

46
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



"EVALUACION DEL EFECTO DE ANA Y K
A DIFERENTES DOSIS EN LA PROLIFERACION DE
BROTOS DE *Lilium longiflorum* IN VITRO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA AGRICOLA
P R E S E N T A :
MARGARITA / PLANCARTE MARGARITO

ASESOR: ING. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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
P. A. M.
UNIDAD DE ESTUDIOS
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:

"Evaluación del efecto de ANA y K a diferentes dosis en la proliferación de brotes de *Lilium longiflorum in vitro*".

" "

que presenta la pasante: Margarita Plancarte Margarito
con número de cuenta: 8540592-5 para obtener el TITULO de:
Ingeniera 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 17 de junio de 1994

PRESIDENTE Ing. Hilda Carina Gómez Villar *Hilda Carina Gómez Villar*
VOCAL Biol. Elva Martínez Holguín *Elva Martínez Holguín*
SECRETARIO Ing. Francisco Cruz Pizarro *Francisco Cruz Pizarro*
PRIMER SUPLENTE Ing. Abel Rodríguez Bueno *Abel Rodríguez Bueno*
SEGUNDO SUPLENTE Ing. Adolfo Ochoa Ibarra *Adolfo Ochoa Ibarra*

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Hilda Carina Gómez Villar, por sus observaciones realizadas en el mejora del presente trabajo.

A la Biol. Elva Martínez Holguín, por sus observaciones realizadas en mejora del presente trabajo.

Al Ing. Francisco Cruz Pizarro, por sus enseñanzas y tiempo dedicado para la realización del presente trabajo.

Al Ing. Abel Rodríguez Bueno por sus observaciones realizadas en mejora del presente trabajo.

Al Ing. Adolfo Ochoa Ibarra, por sus observaciones realizadas en mejora del presente trabajo.

A la UNAM por permitirme ser parte de su comunidad universitaria.

DEDICATORIAS

A mis Padres :

Alicia Margarito A. y Efrain Plancarte C.

Que gracias a su gran apoyo he podido lograr
una de mis metas.

A mi hermana :

Olga

La exhorto a seguir adelante, aunque el
camino sea difícil.

A mi Abuelita +

Por ser un gran ejemplo para mí.

A Jesús : Por impulsarme cada día a ser mejor

A la Fam. Plancarte Cervantes :

Por el gran apoyo que me han brindado.

A mis amigos: Ethel, Reyna, Ma. Elena, Guadalupe, Laura, Grisel,
Lim, Bety, José Luis, Ricardo, Raúl, Arturo,
Alejandro, José Gpe, Benjamín, Inés y Mario.

Aunque la distancia y el tiempo nos separe siempre
los recordare por los momentos que pasamos juntos.

A todas las personas que de alguna manera me han impulsado a
lograr esta meta.

CONTENIDO

Resumen	I
Indice de cuadros	II
Indice de figuras	III
I.- Introducción	1
II.- Objetivos	2
III.- Revisión bibliográfica	3
3.- Generalidades de la especie	3
3.1.- Origen	3
3.2.- Descripción botánica	4
3.3.- Taxonomía	4
3.4.- Morfología de un bulbo	6
3.4.1.- Definición	6
3.4.2.- Tipos de bulbos	6
3.4.3.- Partes del bulbo	7
3.4.4.- Desarrollo de un bulbo	7
3.5.- Propagación de liliium	10
3.5.1.- Propagación sexual	10
3.5.2.- Propagación asexual	10
3.5.2.1.- Método de los bulbillos	10
3.5.2.2.- Escamado	11
3.5.2.3.- Micropropagación	12
3.6.- Micropropagación	13
3.6.1.- Definición	13
3.6.2.- Antecedentes	13
3.6.3.- Fases	15
3.6.3.1.- Fase 0	15
3.6.3.2.- Fase 1	16
3.6.3.2.1.- Esterilización	16
3.6.3.2.2.- Selección del inoculo	18
3.6.3.3.- Fase 2	19
3.6.3.4.- Fase 3	20
3.6.3.5.- Fase 4	21
3.6.4.- Medio de cultivo	24
3.6.4.1.- Sales inorgánicas	24
3.6.4.1.1.- Macroelementos	24
3.6.4.1.2.- Microelementos	25

3.6.4.2.- Vitaminas	27
3.6.4.3.- Aminoácidos	27
3.6.4.4.- Antioxidantes	27
3.6.4.5.- Agentes gelificantes	28
3.6.4.6.- Azúcar	28
3.6.4.7.- Agua	28
3.6.4.8.- Reguladores de crecimiento	29
3.6.4.8.1.- Auxinas	29
3.6.4.8.2.- Citocininas	30
3.6.4.8.3.- Giberelinas	30
3.6.4.8.4.- Otros reguladores	30
IV.- Materiales y Métodos	33
4.1.- Localización	33
4.2.- Establecimiento	33
4.2.1.- Obtención del material vegetal	33
4.2.2.- Características de la variedad	33
4.2.3.- Desinfección del material vegetal	33
4.2.4.- Siembra	34
4.3.- Condiciones de incubación	35
4.4.- Medio de cultivo	35
4.5.- Fechas de siembra	36
4.6.- Diseño experimental	36
4.7.- Toma de datos	36
V.- Resultados y Discusión	38
5.1.- Establecimiento	38
5.1.1.- Contaminación	38
5.1.2.- Desarrollo de bulbos	38
5.1.3.- Longitud de brote	40
5.1.4.- Respuesta del explanto a los reguladores de crecimiento.	43
5.1.4.1.- Auxinas	43
5.1.4.2.- Citocininas	43
5.2.- Proliferación	45
5.2.1.- Desarrollo de bulbos	45
5.2.2.- Longitud de brotes	47
5.3.- Observaciones indirectas que no se cuantificaron	48
5.3.1.- Emisión de raíz	48
5.3.2.- Calidad del bulbo	48

VI. - Conclusiones

49

VII. - Bibliografía

50

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micropropagación del Departamento de Ciencias Agrícolas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en el cual se plantea valorar el efecto de ANA (Ácido naftalenácético) y K (Kinetina) a diferentes dosis en la proliferación de brotes de *Lilium* considerando el número de brotes y su longitud; así como la observación de sus características cualitativas.

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog reportado en 1962, al 50% de la concentración de sus sales minerales, en donde los tratamientos estuvieron determinados por las diferentes dosis de ANA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/Lt) y K (0, 0.1, 0.5 mg/Lt). Utilizándose un diseño completamente al azar. A partir de su establecimiento se hizo una evaluación a los tres meses, teniendo como resultado una respuesta favorable del explanto a los diferentes tratamientos.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con mejor respuesta tuvo 8.46 brotes por explanto, este medio fue utilizado para el primer sub-cultivo teniendo una tasa de proliferación de 1.24 brotes.

La longitud de brotes no tuvo una respuesta satisfactoria, estadísticamente todos fueron iguales por lo tanto esta variable no se cuantificó en la fase de proliferación.

La emisión de raíces se observó en todos los tratamientos por lo que no se hace necesario el establecer una fase de enraizamiento.

INDICE DE CUADROS

No.	NOMBRE	Pág.
1	Taxonomía de <i>Lilium longiflorum</i>	6
2	Investigaciones realizadas in vitro en <i>Lilium longiflorum</i> .	14
3	Métodos de esterilización utilizando diferentes agentes esterilizantes.	17
4	Reguladores de crecimiento utilizados en <i>Lilium</i>	31
5	Medio de cultivo de Murashige y Skoog 1962	35
6	Diseño experimental	37
7	Análisis de varianza del Número de brotes	39
8	Comparación de medias del Número de brotes	39
9	Análisis de varianza de longitud de brotes	41
10	Comparación de medias en la longitud de	41
11	Respuesta del explanto a los diferentes	44
12	Análisis de varianza del Número de brotes en la fase II.	45

INDICE DE FIGURAS

Fig.	NOMBRE	Pág.
1	Morfología de <i>Lilium longiflorum</i>	5
2	Morfología de un bulbo	8
3	Esquema de la propagación in vitro de <i>Lilium</i> .	34
4	Número de brotes por tratamiento de la var. Fuego en la Fase I.	40
5	Longitud de brotes por tratamientos de la var. Fuego de la Fase I.	42
6	Comparación del Número de brotes en la Fase I y Fase II de la var. Fuego.	46
7	Comparación de longitud de brotes en la Fase I y Fase II de la var. Fuego.	47

INTRODUCCION

La Horticultura Ornamental de especies bulbosas para corte ha adquirido gran importancia en los últimos años. En Holanda la aplicación de la micropropagación a nivel comercial, permitió que en 1988 la producción de bulbos y cormos ornamentales fuera de 12 957 960 plantas de 20 diferentes especies y dentro de estos *Lilium* ocupa el primer lugar con una producción de 12 568 621 de plantas, superada su producción por la Gerbera.

Esta especie se ha propagado únicamente por métodos tradicionales, pero se han tenido problemas fitosanitarios por virus, lo que ha hecho el uso de la técnica de micropropagación teniendo como beneficio plantas libres de virus, y mayor número de plantas en menor tiempo.

En México los productores de especies bulbosas tienen que importar los bulbos para producir está flor de corte que ha ido aumentando su demanda dentro del mercado de flores. Su reciente introducción a nuestro país, el aumento de su demanda y las condiciones climáticas favorables para producirla a cielo abierto, permite que sea una nueva alternativa para los productores.

Las plantas de *Lilium* propagadas por cultivo de tejidos resulta ser el método más rápido, en donde se pueden obtener nuevos clones, especialmente plantas libres de enfermedades.

Este trabajo pretende establecer una metodología para la obtención de plantas de *Lilium* bajo el esquema de diferentes concentraciones de ANA y K para su establecimiento y proliferación.

OBJETIVOS

- 1.- Lograr el establecimiento in vitro de *Lilium longiflorum*.
- 2.- Evaluar el efecto de ANA y K a diferentes dosis en la proliferación de brotes de *Lilium longiflorum*, considerando el desarrollo de bulbos y su longitud.
- 3.- Observar la emisión de raíces.

