentraciones de 1 mg/lt ANA y 1 mg/lt BA.

En cuanto a la longitud del brote se obtuvo una mejor respuesta cuando se adicionó K en concentración de 0.5, 1.0 mg/lt en MS al 100 % de sales minerales, mientras la concentración de 2.0 mg/lt de BA se tuvo su mejor respuesta de longitud. Estos resultados son similares a los de Hempel 1979 que concluye que la BA tiene mejores resultados para la inducción a brotación y con la K se obtienen mejores resultados en el crecimiento y longitud de los brotes.

S.1.5.- NUMERO DE BROTES

Al realizar el anova correspondiente a esta variable se presentaron diferencias altamente significativas (Ver el cuadro No 10), y al realizar las comparaciones de medias (Ver el cuadro No 11) el tratamiento 6 de la variedad Concheta con 0.1 mg/lt de AIB y 1.0 mg/lt de BA mostró ser superior estadísticamente a los demás tratamientos con un promedio de 11 brotes, siguiéndole los tratamientos 9 de la variedad Concheta con 6.5 brotes promedio; tratamiento 13 de la variedad Nikita rose con 6 brotes y los tratamientos 5, 7 y 8, de la variedad Concheta todos ellos con 5 brotes siendo estadísticamente iguales. Los brotes promedios de los tratamientos por variedad se pueden observar en la figura No 4

Estos resultados son superiores a los obtenidos por Pennazio en 1975 quien obtuvo 5.5 brotes con 0.1 mg/lt ANA y 1.0 mg/lt K;

Kozak y Hempel en 1979 que obtuvieron 6.6 brotes con 0.1 mg/lit ANA y 1.0 mg/lit BA; y Kim y Kang en 1989 que obtuvieron 7.8 brotes con 0.1 mg/lit de ANA y 1.0 mg/lit BA.

Siendo similares a Jelaska y Sutina 1977 que obtuvieron 10.5 brotes usando 0.02 mg/lit ANA y 2.0 mg/lit K; y Roest y Bokelman 1981 que obtuvieron 10.6 brotes usando 0.1 mg/lit AIA y 1.0 mg/lit de BA.

Earle y Langhans 1975, Davis et al 1977 y Ioannov 1990 obtuvieron mejores resultados 59, 28 y 33, brotes respectivamente pero utilizan matraces con mayor cantidad de medio de 30 a 50 ml. Ioannov utiliza las mismas cantidades de Jelaska y Sutina 1977; Davis et al 1977 utiliza 1.0 mg/lit ANA y 10 mg/lit BA; y Earle y Langhans utilizan 0.1 mg/lit ANA y 0.5 mg/lit de K.

Al analizar los resultados se puede observar que las concentraciones de auxinas para el establecimiento y proliferación debe ser baja en concentración de 0.1 mg/lit y de 1.0 mg/lit de citocininas. El AIB resultó ser apto en la concentración determinada, para la inducción a brotación. La BA también resultó ser apta en su concentración para el establecimiento y proliferación confirmando los resultados obtenidos por Hempel 1979 y Roest y Bokelman 1981.

5.1.6.- LONGITUD DEL BROTE

El análisis de varianza para la variable mostró diferencias estadísticas altamente significativas en los tratamientos (Ver cuadro No 12), al realizar las comparaciones de medias (Ver cuadro No 13) los tratamientos 10, 9, 2, de la variedad Nikita rose y el tratamiento 8 de la variedad Concheta son estadísticamente iguales con 2.72, 2.13, 2 y 2.57 respectivamente.