3.- GENERALIDADES DE LA ESPECIE

3.1.- ORIGEN

La palabra *Lilium* se deriva de la palabra céltica *Li*, que significa blancura sin duda esto se refiere al lirio blanco (*Lilium candidum*). Sin embargo la especie *Lilium longiflorum* se ha vuelto la más valiosa del género *Lilium* (Wilkins 1988).

Los lirios blancos son nativos de Japón y su centro de origen son las islas que se encuentran al sur : Amami, Erabu, y Okinawa . El lirio blanco fue encontrado bajo condiciones de cultivo en China y Formosa por los primeros exploradores occidentales (Wilson 1952 mencionado por Wilkins 1988).

Su nombre japonés Riukie-yuri es mencionado en uno de los libros más antiguos sobre jardinería del Japón publicado en 1621. Además ha sido utilizada en ceremonias religiosas durante más de 2000 años.(Wilkins 1988).

El *Lilium* fue introducido a Inglaterra en 1819 y casi inmediatamente se volvió una de las plantas más cultivadas en la floricultura de especies bulbosas a nivel comercial, además es reconocida como la "flor de pascua".(Wilkins 1988).

Las mayores áreas de producción para flor de corte y bulbos son Holanda, Japón y Estados Unidos.

En Japón y Estados Unidos el cultivar más popular es *Lilium longiflorum* para flor de corte y para la producción de bulbos. En Holanda los cultivares de preferencia son los híbridos asiáticos para flor de corte, además que es el país que ha realizado mayor investigación en especies ornamentales. (Wilkins 1988, Aartijk van 1990).

3.2. -DESCRIPCION BOTANICA

Es una planta herbácea y vivaz de climas templados y subtropicales. Su raíz pequeña y fibrosa que se origina de un tallo subterráneo que es un bulbo escamoso, tiene también un tallo aéreo que sostiene a las hojas y a las flores (Weier 1980).

Las hojas son sésiles de bordes enteros, alternas, lanceoladas, paralelinervias y encorvadas. (Ruiz 1979).

Las flores tienen un perianto regular que tiene seis partes, normalmente separadas, sin embargo, si están unidas tienen lobulos y la corola y el cáliz una de otra. Tienen seis estambres con anteras introrsas y un pistilo. El ovario es superior sencillo y trilocular que posee tres estigmas. (Weier 1980).

El fruto es una cápsula dehiscente que contiene numerosas semillas con endospermo celulósico que por lo mismo son duras (Ruiz 1979). Fig. No. 1

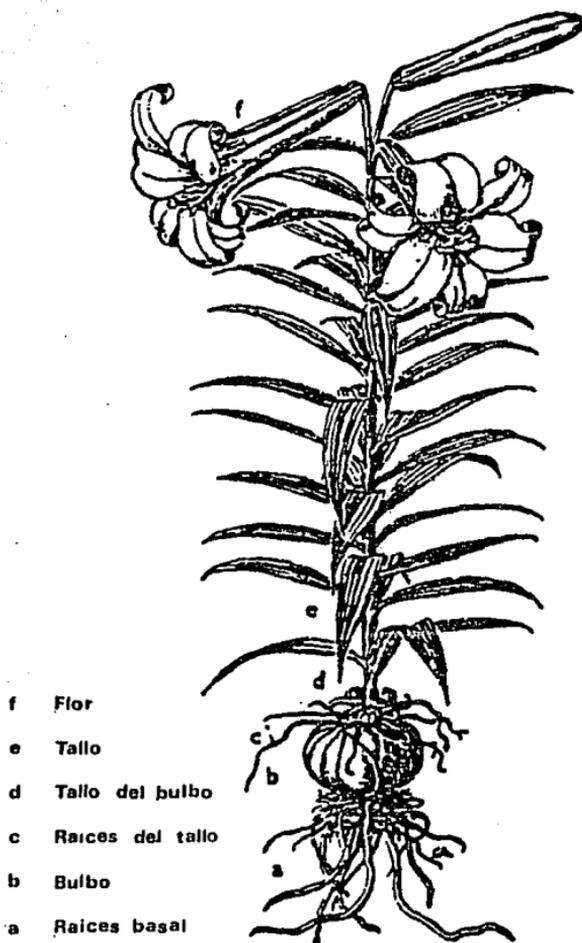
3.3. - TAXONOMIA

La especie *Lilium* pertenece a la familia liliaceae a la que pertenecen unos 3000 géneros y más de 4000 especies. Cuadro No. 1

Su distribución es amplia, pero es especialmente en las regiones tropicales y templadas calidas que no tienen un bosque muy espeso. (Cronquist 1977, Aartrijk van 1990).

Se encuentra distribuida desde los rangos de Siberia central (68° N; L. martagon); del meridiano India (11° N; L. neilgherrense) y para kamchatka (158°E) y al oeste de las costas de américa (130°W). (Aartrijk van 1990).

FIGURA No 1 MORFOLOGIA DE LILIUM LONGIFLORUM.



CUADRO NO. 1 TAXONOMIA DE LILIUM LONGIFLORUM

REINO	VEGETAL
DIVISION	EMBRYOPHYTA
SUBDIVISION	ANGIOSPERMAE
CLASE	MONOCOTYLEDONEAE
ORDEN	LILIIFLORAE
FAMILIA	LILIACEAE
GENERO	LILIUM
ESPECIE	LONGIFLORUM THUND

FUENTE: SANCHEZ 1984

3.4. - MORFOLOGIA DE UN BULBO

3.4.1.- DEFINICION

Los bulbos son producidos por plantas monocotiledoneas en las cuales la estructura usual de la planta se modifica para almacenamiento y reproducción. Un bulbo es un órgano subterráneo especializado que consiste en un tallo axial, corto, carnoso, generalmente vertical, que lleva en su apice una meristema o primordio floral y que está recubierto por escamas gruesas y carnosas. (Hartmann 1975).

4.4.2.- TIPOS DE BULBOS

Hay dos tipos de bulbos; los tunicados que tienen escamas exteriores secas y membranosas, esta cubierta protege al bulbo contra lesiones mecánicas y la desecación. Los no tunicados o escamosos; no poseen una cubierta seca que los envuelva, las capas del bulbo estan separadas y es lo que les da un aspecto escamos. (Hartmann 1975).

Deacuerdo a esta clasificación, *Lilium longiflorum* tiene un bulbo no tunicado o escamoso.

3.4.3.- PARTES DEL BULBO

El bulbo está compuesto de escamas, una placa basal un meristemo apical y raíces. Las escamas son hojas modificadas que funcionan como órganos de almacenamiento. Están presentes dos grupos de escamas, uno exterior y otro interior. Las escamas exteriores por lo general son escamosas y contienen nutrientes de reserva, mientras que las escamas que se encuentran hacia el centro del bulbo funcionan en menor grado como órganos de almacenamiento y son más semejantes a hojas, además están formadas de un nuevo meristemo activo cerca del viejo tallo de floración.

Todas las escamas están pegadas a la placa basal que es un tallo modificado comprimido.

El meristemo apical está localizado en la placa basal y está rodeado por nuevas escamas hasta que el brote comienza a alargarse.

Las raíces se encuentran en la parte inferior de la placa basal. (Hartmann 1975, 1988). Fig. 2

3.4.4.- DESARROLLO DE UN BULBO

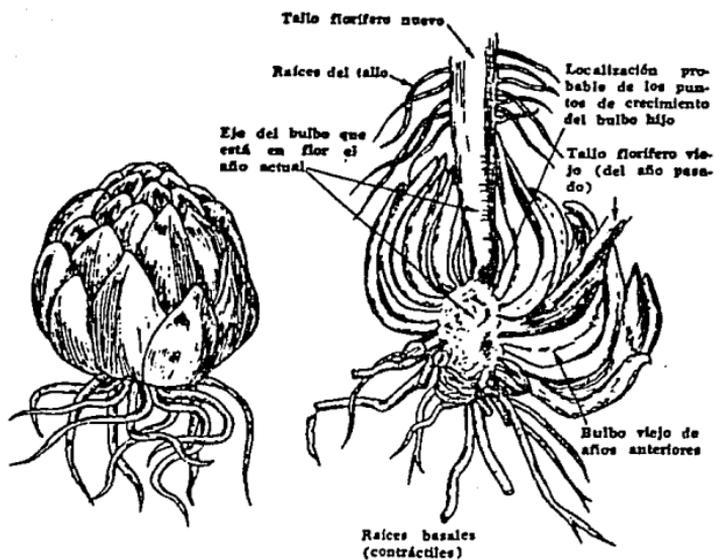
El ciclo general de desarrollo de un bulbo está formado por dos fases fundamentales : la fase vegetativa y la fase reproductiva.

En la fase vegetativa los bulbillos crecen hasta llegar a cierto tamaño para poder florecer.

La fase reproductiva subsecuente comprende la inducción de la floración, la diferenciación de las partes florales y la producción de semillas.

La fase vegetativa, principia con la iniciación del bulbillo sobre el platillo basal en la axila de una escama bulbar este período dura una sola estación de crecimiento.

FIGURA No. 2 MORFOLOGIA DEL BULBO DE LILIUM LONGIFLORUM.



La iniciación de la fase reproductiva y el término de la fase vegetativa son indicadas por el secamiento del follaje y la maduración del bulbo. Los bulbos de *Lilium longiflorum* no entran en reposo en la misma forma que otros bulbos y sus raíces no se desintegran. El bulbo debe estar desenterrado un poco.

En este periodo en el interior del bulbo ocurren cambios importantes pues el meristema vegetativa está efectuando una transición a brote floral. (Hartmann 1975).

3.5.- PROPAGACION DE LILIUM

Las plantas se pueden multiplicar de dos maneras : vegetativamente (asexual) y de forma generativa (sexual). Los dos tipos de propagación pueden ser imposibles en determinadas condiciones. (Pierik 1990).

3.5.1.- PROPAGACION SEXUAL

El método de propagación sexual en *Lilium* es solamente utilizado para mejoramiento genético y la creación de nuevos híbridos.

No es inconveniente para su propagación a nivel comercial es por la pérdida de su estabilidad genética y por la incapacidad de la especie por conservar la homogeneidad al ser propagada por semilla (Hartmann 1975, Pierik 1990).