CUADRO No 10 ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE BROTES DE LOS C.V. CONCHETA Y NIKITA ROSE

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
BLOQUES	9	147.20	16.36	6.52	3.18*
TRAT.	I	37.30	37.30	14.86	5.35**
ERROR A	9	22.62	2.51		4.67**
SUBTOTAL	19	207.02			9.07**
SUBTRAT	13	358.08	27.54	11.67	1.67**
T X S	13	362.46	27.88	11.81	2.04**
ERROR B	234	551.63	2.36		
TOTAL	279	1479.19			

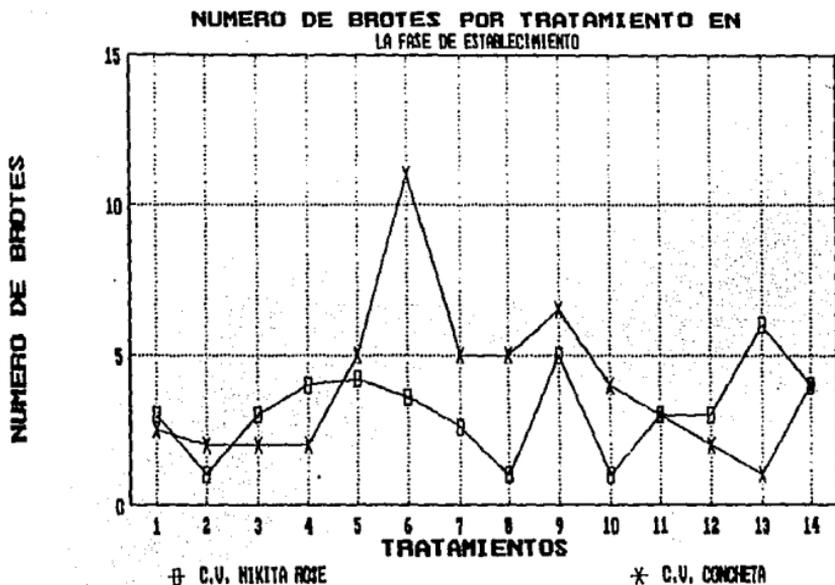
$\alpha = 0.05$

CUADRO No 11 COMPARACION DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY EN NUMERO DE BROTES DE LOS C.V. C= CONCHETA Y N= NIKITA ROSE

Trat 6 C = 11	a	Trat 12 N = 3.0	c
Trat 9 C = 6.5	b	Trat 7 N = 2.6	c
Trat 13 N = 6.0	b	Trat 1 C = 2.5	d
Trat 5 C = 5.0	b	Trat 3 C = 2.1	d
Trat 7 C = 5.0	b	Trat 2 C = 2.0	d
Trat 8 C = 5.0	b	Trat 4 C = 2.0	d
Trat 9 N = 5.0	b	Trat 12 C = 2.0	d
Trat 5 N = 4.2	c	Trat 13 C = 1.0	d
Trat 4 N = 4.0	c	Trat 2 C = 1.0	d
Trat 14 N = 4.0	c	Trat 8 N = 1.0	d
Trat 10 C = 4.0	c	Trat 10 N = 1.0	d
Trat 14 C = 4.0	c		
Trat 6 N = 3.6	c		
Trat 11 C = 3.0	c		
Trat 1 N = 3.0	c		
Trat 11 N = 3.0	c		

$\alpha = 4.74 \sqrt{\frac{2.86}{10(2)}} = 1.69$

FIGURA No 8

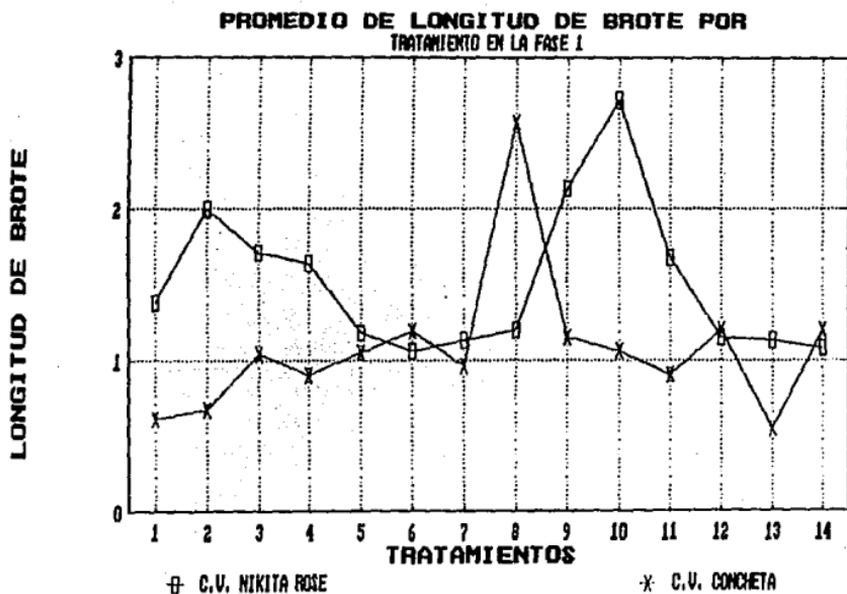


En los tratamientos 10 y 2 de la variedad Nikita rose sólo se obtuvo el desarrollo de un brote, esto puede explicar por qué el brote obtuvo mayor elongación. En cuanto a los tratamientos 9 de la variedad Nikita rose y 8 de la variedad Concheta se obtuvieron 5 brotes siendo éstos vigorosos.

Al realizar el análisis de regresión y correlación se obtuvo que existe una correlación altamente positiva (Ver cuadro 14) entre el número de brotes y la longitud del brote, por lo tanto al tener una tasa de proliferación alta, la longitud del brote es

menor y por lo contrario al tener brotes con mayor longitud, la tasa de proliferación disminuye. La mayor elongación de los brotes se registró cuando el medio se le adiciono kinetina en concentraciones de 0.5, 1.0 mg/lit. En la figura No 5 se observan los promedios de longitud del brote, por tratamiento

FIGURA No 5



CUADRO No 12 ANALISIS DE VARIANZA DE LONGITUD DEL BROTE
DE LOS C. V. CONCHETA Y NIKITA ROSE

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
BLOQUES	9	1.75	0.19	0.90	3.18**
TRAT.	1	22.46	22.46	106.95	5.35**
ERROR A	9	1.89	0.21		4.67**
SUBTOTAL	19	26.10			9.07**
SUBTRAT	13	20.74	1.60	2.08	1.67**
T X S	13	31.11	2.39	3.10	2.04**
ERROR B	234	180.43	0.77		
TOTAL	279	258.38			

$\alpha=0.05$

CUADRO No 18 COMPARACION DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY DE
LONGITUD DE BROTES DE LOS C. V. C=CONCHETA Y N=NIKITA ROSE

Trat 10 N = 2.57 a	Trat 14 N = 1.08 b
Trat 8 C = 2.57 a	Trat 6 N = 1.06 b
Trat 9 N = 2.13 a	Trat 10 C = 1.06 b
Trat 2 N = 2.0 a	Trat 5 C = 1.05 b
Trat 3 N = 1.71 b	Trat 3 C = 1.04 b
Trat 11 N = 1.68 b	Trat 7 C = 0.96 b
Trat 4 N = 1.64 b	Trat 4 C = 0.90 b
Trat 1 N = 1.38 b	Trat 11 C = 0.90 b
Trat 8 N = 1.20 b	Trat 2 C = 0.67 c
Trat 14 C = 1.20 b	Trat 1 C = 0.61 c
Trat 12 C = 1.20 b	Trat 13 C = 0.54 c
Trat 6 C = 1.19 b	
Trat 5 N = 1.18 b	
Trat 9 C = 1.15 b	
Trat 12 N = 1.15 b	
Trat 7 N = 1.13 b	
Trat 13 N = 1.13 b	