Salinger (1987), dice que las semillas de *Lilium longiflorum* tardan 3 años para entrar en producción y Phillips (1985), dice que tardan 5 años.

3.5.2.- PROPAGACION ASEXUAL

La propagación asexual es indispensable cuando la multiplicación sexual no es satisfactoria por no formar semillas o formar muy pocas o que las semillas pierden rápidamente su capacidad germinativa. (Pierik 1990).

En especies bulbosas, la propagación asexual es más fácil, más rápida que si se propagara por semilla. (Hartmann 1975).

Las principales formas de propagación son : método de los bulbillos, escamado y micropropagación.

3.5.2.1.- METODO DE LOS BULBILLOS

Los bulbillos en tallos pueden ser subterráneos ó aéreos; el primero es el que se usa de modo comercial.

Este método consiste en que al terminar la floración se arrancan los tallos de los bulbos, para luego sacar los bulbos y bulbillos los cuales se almacenarán.

A la siguiente época de plantación se siembran y al terminar su ciclo se les llamará bulbos de un año, éstos se resembrarán y al final de su ciclo son considerados bulbos comerciales.

Los bulbos comerciales se deben empacar en cajas forradas con polietileno que contengan musgo turboso con un 30 a 50 % de humedad y deben almacenarse a 31°F (-1°C).

Para producir una floración en un período más corto se les debe almacenar a una temperatura de 45 a 50°F (7 a 10°C por seis semanas para luego cultivarlas a una temperatura nocturna de 60°F (16°C) o mayor.

Los bulbillos en tallos aéreos: estos se forman en las axilas de las hojas y son conocidas como bulbillos. Los bulbillos se deben cosechar antes de que caigan naturalmente. A una planta se le puede inducir a un aumento en la producción de bulbillos suprimiendo la yema floral. Estos tienen un manejo semejante o igual al de los bulbillos subterráneos.

3.5.2.2.- ESCAMADO

Es un método eficiente para producir bulbos, en esta técnica las escamas individuales del bulbo se separan del bulbo madre y se colocan en condiciones de crecimiento, de tal modo que se formen bulbillos adventicios en la base de cada escama. En cada escama se forman de 3 a 5 bulbillos. Este método es de particular utilidad para incrementar con rapidez una nueva variedad.

El escamado generalmente se práctica inmediatamente después de la floración, a los bulbos madre se les remueven las dos capas exteriores de escamas para que se siga desarrollando.

Las escamas pueden ser plantadas en el campo o en charolas en éstas se pueden utilizar sustratos de arena húmeda, musgo turboso, musgo sphagnum o vermiculita por espacio de 6 semanas a temperatura de 65 a 70°F (18 a 21°C).

Las escamas se insertan a la mitad de su longitud y en un lapso de 3 a 6 semanas se deben formar en sus bases raíces y bulbillos. Después se trasplantan las escamas bien sea a campo abierto o en macetas. (Hartmann 1987)

3.5.2.3.- MICROPROPAGACION

La técnica de micropropagación a sido utilizada en la última década para obtener plantas libres de virus de *Lilium longiflorum* (Van Aartrijk 1980).

Pierik (1990), menciona que la multiplicación vegetativa in vitro de bulbos ornamentales ha tenido un papel importante en los últimos años.

Zimmermann (1991), indica que la técnica de cultivo de tejidos en especies bulbosas ha tenido gran interes por su rápida propagación.

Para las lilis la propagación por cultivo de tejidos es el método más rápido, además de que da plantas sanas. (Salinger 1987)

3.6.- MICROPROPAGACION

3.6.1.- DEFINICION

Cultivo in vitro, cultivo de tejidos o micropropagación; se ha definido como el cultivo aséptico de células, tejidos y órganos vegetales intactos en condiciones de laboratorio con el fin de inducir la formación de órganos hasta obtener plantas completas que se basa en la totipotencia de las células vegetales siendo está la capacidad de regenerar un nuevo individuo a partir de ellas. (Arellano et al 1985).

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

3.6.2.- ANTECEDENTES

Aún es difícil determinar el origen del cultivo de tejidos, pero importantes antecedentes se remontan a 1838 cuando Schwamm y Scheidan promulgaron la teoría de la totipotencia, la cual establece que las células son autosuficientes y que el principio fundamental es que son capaces de regenerar una planta completa. (Gautheret 1883 citado por Pierik 1990).

En el cuadro No. 2 se hace referencia a fechas y sucesos importantes para el desarrollo del cultivo de tejidos en *Lilium longiflorum* T

**CUADRO RESUMEN NO INVESTIGACIONES REALIZADAS
IN VITRO EN LILTIUM LONGIFLORUM**

EXPLANTO	REFERENCIA
ESCAMAS DE BULBO	Van Aartrijk et al 1980 Tayacama-Misava 1980 Novak-Petru 1981 Torres y Natarella 1982 Tayacama et al 1983 Van Aartrijk 1984 Niimi 1985 Konchak 1985 Van Aartrijk 1987 Tomita et al 1988 Maqtzuo et al 1989 Plerik 1990 Moeselo et al 1991 Zimmermann 1991
HOJAS	Stenberg et al 1977 Novak and Petru 1981 Niimi 1985
COTILEDONES	Zimmermann and Ascher 1982
TALLO	Rigol 1974 Zieslin and Tsujita 1980
PARTES DE FLORES	Debraux and Gauaudan 1949 Coquen and Astie 1968 Tayacama and Misava 1979 Novak and Petru 1981 Liu and Burger 1985
CALLOS	Sheridan 1968 Hussey 1975 Simmonds et al 1975 a,b, Graves and Matthea 1978 Kubitz et al 1979 Stimart et al 1980 Oogaki 1982 Kruczkovska 1985 Yong Qu 1988.

FUENTE : Ammirato et al 1989; Margara 1988.
Publicaciones que hacen referencia a la regeneracion
de bulbos in vitro.

3.6.3. - FASES

En la propagación de plantas por cultivo de tejidos, se han establecido una serie de fases, cada una con un objetivo específico y requerimientos diferentes. (Murashige 1974).

Villegas (citado por Ochoa 1983), caracteriza 4 fases : de las cuales tres de ellas son in vitro y una ex-vitro. Sin embargo Zimmerman (1991), establece las 4 fases pero incluye la fase 0, en donde la planta madre o donadora de los explantos debe tener un preacondicionamiento.

3.6.3.1.- FASE 0

La fase 0 o de preacondicionamiento se puede introducir, a fin de remediar problemas de contaminación por hongos y bacterias en su establecimiento in vitro.

Para lograr esto, el crecimiento de la planta madre debe hacerse en invernaderos limpios, además, se debe tener especial cuidado con la temperatura y humedad.

Los cambios fisiológicos asociados a la planta madre en la fase 0 incluye algunas manipulaciones, de tal manera que las plantas tengan las mejores condiciones para el desarrollo in vitro, como la luminosidad, temperatura y el pretratamiento con reguladores del crecimiento. (Zimmerman 1991).

Los bulbillos que se cosechan son almacenados a una temperatura de 2°C a 10°C durante 6 semanas antes de ser utilizados in vitro. (Dennis 1978; Novak y Petru 1981).

Aartrijk van y Blom-Barnhoorn (1981), dicen que los bulbillos deben tratarse con Benlate al 2% y 1.5% de Difolatan por 30 min, y almacenarse en un rango de 0°C a 5°C por 4 meses, plantandose posteriormente en un invernadero y después de cumplir su ciclo

su ciclo vegetativo se sacan los más pequeños para establecerlos in vitro. (Simmonds y Cumming 1976).

3.6.3.2. - FASE 1

La fase 1 o establecimiento aseptico tiene la finalidad de evitar la contaminación del material vegetal por lo cual debe realizarse una adecuada esterilización.

3.6.3.2.1. - ESTERILIZACION

En principio existen 4 fuentes de infección : la planta (su exterior o interior), el medio nutritivo, insuficiente esterilización, el aire y la poca destreza del operador (Pierik 1990).

La esterilización del material está en función de la planta (herbacea, leñosa o semileñosa), de la edad y del interés del investigador.

La efectividad de los agentes desinfectantes puede ser mejorada adicionando detergentes biológicos en pequeñas cantidades (Tween 20, 80; Triton etc.), estos ayudan a romper la tensión superficial y permiten que el agente penetre y elimine los microorganismos.

La elección del tiempo de esterilización y la concentración de las soluciones estará en función de cada caso. Depende en gran parte de si la superficie del explanto que se esteriliza se va a conservar (esterilización suave), o se va a cortar antes de la incubación (esterilización vigorosa). (Kyte 1987, Pierik 1990, Rosell y Villalobos 1990).

En el cuadro No. 3 se puede observar que varios autores han utilizado diferentes tipos, concentraciones y tiempos de agentes esterilizantes.

CUADRO RESUMEN No. 3 DIFERENTES METODOS DE ESTERILIZACION
UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES ESTERILIZANTES

AUTOR	AÑO	ESTERILIZACION
Tayacama-Misava	1979	0.5-4.0 % NaCl por 10-90 min.
	1980	en alcohol 90 %.
	1982a	
Robb	1957	en Ca(OCl) ₂ por 15 min.
Kubitz et al	1979	en AgNO ₃ por 3min.
Gupta	1978	HgCl ₂ por 10 min.
Kyle	1987	1/10 NaOCl 10-20 min.
Blirmart-Ascher	1978	95% de alcohol por 1.5 min 0.5% hipoclorito de sodio por 20 min.
Simmonds-Cumming	1976	70% de alcohol etílico
		10% jadex por 30 min.
Van Aartrijk	1980	1% NaOCl por 30 min.
Sheridan	1968	5 min. detergente heikol
		10% cloro por 10 min
Yong Qu et al	1988	70 % alcohol por 1 min
		1.5% hipoclorito de sodio por 7 min.;
Novak-Petru	1981	4% hipoclorito de sodio por 30 min.