$$\alpha=4.74 \sqrt{\frac{0.77}{(10)2}} = 0.99$$

CUADRO No 14 ANALISIS DE REGRESION Y CORRELACION ENTRE NUMERO BROTES Y LONGITUD DE BROTE

FV	GL	ANOVA			
		SC	CM	Fc	Ft
REGRESION	1	2.50	2.506	12.01	4.23**
ERROR	26	5.07	0.194	0.194	7.72**
TOTAL	27	7.57			

$$r_c = 0.58$$

$$\alpha = 0.05 = 0.874$$

5.2. - PROLIFERACION

5.2.1. - SUBCULTIVO

En la primera parte del experimento la variedad Concheta obtuvo una tasa de proliferación general de 3.93 brotes y la variedad Nikita rose una tasa de proliferación de 3.17 brotes. Al realizar el primer subcultivo del medio de proliferación con las siguientes concentraciones 0.1 mg/lit de AIB y 1.0 mg/lit BA en MS al 50 % de sales minerales, la variedad Concheta aumentó su tasa de proliferación a 10.8 brotes y la variedad Nikita rose a 10.3 brotes; por lo cual las dos variedades muestran una tendencia a incrementar su tasa de proliferación.

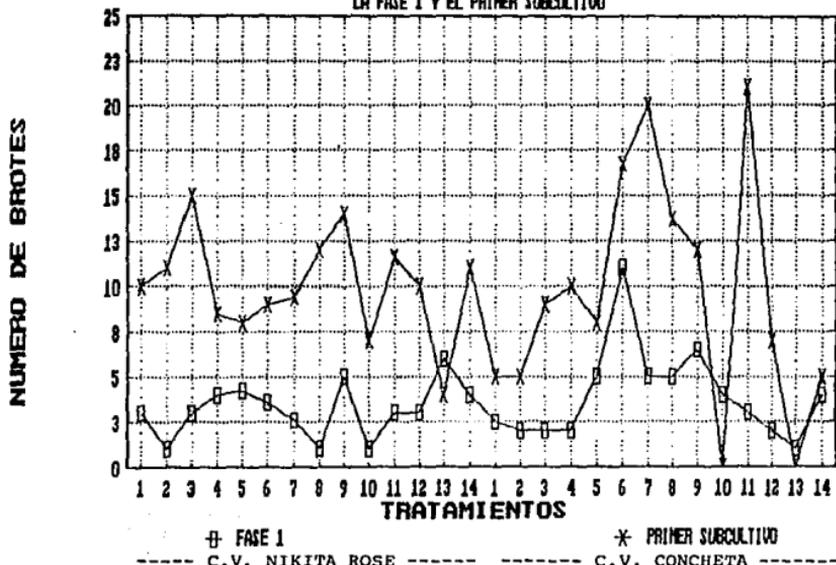
Esta tendencia a incrementar la tasa de proliferación en los subcultivos se debe a que la planta o explanto permanece en periodos prolongados en contacto con el medio, con lo cual desarrolla mecanismos de adaptación que le permite tener una mejor

respuesta a las condiciones *in vitro*, permitiéndole tener una mejor respuesta en la proliferación.

Los resultados por tratamiento mostraron diferencias a la fase anterior, el tratamiento 6 de la variedad Concheta ahora fue el tercero con un número de brotes de 15.8, mientras los tratamientos 11 y 7 de la misma variedad tuvieron 20.7 y 19.8 brotes respectivamente. El mejor tratamiento de la variedad Nikita rose fue el tratamiento 3 con 15.2 brotes; estos resultados se pueden observar en la figura No 6.