3.6.3.2.2. - SELECCION DEL EXPLANTO

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

a) Genotipo : la capacidad de regeneración es muy variada; generalmente las dicotiledoneas se regeneran mejor que las monocotiledoneas.

b) Edad de la planta : conforme una planta envejece su capacidad regenerativa disminuye por lo que se deben utilizar plantas jóvenes.

c) Edad del órgano o tejido : los tejidos jóvenes no lignificados son más apropiados para el cultivo in vitro que los tejidos viejos y leñosos.

d) Estado fisiológico : en general los fragmentos de plantas en estado vegetativo, regeneran in vitro, con mayor facilidad que los provenientes de plantas en estado generativo.

e) Estado sanitario : se recomienda que las plantas de las cuales se obtienen los explantos sean cultivadas en invernaderos, ya que tienen menor escala de problemas fitosanitarios que las cultivadas a campo abierto.

f) Tamaño del explanto : es mucho más difícil inducir crecimiento en estructuras muy pequeñas como células, agregados de células y meristemas; que de estructuras más grandes como explantos de hoja, tallo o tubérculo. 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, Zimmerman 1991).

Tener el explanto esterilizado y sin problemas de oxidación es para promover la formación de brotes o bien la formación de callos, siendo necesario que tanto el medio como el material vegetativo se encuentren libres de microorganismos y otras fuentes de contaminación para garantizar el establecimiento y desarrollo del tejido. (Cruz 1983).

3.6.3.3.- FASE 2

En esta fase 2 o de multiplicación del propágulo se busca un rápido desarrollo de órganos y otras estructuras, este incremento puede ser debido a la inducción de brotes adventicios o brotes axilares, que son una respuesta a estímulos de altas concentraciones de citocininas en presencia de menor concentración de auxinas, buscando el nivel hormonal mas apropiado de cada caso (Cruz 1983, Zimmerman 1991).

Consiste además de una serie de sub-cultivos o repicados periódicos que permiten una rápida multiplicación de los propágulos, optimizando la concentración de nutrientes y reguladores de crecimiento, debido a que de ello depende en gran medida la formación de brotes. (Murashige citado por Cruz 1983; Zimmerman 1991).

Los factores físicos a considerar en el cuarto de incubación son la luz y la temperatura; respecto a la primera hay que considerar la intensidad lumínica la que comunmente es de 3000 a 5000 lux con una duración de 16 a 18 hrs/día, generalmente es proporcionada por tubos de luz fluorescente blanca ya veces se completa con lamparas incandescentes.

Algunas investigaciones muestran que a ciertas longitudes de onda, se activa el fitocromo y esto induce a respuestas morfogénéticas.

La temperatura se establece de 22° a 23°C dependiendo de la especie. (Duran 1993, Zimmerman 1991, Pierik 1990).

Kyle 1987; dice que los bulbos de liliun pueden ponerse en luz intermitente o periodos continuos de oscuridad o en ambos, lo que dependerá del operador y del cultivar. Los periodos continuos de oscuridad son preferidos para un mayor número de bulbillos y de menos hojas que es lo mejor para el trasplante.

Aartrijk van (1978, 1980), expuso a los bulbos a una temperatura de 21 ±1°C y una intensidad lumínica de 2800 luxes con un periodo de 16 hrs luz.

Estudios de varios investigadores proponen que liliun debe incubarse en un rango de 20 a 30°C (Aartrijk van 1990; Tayacama et al 1979; Stirmart et al 1983); y con una intensidad lumínica de 2000 a 3000 luxes, lo que ayuda a la regeneración de bulbos y plantas completas.

El efecto de la regeneración depende de su genotipo, en la mayoría de los casos el cultivo bajo luz da mejores resultados que el cultivo en la oscuridad. (Kruczkowska 1986).

3.6.3.4. - FASE 3

La fase de enraizamiento involucra la inducción y diferenciación de raíz en los brotes obtenidos durante la proliferación, existiendo así una conversión de un estado heterotrófico a uno autotrófico al desarrollar sus raíces, confiriéndole además una determinada tolerancia a la tensión de

húmedad. (Cruz 1983). La respuesta de enraizamiento in vitro depende de la especie y aún de la variedad (Ochoa 1983).

En este caso los reguladores de crecimiento también juegan un papel importante y es en donde las auxinas se suministran en mayores concentraciones con respecto a las citocininas, con el fin de promover la inducción de la raíz. (Pierik 1990; Zimmerman 1991).

La producción de bulbos a bajas concentraciones de ANA generalmente tienen raíces, pero cuando son establecidos con altas concentraciones también tienen hojas. (Maesoto 1991). Dennis et al (1978), indica que el número de raíces aumenta cuando se incrementa la auxina ANA a una temperatura de 25°C, y existe una formación de raíces cuando el ANA se suministra en un rango del 1 a 5 μ M. (Petru y Novák 1981).

3.6.3.5.- FASE 4

Una planta que se ha generado in vitro difiere en varios aspectos de las que se originan in vivo. Las plantas cultivadas in vitro tienen la cutícula (capa de cera) escasamente desarrolladas; debido a la alta humedad relativa, que va de 90 % al 100 %; y cuando se transfiere al suelo se produce una transpiración muy elevada ya que la humedad del aire es más baja.

Las hojas de una planta producida in vitro son blandas y fotosintéticamente poco activas y en consecuencia mal adaptadas a las condiciones que pueden encontrar in vivo. Las hojas presentan células empalizadas con grandes espacios intercelulares y baja presencia de estomas y poco operativos; esto hace que dichas plantas sean más sensibles a la pérdida de agua.

Las raíces originadas in vitro no son funcionales in vivo debido a que presentan pocos pelos radiculares (Rosell y Villalobos 1990, Pierik 1990).

La aclimatación se inicia con un preacondicionamiento, el cual consiste en disminuir la humedad relativa y controlar la temperatura y luz.

Las plantas deben habituarse a una humedad relativa baja gradualmente. Un método sería dejar abierto el tubo en un ambiente estéril durante algunos días para ajustarse a las condiciones in vivo. Otro método sería eliminar los residuos del medio de cultivo y llenar diariamente durante una semana con una solución nutritiva a la mitad de su concentración en un ambiente estéril.

También se hace una preadaptación a los regimenes de luz y temperatura que prevaleceran en el invernadero durante el transplante; que llevando los tubos a este lugar por algunos días.

Al ser transplantadas las plantas se les debe eliminar el agar para evitar infecciones por hongos y bacterias, deben sumergirse en una solución fungicida e impregnar la raíz con algun enraizador comercial, para facilitar la formación de raíces.

El sustrato debe estar esterilizado y tener una buena porosidad, drenaje, aireación y pH adecuado. En algunos casos se puede adicionar nutrientes al sustrato para ayudar a incrementar la sobrevivencia.

Para mantener la humedad relativa se han utilizado bolsas de polietileno o vasos de precipitados que cubren de manera individual a cada planta, pero esto solo se utiliza a menor escala y en experimentos de laboratorio.

A nivel comercial se utilizan cuadros de suelo cubiertos con plásticos para que mantengan la humedad del aire elevada, algunas veces se utilizan pulverizadores.

En los últimos años los sistemas de nebulización se han generalizado para la aclimatización de plantas in vitro, manteniendo una humedad relativa alta en donde también se incrementa la humedad del sustrato, por lo consiguiente eleva la sobrevivencia de las plantas en esta fase. (Pierik 1990; Rosell y Villalobos 1990; Zimmerman 1991).

El éxito de la transferencia de los bulbos al suelo requiere de pretratamientos para romper la dormancia. El periodo de exposición a bajas temperaturas (2 a 5°C) varía de 1 a 20 semanas, (Stirmart et al 1982; Tayacama et al 1982; Aartrijk et al 1978, 1990; Paek y Shin 1983), para romper el estado de dormancia.

Nimi et al (1988), aplicó a los bulbos con GA₃ para poder reducir el requerimiento de frío para que su brotación en el suelo fuera en varias semanas.

La inmersión de los bulbos en agua a 45°C en un periodo de 30 min. a 8 hrs así como una alta iluminación con luz roja, también conducen a la rápida emergencia de las hojas en los bulbos (Stirmart et al 1982; Aartrijk van 1990).

La elongación del tallo se puede lograr cuando los bulbos son generados in vitro a 30°C, se aumenta por una hora de agua caliente a 45°C y con tratamientos de frío a 4°C. (Stirmart et al 1983; Aartrijk van 1990). Maesoto (1991), menciona que para poder establecer los bulbos in vivo deben ser expuestos al frío, además deben ser sembrados sin hojas.

3.6.4.- MEDIO DE CULTIVO

El éxito del cultivo de plantas está influenciada por la composición química de los medios de cultivo utilizados y otros factores ambientales. (Rosell y Villalobos 1990).

El medio de cultivo es una solución acuosa que está constituido por sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes); vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, agua, agentes solidificantes y reguladores de crecimiento.

3.6.4.1.- SALES INORGANICAS

Las sales inorgánicas o minerales se dividen en dos grupos que son los macroelementos y microelementos.

3.6.4.1.1.- MACROELEMENTOS

Los tejidos requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos, además de carbono, hidrógeno y oxígeno. (Rosell y Villalobos 1990), que son sustancias que se agregan al medio en grandes cantidades (gr) como : N, P, K, Ca, Mg, S.

NITROGENO : Este influye en el índice de crecimiento de la planta, es un elemento esencial en la composición molecular de la clorofila, alcaloides, ácidos nucleicos, aminoácidos y en algunas hormonas de las plantas. El N se suministra en forma de iones NH_4 y NO_3 . (Kyte 1987).

FOSFORO : Este elemento es abundante en el meristemo y otros tejidos de rápido crecimiento. Su principal utilidad aparece como activador de enzimas (las enzimas son compuestos que promueven reacciones sin ser parte de ellas). Las fuentes de fosforo utilizadas in vitro son : Fosfato de potasio ($K_2H_2PO_4$) y Fosfato de sodio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$). (Kyte 1987).

POTASIO : En la planta es un elemento que ayuda a la división celular normal, la síntesis de carbohidratos y proteínas, para la creación de clorofila, así como para la reducción de nitratos.

Sus fuentes principales son : Nitrato de potasio (KNO_3); Fosfato de potasio (KH_2PO_4) y Cloruro de potasio (KCl). (Kyte 1987).