FIGURA No 7

COMPARACION DEL NUMERO DE BROTE EN LA FASE I Y EL PRIMER SUBCULTIVO



5.3. - ENRAIZAMIENTO

5.3.1. - DIAS A EMISION DE RAIZ

En esta variable podemos observar los siguientes resultados :

Tratamiento 1	12 días	Tratamiento 4	9 días
Tratamiento 2	9 días	Tratamiento 5	14 días
Tratamiento 3	9 días		

Los tratamientos 2, 3 y 4, tradaron 9 días en la emisión de raíz y de 12 a 14 días en tener un sistema radicular. Earle y Langhans 1975 mencionan que el enraizamiento ocurra los 2 semanas, otros investigadores como Hackett y Anderson 1967, Kyle 1987, Navarro 1987 utilizaron el medio del MS al 50 % de sales minerales y sin reguladores para inducir a la formación de raíces. Petru y Landa 1974 utilizan el medio de Morel con una concentración de ANA 0.4 mg/lt. En el experimento de enraizamiento también se utilizó el MS al 50 % de sales minerales con diferentes concentraciones de AIB y BA.

5.3.2. PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO

Al realizar el análisis de varianza se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas. (Ver el cuadro No 15) en la comparacion de medias (Ver cuadro No 16) los tratamientos 2 y 3 son superiores a los restantes y estadísticamente iguales con 70 % de enraizamiento, que presentan las siguientes concentraciones tratamiento 2 (0.3 mg/lt AIB) y tratamiento 3 con (0.5 mg/lt AIB). El tratamiento 1 sin reguladores presento un 55 % enraizamiento. La adición al medio de enraizamiento de BA resultó ser negativo en la concentración de 0.1 mg/lt debido a que los tratamientos 4 y 5 presentan 30 y 20 % de enraizamiento.

CUADRO No 15 ANALISIS DE VARIANZA DE PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO DEL C. V. CONCHETA

FV	GL	ANOVA			
		SC	CM	Fc	Ft
TRAT	4	35.19	8.80	4.47	2.45M
ERROR	95	186.75	1.97		3.48MM
TOTAL	99	221.94			

$\alpha = 0.05$

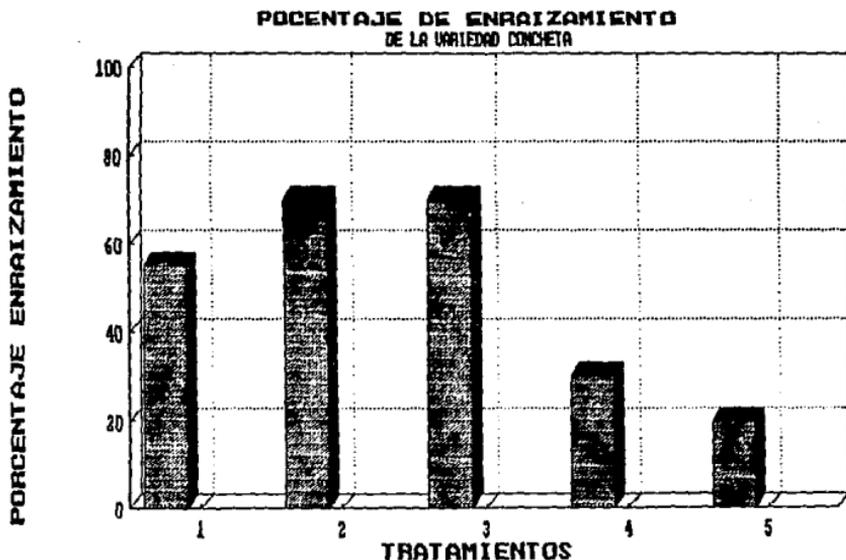
CUADRO No 16 COMPARACION DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY PORCENTAJES DE ENRAIZAMIENTO DEL C. V. CONCHETA

TRATAMIENTO 2	=	82	a
TRATAMIENTO 3	=	83	a
TRATAMIENTO 1	=	73	b
TRATAMIENTO 4	=	58	c
TRATAMIENTO 5	=	52	d

$$\alpha = 9.92 \sqrt{\frac{1.97}{20}} = 1.57$$

Pennazio 1975 obtuvo un 89.2 % de enraizamiento con MS al 50 % de su concentración de sales con 0.1 mg/lit de ANA. El tratamiento seleccionado para el enraizamiento fue el 2 debido a que el brote desarrollaba en longitud y raíz, lo que no ocurre en el tratamiento 3 en donde el brote enraiza pero no desarrolla longitud. En la figura No 7 se pueden observar los porcentajes de enraizamiento del experimento.