CALCIO : Como pectato de calcio es una parte integral de la pared celular de la planta y juega un papel en la permeabilidad de la misma pared. Facilita el movimiento de los carbohidratos y aminoácidos por toda la planta y promueve el desarrollo de raíz. Como oxalato de calcio es vinculado con el ácido oxálico como producto del metabolismo celular. El calcio es usualmente incluido en el medio de cultivo como Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o como Nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

MAGNESIO : Es el elemento central de las moléculas de clorofila es importante también como activador de enzimas. En los medios de cultivo se suministra como Sulfato de magnesio ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), también son conocidas como sales de Epsom. (Kyte 1987).

AZUFRE : Está presente en algunas proteínas, promueve el desarrollo de raíces y de un follaje verde. Este se suministra en forma de sulfatos (SO_4). (Kyte 1987).

3.6.4.1.2.- MICROELEMENTOS

Para una adecuada actividad metabólica las células requieren de microelementos. Los más esenciales son : Fe, Cl, I, Mn, Zn, Bo, Cu, Co, y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos. (Rosell y Villalobos 1990). Son sustancias que se agregan al medio de cultivo en cantidades pequeñas (mg).

FIERRO : Esta implicado en la síntesis de clorofila, participa también en la conversión de energía en la fotosíntesis y respiración así como la reducción del estado ferrico al ferroso.

En el medio de cultivo el Sulfato ferroso ($\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), es mezclado con la sal de sodio EDTA, que al liberarse el fierro es más asimilable por la planta (Rosell y Villalobos 1990, Kyte 1987)

MANGANESO : Es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético (Rosell y Villalobos 1990). Es suministrado como Sulfato de Manganeso ($\text{SO}_4\text{Mn}\cdot\text{H}_2\text{O}$).

(Kyte 1987).

ZINC : Es un elemento vital en varias enzimas, está involucrada en la formación de clorofila así como en la producción de ácido indolacético. Las trazas de zinc son suministrados como Sulfato de Zinc ($\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$). (Kyte 1987).

BORO : Es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, esta involucrado en la síntesis de las bases nitrogenadas en particular el uracilo (Rosell y Villalobos 1990).

Es un elemento que activa el movimiento del azúcar; el boro es adicionado al medio en pequeñas cantidades de Acido bórico (H_3Bo_3). (Kyte 1987).

COBRE : Se cree que es necesario en la conversión de energía como alternante entre el estado cuproso y cúprico; es adicionado al medio en Sulfato de cobre ($\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$). (Kyte 1987).

COBALTO : Es un elemento de la molécula del complejo de la vitamina B_{12} que es esencial para la fijación de N; es adicionado al medio en Cloruro de cobalto ($\text{ClCo}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$). (Kyte 1987).

MOLIBDENO : Se cree que participa en la conversión del N en amoniaco, ayuda a la fijación de N y se suministra al medio como Molibdanato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). (Kyte 1987).

CLORO : Es esencial para estimular la fotosíntesis, aunque su función no es muy implícita; se suministra al medio como Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). (Kyte 1987).

YODO : Es adicionado al medio como Yoduro de potasio, no es usualmente considerado como elemento esencial, aunque, es componente de algunos aminoácidos. (Kyte 1987).

3.6.4.2.- VITAMINAS

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas utilizadas in vitro pertenecen al grupo B y son : Inositol, Ac. nicotínico, Tiamina, Piridoxinas, Ac. pantoténico, Ac. fólico, Riboflavina, Biotina, Tocoferol. (Rosell y Villalobos 1990; Pierik 1990).

3.6.4.3.- AMINOACIDOS

Son bloques en la constitución de proteínas y ácidos nucleicos (Kyte 1987). Los aminoácidos no son esenciales para el crecimiento de tejidos in vitro, sin embargo, proporciona una fuente inmediata de N de asimilación rápida (Rosell y Villalobos 1990).

3.6.4.4.- ANTIOXIDANTES

Se emplean para reducir la oxidación en los tejidos y entre estos tenemos al ácido cítrico, ácido ascórbico y carbón activado entre otros. (Kyte 1987).

3.6.4.5. - AGENTES GELIFICANTES

El agente gelificante es el agar, mezcla de polisacáridos derivados de extractos de varias especies de algas rojas. El polisacárido es un carbohidrato que tiene un gran número de azúcares simples tales como la glucosa, enlazados conjuntamente en la estructura química. El agar es utilizado para la preparación de medios sólidos o semisólidos.

Existen otros compuestos que se han empleado para sustituir al agar, sin embargo pocos han tenido éxito. Posiblemente el que más popularidad ha alcanzado es el gelrite (Rosell y Villalobos 1990).

3.6.4.6. - AZUCAR

El azúcar es un compuesto importante para el medio, es un componente esencial para el crecimiento y desarrollo in vitro, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis e incluso en la obscuridad. Los tejidos verdes no son suficientemente autotrofos in vitro. Las plantas que crecen in vitro no pueden sintetizar sus propios carbohidratos por eso requieren de una alta concentración de azúcar. (Kyte 1987).

3.6.4.7. - AGUA

El agua es uno de los componentes más importantes ya que constituye el 95 % del medio de cultivo. (Pierik 1990). Esta debe ser destilada debido a que el agua corriente contiene minerales, aceites, óxidos metálicos, productos corrosivos, microorganismos, material orgánico y sales disueltas.

Para almacenar el agua los mejores recipientes son los de polietileno ya que el vidrio tiene trazas de plomo, sodio y arsénico que puede pasar al agua; si se utiliza vidrio tiene que ser del tipo pyrex. (Pierik 1990).

3.6.4.8. - REGULADORES DE CRECIMIENTO

En el cultivo in vitro de las plantas, los reguladores de crecimiento especialmente las auxinas y citocininas son importantes. Se puede decir que el cultivo in vitro es generalmente imposible sin reguladores. Adicionando auxinas o citocininas al medio se promueve la extensión y/o división de las células, pero ello dependerá del tipo de explanto y especie vegetal.

Debido a que un explanto puede producir suficiente cantidad de auxina endógena, no se necesita una cantidad adicional para conseguir la división o extensión; lo mismo sucede con un explanto que no necesita la adición de citocininas exógenas. (Pierik 1990).

3.6.4.8.1. - AUXINAS

Las auxinas comerciales Ac. indolacético (AIA), Ac. indolbutírico (AIB), Ac. naftalenacético (ANA), y el Ac. 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); se adicionan frecuentemente al medio de cultivo. El AIA se produce en forma natural en las plantas y las auxinas sintéticas son relativamente más estables y activas ANA, AIB y 2,4-D. (Pierik 1990).

Las auxinas promueven la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callos) y la formación de raíces adventicias; inhiben la formación de vástagos axilares y adventicios, frecuentemente inhiben la embriogénesis en cultivos en suspensión. (Kyte 1997, Pierik 1990).

Las auxinas son comunmente usadas en el medio de cultivo combinadas con citocininas durante la fase de multiplicación y sin citocininas en la fase de enraizamiento. (Kyte 1997).

Las bajas concentraciones de auxinas inducen la formación de raíces adventicias, mientras que las altas concentraciones inducen la formación de callos. (Rosell y Villalobos 1990).

De todas las auxinas el 2,4-D se deben evitar al máximo debido a que induce a la formación de callos y mutaciones. (Kyte 1987, Pierik 1990).

3.6.4.8.2. - CITOCININAS

Las citocininas más comunes en el cultivo in vitro son : Kinetina (K), Bencilaminopurina (BA), 6-Y,Y-dimetilalilamino purina (Zip) y 6-(bencilamino)-9-(2-tetrahidropiraniil)-9H-purina (PBA). Estimulan la división celular, si van acompañadas de una auxina inducen a la formación de vástagos adventicios, en concentraciones elevadas (1 a 10 mg/lit) inhiben la formación de raíces, la dominancia apical y retardan el envejecimiento. (Kyte 1987, Pierik 1990).

3.6.4.8.3. - GIBERELINAS

Estás usualmente no son usadas en el cultivo in vitro, debido, a que no son tan esenciales, pero debe tenerse en cuenta su sensibilidad al calor pues pierden el 90 % de su actividad biológica después del autoclaveado. (Van Bragt et al 1971 citado por Pierik 1990). Induce a la elongación de entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas in vitro. (Kyte 1987, Pierik 1990).

3.6.4.8.4. - OTROS REGULADORES

El Ac absicico y el etileno producen efectos negativos en el cultivo in vitro; con el primero todavía no se tiene claro su efecto, mientras que el etileno detiene el crecimiento, cuando los tubos de ensayo son cerrados herméticamente. (Pierik 1990).

En estudios realizados a Lilium longiflorum, diferentes investigadores coinciden en suplementar al medio de cultivo con una auxina sintética (ANA) y como fuente de citocininas a la (K). Esto se puede observar en el cuadro No. 4.

CRUADRO NO.4 REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS EN LILIUM

CITOCININAS mg/Ll	AUXINA mg/Ll	INVESTIGADOR
0.5 K	1.5 ANA	Wu y Wang 1989
0.001-0.1 K	0.01-1.0 ANA	Nitmi 1985
0.5 K	0.5 ANA	Konchak 1986
0.5 K	0.1 ANA	Nitmi 1985
	0.5-2.0 2-4,D	Maesolo 1991
0.1-5.0 BA	0.1-1.0 ANA	Kruczkowska 1986
0.1 BA	0.4 ANA	Liu et al 1986
0.5 K	0.5 ANA	Konchak et al 1986
0.1 BA	0.1 ANA	Kyle 1987

Novak y Petru 1981, utilizaron el medio de cultivo de Linsmaier y Skoog 1965, suplementado con ANA y BAP, ajustado a un pH de 5.8. J. van Aartrijk (1980,1990), utilizó el Medio de Murashige y Skoog (1962), el encuentro que al suplementar el medio con 5% de azúcar hubo un incremento de número de plantas por explanto, además que el pH fue ajustado a 6.0.

El efecto de la concentración de sales del MS es favorable para la regeneración y desarrollo de los bulbos. (Aartrijk van 1990).