FIGURA No 8



Un problema para la micropropagación del clavel es la vitrificación; Earle y Langhans 1975 obtuvieron brotes con hojas anormales que se vuelven cafes y no enraizan. Davis et al 1977 reporta hojas anchas y gruesas producidas en medio liquido, cuando se le adiciona al medio adenina y caseina hidrolizada. En el experiemnto se obtuvieron brotes con hojas gruesas y anchas con apariencia translúcida, de forma arrosetada, que muy pocas veces desarrollaban en longitud, principalmente de la variedad Nikita rose en la presencia de 2.0 mg/lit de BA, presentandose por lo menos en un tubo de los tratamientos problemas de vitrificación, en la variedad Concheta principalmente en la concentración de 2,0 mg/lit de K.

VI. - CONCLUSIONES

1.- El método de propagación de segmentos nodales resultó ser factible para la obtención de plantas de clavel bajo condiciones in vitro.

2.- El método de desinfección resultó ser efectivo al obtener un 79.29 % de cultivo aséptico y los índices de contaminación pueden ser atribuidos a las hojas que envuelven a la yema en el nudo, lo que no permite tener una desinfección más eficiente.

3.- El uso de del medio de cultivo al 50 % de sales minerales, favoreció en una mejor respuesta en la inducción de brotes en las 2 variedades de clavel.

4.- La variedad Concheta resultó tener mejor respuesta bajo las condiciones in vitro , esto se demuestra en sus altos índices de proliferación, y la variedad Nikita rose obtuvo mejores resultados en la longitud del brote, por lo tanto cada variedad requiere de condiciones diferentes de cultivo. ,

5.- Al emplear bencilaminopurina se obtiene una mejor respuesta a la inducción de brotación, mientras el uso de la kinetina se recomienda para obtener un mejor crecimiento de brote.

6.- El ácido indolbutírico resultó ser eficiente en la concentración de 0.1 mg/lit e inducir a la proliferación de brotes de clavel.

7.- Con la combinación de AIB 0.1 mg/lit y de BA 1.0 mg/lit se obtiene el más alto índice de proliferación en la fase de establecimiento con 11 brotes en promedio en la variedad Concheta, utilizando el MS al 50 % de sales minerales.

8.- La combinación de AIB 0.1 mg/lt y K 0.5, 1.0 mg/lt se tiene la mayor elongación de los brotes en la variedad Nikita rose, utilizando el MS al 100 % de sales minerales.

9.- El realizar los subcultivos resulta ser satisfactorio, ya que aumenta notablemente el número de brotes por tubo, siendo mayor la repuesta de la variedad Concheta. Por lo que se puede obtener un gran número de plantas y calcular el mismo en un tiempo determinado.

10.- El adicionar al MS al 50 % de sales minerales 0.3 mg/lt de AIB permite emitir raíces a los 9 días y plantas terminadas a los 12 a 14 días, con una buena calidad del brotes en aspecto físico y elongación del mismo.