Simmonds y Cumming (1976), utilizaron el medio de cultivo reportado por Murashige y Skoog (1962), ajustado a un pH de 5.7 en la que tuvieron una buena regeneración de explantos. Otros investigadores que han utilizado el medio MS son : Niimi 1985, 1986; Kyte 1987; Kawarabayashi 1988; Tomita et al 1988; Wu et al 1989; Maesoto 1991; entre otros.

IV. - MATERIALES Y METODOS.

4.1.- LOCALIZACION

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de cultivo de tejidos de la carrera de Ingeniero Agricola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Edo. de México.

4.2.- ESTABLECIMIENTO.

4.2.1.- OBTENCION DEL MATERIAL VEGETAL. falta la variedad

El material vegetal se obtuvo de los invernaderos de la carrera de Ingeniero Agricola. Los bulbillos fueron lavados con agua potable y un detergente comercial, posteriormente fueron enjuagados hasta eliminar la tierra y los residuos del detergente.

4.2.2.- CARACTERISTICAS DE LA VARIEDAD

Se emplearon bulbos de la variedad Fuego, sus flores son de color anaranjado, las cuales tienen una altura aproximada de 100 cm, tiene un botón grande (15cm de diámetro), de tallo sólido. Es una variedad poco sensible a la luz y se puede cultivar en verano, verano/otoño, invierno/primavera. Su cultivo dura 13 semanas aproximadamente.

4.2.3.- DESINFECCION DEL MATERIAL VEGETAL.

Al ser lavados los bulbillos se colocaron en una solución de alcohol por 3 min para luego colocarse en una solución de cloro al 70 % una vez desinfectados y con ayuda de la campana de flujo laminar previamente limpiada se enjuagan con agua destilada-esterilizada; durante el proceso de enjuagado se deben tener encendidos los mecheros para tener un alto porcentaje de asepsia.

4.2.4. -SIEMBRA

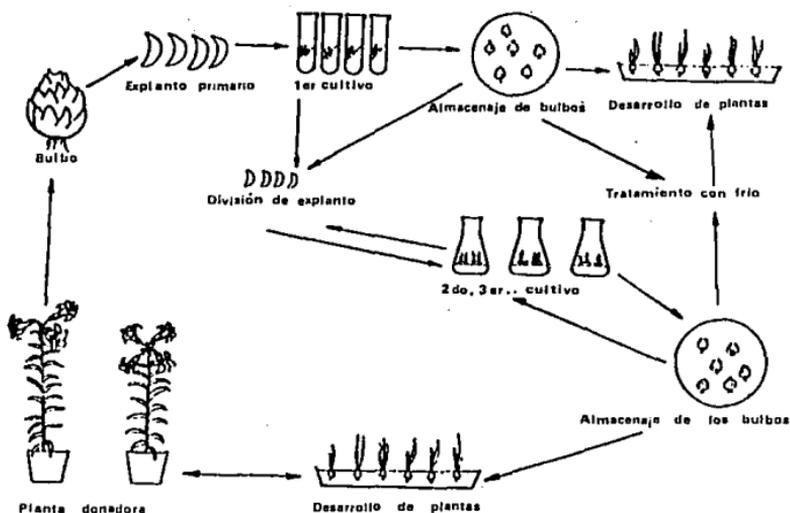
Antes de realizar la siembra las cajas de petri que se utilizaron fueron previamente esterilizadas en el autoclave; las pinzas y bisturi fueron lavados con agua y jabón.

Cada vez que se sembró un explanto, las cajas de petri fueron limpiadas y luego junto con las pinzas y el bisturi fueron flameados.

Al estar listo el instrumental, se tomaron uno a uno los bulbillos, se les quitaron las escamas exteriores, siendo colocados en un tubo de ensaye con medio de cultivo.

En la Fig. No. 3 se puede observar el esquema de la propagación in vitro de *Lilium* en sus diferentes fases de cultivo.

FIGURA No 3 ESQUEMA DE LA PROPAGACION IN VITRO DE LILIAM



4.3.- CONDICIONES DE INCUBACION

Después de haber realizado la implantación, los tubos se colocaron en el cuarto de cultivo en donde se tiene un ambiente controlado, con un período de 16 hrs luz con una intensidad lumínica de 3000 luxes y una temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.4.- MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (MS) al 50 % de su concentración de sales minerales, fue suplementado con K y ANA a diferentes dosis. Además se le agregaron 30 gr de azúcar y 6 gr de agar por litro. (Cuadro No. 5).

CUADRO No 5 MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG 1962

<u>SALES INORGANICAS</u>			
MACROELEMENTOS (mM/lit)		MICROELEMENTOS (μM /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
KH_2PO_4	1.25	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Na_2 - EDTA	100 μM /lit	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 μM /lit	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
<u>COMPUESTOS ORGANICOS</u>			
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 g/lit
		Agar	6 g/lit

4.5. - FECHAS DE SIEMBRA.

Para la Fase de establecimiento la fecha de siembra fue el 16 de Febrero de 1993 y se evaluó el 29 de Junio.

Para la Fase de proliferación se realizó el 29 de Junio y se evaluó el 11 de Octubre

4.6. - DISEÑO EXPERIMENTAL.

En la fase de establecimiento se utilizó un diseño completamente al azar en donde los tratamientos fueron determinados por las diferentes dosis de reguladores de crecimiento K (0, 0.1, 0.5 mg/Lt) y ANA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/Lt), que se combinaron al azar y cuyo arreglo puede verse en el cuadro No. 6.

En total se tuvieron 15 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, y la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo; dandoun total de 150 unidades experimentales.

En la Fase de proliferación se utilizó el tratamiento 6 el cual tuvo mejor respuesta al número de brotes y calidad del mismo, al cual se le adicionaron 0.5 mg/Lt de K y 0.1 mg/Lt de ANA.

Para la comparacion de medias para ambos experimentos se empleo la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5 %.

4.7. - TOMA DE DATOS.

La toma de datos se realizó de acuerdo a las fases de cultivo.

ESTABLECIMIENTO

1).- Porcentaje de contaminación: se cuantificó a los tres días de ser implantados.

2).- Desarrollo de bulbos: para cuantificar el número de brotes, estos fueron separados de cada tubo, registrando el número de brotes adventicios por cada unidad experimental.

3).- Longitud de brote: esta variable se cuantifico desde la parte basal de los bulbillos hasta la terminación de las hojas.

PROLIFERACION

1).- Desarrollo de bulbos: los bulbillos fueron colocados en el medio en el que se obtuvieron más brotes en el cual no se perdieron los tratamientos para poder cuantificar esta variable.

CUADRO No 6 DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO DE LILIUM IN VITRO

K →	0.0 mg/lit	0.1 mg/lit	0.5 mg/lit
ANA			
0.0 mg/lit	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3
0.1 mg/lit	TRAT. 4	TRAT. 5	TRAT. 6
0.5 mg/lit	TRAT. 7	TRAT. 8	TRAT. 9
1.0 mg/lit	TRAT. 10	TRAT. 11	TRAT. 12
2.0 mg/lit	TRAT. 13	TRAT. 14	TRAT. 15

V. - RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1.- ESTABLECIMIENTO

5.1.1.- CONTAMINACION

Existen factores que influyen en la contaminación como lo es la procedencia del explanto, si este procede del campo existe mayor probabilidad de tener índices altos de contaminación, en comparación a uno desarrollado en invernadero.

En este caso el cultivo fue desarrollado en invernadero, pero debido al aspecto escamoso del bulbo y por estar en contacto con el suelo tiene mayor probabilidad de contaminación por ello se hizo un pre-ensayo al establecimiento en el que se obtuvieron resultados favorables a una concentración de alcohol al 70% y cloro al 70%. Las concentraciones antes mencionadas se utilizaron para el establecimiento del presente trabajo, teniendo como resultado un porcentaje de contaminación del 0%. Se puede decir que es un resultado bueno ya que de los diferentes autores que han trabajado con *Lilium* no hacen mención de resultados con respecto a la contaminación.

5.1.2.- DESARROLLO DE BULBOS

Estadísticamente esta variable presenta diferencias altamente significativas (Cuadro No.7) y al realizar la comparación de medias (Cuadro No.8), el tratamiento 6 fue significativamente superior a los demás tratamientos ya que tuvo un promedio de 8.46 bulbos por explanto. Los tratamientos que le siguen con mayor número de bulbos son el T9 con 4.27 y el T4 con 3.6, aunque junto con el resto de los tratamientos estadísticamente son iguales. El número de bulbos promedio por tratamiento se puede ver en la Fig No. 4.

En los resultados obtenidos se puede observar que la dosis óptima para el establecimiento es de 0.1mg/Lt de ANA, pues en sus tres posibles combinaciones están dos de los 3 tratamientos con mayor desarrollo de bulbos. La dosis óptima de K fue de 0.5mg/Lt, que en dos de sus 4 posibles combinaciones tuvo un mayor desarrollo de bulbos.

CUADRO No 7 ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE BROTES

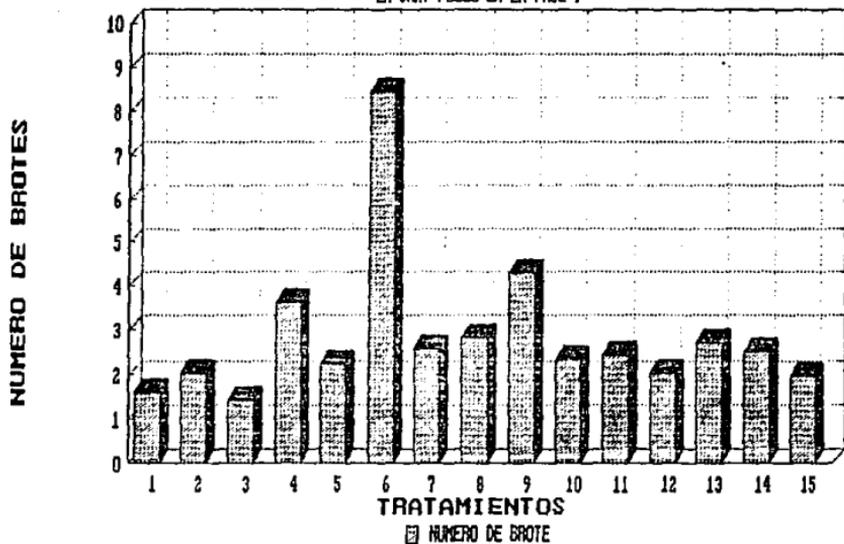
FV	GL	SC	CM	FC	FT
TRAT	14	408.85	29.2	7.46	* 1.75
ERROR	135	528.52	3.91		** 2.18
TOTAL	149	937.37			

CUADRO No 8 COMPARACION DE MEDIAS DEL NUMERO DE BROTES MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY

T.6 :	8.46	a	T.11 :	2.42	b
T.9 :	4.27	b	T.10 :	2.32	b
T.4 :	3.60	b	T.5 :	2.22	b
T.8 :	2.81	b	T.2 :	2.12	b
T.13 :	2.69	b	T.12 :	2.03	b
T.7 :	2.57	b	T.15 :	1.95	b
T.14 :	2.49	b	T.1 :	1.58	b
			T.3 :	1.41	b

FIGURA No 4

NUMERO DE BROTES POR TRATAMIENTO DE
LA VAR. FUEGO EN LA FASE I



5.1.3. - LONGITUD DE BROTES.