11.- Mediante la técnica de la micropropagación se puede obtener plantas libres de patógenos y de la calidad suficiente, que permitiría a los floricultores resolver en parte el problema de la importación de material vegetal.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aquino M.J. 1987, Incidencia de la dormilona, la roya y el tizón foliar en 5 variedades de clavel en el municipio de Villa Guerrero, Edo de Méx. Tesis profesional, FESC-UNAM, Cuautitlán, Edo de México.
- 2.- Arango T.J 1986, Efecto del pretratamiento con tiosulfato de plata en botones de clavel white sim almacenados en refrigeración. Tesis profesional, FESC-UNAM, Cuautitlán, Edo de México.
- 3.- Arellano O.G y Gonzalez B.S.1985, El efecto del recipiente, intensidad de luz y microambiente en el establecimiento a suelo de fragaria x anassa Duch y prunus cerasifera obtenidas in vitro. Tesis profesional, FESC-UNAM, Cuautitlán, Edo de México.
- 4.- Besemer S.T.1988, Los clavales. En Introducción a la floricultura (Ed. Larson R.A) pp 47- 49, Edt. AGT México.
- 5.- Cruz P.F. 1983, Propagación in vitro de manzana (malus plumilla Mill). Tesis profesional, FESC-UNAM, Cuautitlan, Edo de México.
- 6.- Dabski M; Malinowska B and Hempel 1979, Studies in vitro of carnations IV the multiplication and rooting of shoots. Acta Horticulturæ (81) 339-343.
- 7.- Davis M.J; Baker R and Hanan J.J. 1977, Clonal multiplication of carnation by micropropagation. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 102 (1) 48-53.
- 8.- Debergh P.C. and Read P.E., 1991, Micropropagation En Micropropagation technology and application (Ed Zimmerman R.H. and Debergh P.C.) pp 1-14 Edt. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 9.- Duran G.J. 1993, Cultivo in vitro de cordyline terminalis a partir de segmentos nodales. Tesis profesional, FESC-UNAM, Cuautitlan, Edo de México.

10. - Earle E.P. and Langhans R.W. 1975, Carnation propagation from shoots tips cultured in liquid medium. Hortscience 10: 608-610.
11. - Gamborg O.L.; Murashige T.; Thorpe T.H. and Vasil y K. 1976, Plant tissue culture media. In vitro, 12:473-478.
12. - Guerrero I. 1987, El cultivo rentable de las flores. Edt Vecchi, España.
13. - Hackett W. P. and Anderson A.J., 1967, Aseptic multiplication and maintenance of diferantiated carnation shoot tissue derived from shoot apices. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 90:365-369.
14. - Hartmann T.H. and Kester E.D., 1988, Propagación de plantas, Principios y prácticas. Edt. Continental. Méx. D.F.
15. - Hempel M., 1979, Studies on in vitro of carnations I the influence of some cytokinins on the differentiation of shoot apices. Acta Horticulturae 91:317-320.
16. - Guerreros D.L.M., 1978; Multiplicación de clavel para flor cortada, Ministerio de Agricultura, España.
17. - Hurtado M.D, 1987, Obtención de plantas obtenidas in vitro en condiciones naturales. En Cultivo de Tejidos (Ed Hurtado M.D. y Merino M.M.) pp 67-87, Edit. Trillas, Méx.
18. - Ioannov M., 1990, Production of carnation plants by shoot tip culture in vitro. Bulletin Technical, Int. Res. Agri. Cyprus. No. 1178.
19. - Jelaska S, and Sutina R. 1977, Maintaned culture of multiple plantlets from carnation shoot tips. Acta Horticulturae. 78: 333-340.
20. - Kim K.W. and Kang M.S. 1989, Studies on the clonal multiplication of carnation by cuttings in vitro. Dep. Hort. Yeungman Univ. Korea Republic. 632-636.
21. - Kozark D. and Hempel M, 1979, Studies on in vitro of carnations III The optimalization of multiplantlets formation. Acta Horticulturae. 91: 333-337.

22. - Kyle L.; 1987, Plants from test tubes and introduction to microporpagation, Edit Timber Press, Portland USA.
23. - Little M.T. y Jackson H.F., 1984, Métodos estadísticos para investigación en la agricultura, Edit. Limusa, Méx. D.F.
24. - López P.C. 1990, Medios de cultivo. En fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales (Ed. Rosell C.H. y Villalobos V.M.), pp 15-20, Edit FAO UNESCO Roma.
25. - Margara J. 1988, Multiplicación vegetativa y Cultivo in vitro, Edt. Mundi-prensa, Madrid, España.
26. - Merino M.M. 1987, Técnicas de esterilización y manipilación aseptica. En Cultivo de tejidos (Ed Hurtado M.D. y Merino M.M.) pp 44-47, Edit. Trillas, Méx.
27. - Merino M.M. 1987, Medio de cultivo. En Cultivo de tejidos (Ed Hurtado M.D. y Merino M.M.) pp 67-87. Edit. Trillas. Méx.
28. -Mii M.; Buiatti M. and Gimelli F. 1990, Carnation, En Hand book of plant cell culture, Volume 5 Ornamental (Ed Ammirato P.V.; Evans W.H., Sharp W.R, and Bajaj P.S.) pp 285-318. Edit. McGraw Hill Publishing USA.
29. - Murashige, T. 1974, Plant propagation through tissue culture, Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-186.
30. - Navarro U.S. y Vera E.R. 1987, Historia del cultivo de tejidos vegetales. En Cultivo de tejidos, (Ed Hurtado M.D y Merino M.M.) pp 15-34, Edit. Trillas, Méx.
31. - Navarro U.S. 1987, Cultivo de meristemos. En Cultivo de tejidos (Ed Hurtado M.D. y Merino M.M.) pp 133-148, Edit. Trillas, Méx.
32. - Navarro U.S. 1985, Obtención y multiplicación masiva del clavel libre de virus a partir de cultivo in vitro de meristemos aplicados de tallo, Tesis profesional, UNAM Fac. de Ciencias, Méx.
33. - Ochoa F.L. 1983, Efecto del AIB, ANA y carbón activado sobre el enraizamiento de fresa in vitro. Tesis profesional, FESC-UNAM. Cuautitlán, Edo de Méx.

- 34.- Pennazio S. 1975, Effects de adenine and kinetina in development of carnation meristem tips cultured in vitro. *J. Hort. Sci.* 50:161-164.
- 35.- Pierik R.L.M. 1990, Cultivo in vitro de las plantas superiores. Edit. Mundi-prensa, Madrid, España.
- 36.- Plancarte M.M. y Vieyra R. J. 1993, Efecto de la concentración de dos diferentes fuentes de N (CNH_4NO_3 y CaNO_3) en la proliferación de fresa var. Fern. in vitro. Proyecto de investigación. FESC-UNAM, Edo de Méx.
- 37.- Radojevic L and Djordjevic N and Petrovic J, 1990, In vitro culture techniques for carnation breeding. *Acta Horticulturæ.* 280: 163-168.
- 38.- Roest S. and Bokelman G.S. 1981, Vegetative propagation of carnation in vitro through multiple shoot development. *Scientia Horticulturæ*, 14: 357-366.
- 39.- Sanchez S.O. 1984, La flora del Valle de México. Edit. Herreros, Méx.
- 40.- SARH, 1992, Sistemas-productos flores. Dirección Gral. de Política Agrícola, Subsecretaria de Agricultura.
- 41.- Shabdé M and Murashige T. 1977, Hormonal requeriments of excised dianthus caryophyllus, L shoot apical meristem in vitro. *Amer. J. Bot.* 64(4) 443-448.
- 42.- Villalobos A.V.M. 1979, Obtención de plantas (dianthus caryophyllus, L) libres de virus por cultivo in vitro de meristemas y ápices vegetativos. Tesis de maestría UACH, Chapingo, Méx.
- 43.- Villegas M.A. 1989, Método asepticos. En Fundamentos teorico-practicos del cultivo de tejidos vegetales. (Ed Rosell C.H. y Villalobos A.V.M.) pp 15-20, Edit FAO-Unesco, Roma.
- 44.- Ziv M. 1991, Vitrification: morfological and physiological disorders of in vitro. En Micropropagation technology and application. (Ed Zimmerman R.H. y Debergh P.C.) pp 45-70 Edit. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.