En el analisis de varianza para está variable mostró diferencias altamente significativas en los tratamientos (Cuadro No. 9). La comparación de medias de Tukey mostró que los tratamientos son estadísticamente iguales, excepto los tratamientos 9 y 6 que son estadísticamente inferiores a los demás. (Cuadro No. 10)

El tratamiento No. 6 fue el que tuvo mayor número de brotes por explanto, pero su longitud promedio es de 4.02 cm, que es la menor longitud en todos los tratamientos, sin embargo, en los demás tratamientos se reduce notablemente el número de brotes pero su longitud es mayor que va de un rango de 4.1 a 8.82cm en promedio (Fig. No. 5). Esto significa que un explanto entre mayor número de brotes tenga menor será la longitud de estos.

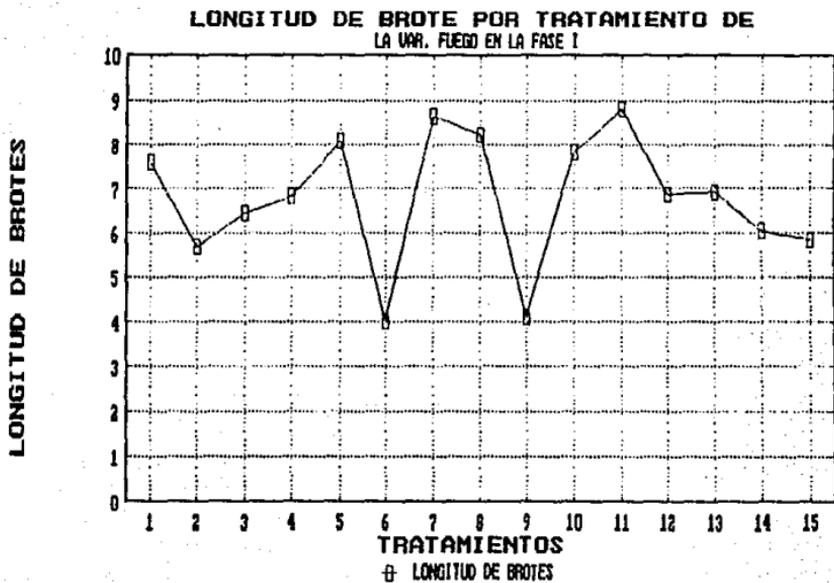
CUADRO No 9 ANALISIS DE VARIANZA DE LONGITUD DE BROTES

FV	GL	SC	CM	FC	FT
TRAT	14	303.49	22.03	2.32	* 1.75
ERROR	135	1277.49	9.46		** 2.18
TOTAL	149	1585.99			

CUADRO No 10 COMPARACION DE MEDIAS EN LONGITUD DE BROTES MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY

T.11 :	8.82	a	T.12 :	6.87	a
T.7 :	8.65	a	T.4 :	6.82	a
T.8 :	8.24	a	T.3 :	6.45	a
T.5 :	8.08	a	T.14 :	6.03	a
T.10 :	7.84	a	T.15 :	5.84	a
T.1 :	7.60	a	T.2 :	5.68	a
T.13 :	6.91	a	T.9 :	4.10	b
			T.6 :	4.02	b

FIGURA No 5



5.1.4.- RESPUESTA DEL EXPLANTO A LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

5.1.4.1.- AUXINAS

El adicionar ANA al medio de cultivo estimuló el desarrollo de bulbos en el establecimiento e incrementa su número en la proliferación a una dosis 0.1 mg/Lt, teniendo un promedio de 8.46 brotes en el tratamiento No. 6. Konchak (1987), obtuvo resultados similares con concentraciones bajas de ANA en un rango de 0.05 a 0.1 mg/Lt, que estimuló la formación de bulbos. Otros autores han trabajado con ANA, como Niimi (1985) teniendo como respuesta la regeneración de bulbos.

5.1.4.2.- CITOCININAS

La adición al medio de K a una dosis de 0.5 mg/Lt promovió el desarrollo de bulbos como lo fue en el tratamiento 6 donde tuvo una relación de auxina/citocinina de 5:1, teniendo un promedio de 8.46 bulbos por explanto. (Cuadro No. 11)

En el tratamiento No. 7 que solo tiene citocininas (0.5 mg/lt de k), el diámetro de los bulbillos fue de aproximadamente 0.8 cm esto significa que son los bulbillos más grandes en comparación a los demás tratamientos en el que su diámetro va de un rango de 0.3 a 0.5 cm.

El uso de la Kinetina como fuente de citocininas ha promovido no solo la regeneración de plantas completas sino también estimulo la proliferación a dosis relativamente bajas a las mencionadas en la bibliografía. En el cuadro No. 11 se puede observar el efecto de ANA y K sobre el número de brotes y su longitud.

CUADRO No 11 RESPUESTA DEL EXPLANTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS
EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO.

TRATAMIENTO	K (mg/l)	ANA	NUMERO DE BROTE	LONGITUD DE BROTE
1	0.0	0.0	1.58	7.60
2	0.1	0.0	2.12	5.68
3	0.5	0.0	1.41	6.45
4	0.0	0.1	3.60	6.82
5	0.1	0.1	2.22	8.08
6	0.5	0.1	8.46	4.02
7	0.0	0.5	2.57	8.65
8	0.1	0.5	2.81	8.24
9	0.5	0.5	4.27	4.10
10	0.0	1.0	2.32	7.84
11	0.1	1.0	2.42	8.82
12	0.5	1.0	2.03	6.87
13	0.0	2.0	2.69	6.91
14	0.1	2.0	2.49	6.03
15	0.5	2.0	1.95	5.84

5.2. - PROLIFERACION.

5.2.1. - DESARROLLO DE BULBOS

El medio de cultivo donde se estableció el primer sub-cultivo fue el MS al 50% de la concentración de sus sales minerales suplementado con 0.5 mg/Lt de K y 0.1 mg/Lt de ANA, que en la fase de establecimiento fue el mejor tratamiento.

La tendencia que se tiene al incrementarse la tasa de proliferación en los sub-cultivos se debe a que el explanto permanece por tiempos prolongados en contacto con el medio de cultivo por lo cual desarrolla mecanismos de habituación que le permite tener una mejor respuesta a las condiciones in vitro, esto se ve reflejado en el aumento en la tasa de proliferación.

El análisis de varianza muestra que no hay diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Cuadro No. 12).

En los resultados obtenidos puede observarse que hubo un incremento en el desarrollo de bulbos de 1.24 bulbos por explanto.

Los tratamientos que en la primera fase tuvieron promedios bajos en esta fase aumentó su tasa de proliferación, sin embargo, en el tratamiento 6 que fue el mejor de la fase anterior mantuvo su promedio en el desarrollo de bulbos.

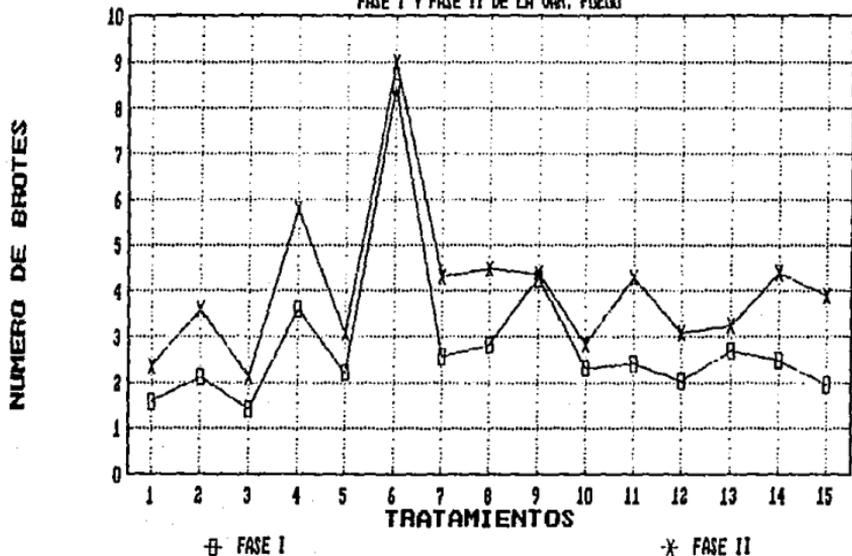
En la figura No. 6, se puede observar la comparación de medias de la fase I y la fase II en cuanto al promedio de brotes por tratamiento.

CUADRO No 12 ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE BROTES
EN LA FASE DE PROLIFERACION

FV	GL	SC	CM	FC	FT
TRAT	14	175.57	12.54	1.44	ns1.83
ERROR	105	909.56	8.66		ns2.34
TOTAL	119	1085.13			

FIGURANO. 6

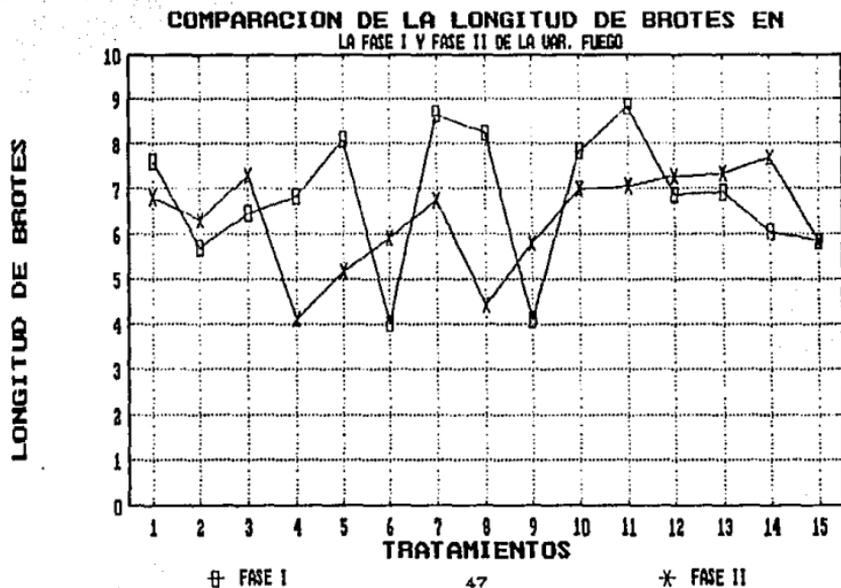
COMPARACION DEL NUMERO DE BROTES EN LA
FASE I Y FASE II DE LA UAR, FUEGO



5.2.2. - LONGITUD DE BROTES.

En la fase I está variable no tuvo una diferencia significativa, por lo que se considero no necesaria la realización de la cuantificación de esta variable en la fase II. En la figura No. 7 se puede observar la comparación de medias de las dos fases, en donde se puede observar que hay un incremento en la longitud de brotes en los tratamientos 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15 y una disminución en los tratamientos 1, 2, 3, 6, 9, 13, 14 y los que se mantuvieron casi igual 13 y 15. Esto afirma que hay una relación indirecta en cuanto al número de brotes y la longitud de los mismos, es decir que a mayor número de brotes menor sera su longitud.

FIGURA No 7



5.3. - OBSERVACIONES INDIRECTAS QUE NO SE CUANTIFICARON.

5.3.1. - EMISION DE RAIZ.

La emisión de raíces se observó a las tres semanas de ser implantados los explantos en todos los tratamientos de la fase I. Por lo que no se hace necesario establecer o indicar un medio de cultivo propicio para la fase de enraizamiento.

5.3.1. - CALIDAD DEL BULBO.

En el tratamiento No. 7, el medio de cultivo estuvo suplementado con 0.5 mg/Lt de ANA y 0.0 mg/Lt de K, se tuvo un promedio de 2.57 brotes por explanto y una longitud de 8.24 cm. El promedio del número de brotes es bajo pero el bulbo tiene mayor diámetro que en los demás tratamientos.

En todos los tratamientos los bulbos están morfológicamente bien diferenciados, aunque su diámetro sea menor en comparación con los bulbos del tratamiento No. 7.

Para completar el desarrollo de un bulbo después de haberse aclimatado in vivo debe romperse la dormancia del bulbo, esto se puede realizar aplicando GA₃ y/o sometiendo los a horas frío, esto con la finalidad de bajar la concentración del Acido Abscisico que es un inhibidor del desarrollo vegetativo de la planta.

VI. - CONCLUSIONES

- 1.- La parte vegetal utilizada (bulbillos), resultó ser eficiente bajo el esquema de la propagación in vitro.
- 2.- El método de esterilización nos dio como resultado una un nulo índice de contaminación que fue del 0%, que es una respuesta satisfactoria para el establecimiento.
- 3.- El Acido naftalenácetico (ANA) promueve la formación de bulbillos adventicios, suplementado al medio de cultivo en una dosis de 0.1 mg/Lt.
- 4.- El medio de cultivo suplementado con Kinetina a una dosis de 0.5 mg/Lt induce a la formación de bulbillos mg/Lt.
- 5.- La suplementación al medio de cultivo con 0.5 mg/Lt de K y 0.1 mg/Lt de ANA, está combinación resultó ser la mejor dosis para la proliferación.
- 6.- En la longitud de los brotes, no se tuvo una respuesta significativa en las diferentes combinaciones de reguladores.
- 7.- En los siguientes sub-cultivos hubo un aumento en la tasa de proliferación.
- 8.- El medio de cultivo suplementado con 0.5 mg/Lt de ANA, el explanto tiene una respuesta favorable al diametro del bulbilllo.
- 9.- La emisión de raíces se observó en todos los tratamientos por lo que no es necesario establecer una fase de enraizamiento.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ammirato P.V. et al; 1990; Handbook of plant cell culture; Vol. 5; Ornamental Species; McGraw-Hill publishing Company; USA.
- 2.- Arellano O.G. y González B.S.; 1985; El efecto del recipiente, intensidad de luz y microambiente en el establecimiento a suelo de *Fragaria x anassa Dush* y *Prunus cerastifera*, obtenidas in vitro; Tesis profesional; UNAM; FES-C; Cuautitlán Edo. México.
- 3.- Centro Internacional de Bulbos de flores; El Liliium como flor cortada en zonas sub-tropicales; Hillegom Holanda.
- 4.- Centro Internacional de Bulbos de flores; Manual para la elección de variedades de bulbos de flor; Hillegom Holanda.
- 5.- Cronquist A.; 1977; Introducción a la Botánica; Compañía Editorial Continental S.A.; México.
- 6.- Cruz P.F., 1983; Propagación in vitro de Manzana (*Malus plumillanill*); Tesis profesional; FES-C - UNAM; Cuautitlán Edo de México.
- 7.- Duran G.J.; 1993; Cultivo in vitro de *Cordylone terminalis* a partir de segmentos nodales; Tesis profesional; FES-C - UNAM ; Cuautitlán Edo de México.
- 8.- Ellison W.T. et al; 1980; Botánica; Editorial Limusa; México D.F.
- 9.- Gamborg O.L. et al; 1976; Plant tissue culture media; In vitro 12:473-478.
- 10.- Gary L.M.; 1982; Ornamental horticulture; Editorial Reston publishing company; USA.

- 11.- Hartmann T.H. et al; 1975; Propagación de plantas: (Principios y prácticas); Edit. Continental; México D.F.
- 12.- Hartmann T.H et al; 1988; Plant Science Growth development and utilization of cultivate plants; Edit. Prince Hall; New Jersey.
- 13.- Hary M.T.; 1975; Growing and propagating; Edit. Richie Bell and Ken Moore; USA; p 188-190.
- 14.- Hessayon D.G.; 1985; Flores de jardín: Manual de cultivo y conservación; Edit. Blu ; Barcelona España.
- 15.- Hurtado M.D. y Merino M.E.; 1987; Cultivo de Tejidos Vegetales; Editorial Trillas; México D.F.
- 16.- Hussey G.; 1977; In vitro propagation of some members of the liliaceae, iridaceae and amaryllidaceae; Acta Horticulturae 78:303-307.
- 17.- Kyle L.; 1987; Plants from test tubes and introduction to micropropagation; Edit. Timber Press; Portland USA.
- 18.- Larson R.A; 1988; Introducción a la floricultura, Edit. AGT, México D.F.
- 19.- Matsuo E. et al; 1988, Asexual propagation of variegated *Lilium longiflorum* charato. *Scientia horticulturae* 39: 349-354.
- 20.- Murashige T; 1974; Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*
- 21.- Novak F.J. and Petru E; 1981; Tissue culture propagation of *lilium* hybrids; *Scientia Horticulturae* 14: 191-199.
- 22.- Pierik R.L.M; 1990; Cultivo in vitro de las plantas superiores, Edit. Mundi-prensa, Madrid, España.

- 23.- Rosell H.C. y Villalobos A.V; 1991; Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Edit. FAO, Roma Italia.
- 24.- Rees A.R. and Hanks G.R; 1979; Potential uses of plant growth regulators in bulb growing and forcing. Acta Horticulturae 91: 153-159.
- 25.- Rivadeneyra H.V. and Murashige T; 1971; Cultivo de tejidos vegetales in vitro en la familia Liliaceas. Investigaciones Agropecuarias 22: 19-22.
- 26.- Ruiz O.M, 1979; Tratado Elemental de Botanica. Edit. ECLALSA, México D.F.
- 27.- Salinger P.J. 1987; Commercial flower growing. Edit. Butter Worths horticultural books, USA.
- 28.- Sanchez S.O; 1984; La flora del Valle de México. Edit. Herreros, México, D.F.
- 29.- Sheridan W.F; 1968; Tissue culture of the monocot Lilium. Planta 82: 189-192.
- 30.- Simmonds J.A. and Cumming B.G; 1977; Bulb-dip application of growing-regulating chemicals for inhibiting stem elongation of enchantment and harmony lilies. Scientia Horticulturae 6: 71-81.
- 31.- -----; 1976; Propagation of liliium hybrids I dependence of bublet production on time of scale removal and growth substances. Scientia horticulturae 5 :77-83.

32. - -----; 1976; Propagation og liliu
hybrds II production po plantlets from bulb-scale callus
cultures for increased propagation rates. *Scientia
Horticulturae* 5 : 161-170.
33. - Stirmart P.D and Ascher D.P; 1978; Tissue culture of
bulb-scale sections for asexual propagation of liliu
longiflorum Thunb. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103(2): 182-184.
34. - Soroa J y Pineda M. 1969; *Jardinera y Decoración vegetal*.
Edit. Dossart S.A. Madrid, España.
35. - Van Aartrijk and Blom-Barnhoorn G.J; 1981; Growth regulator
requeriments for adventitious regeneration from liliu
bulb-scale tissue un vitro, in relation to duration of bulb
storage and cultivar. *Scientia Horticulturae* 14: 261-268.
36. - ----- ; 1980; Effects of
sucrose, mineral salts, and some organics substances on the
adventitious regeneratium in vitro of plantlets from
bulb-scale tissue of liliu speciosum. *Acta Horitculturae*
109 : 297-302.
37. - Yong Qu et al; 1988; Phenotypic and cytological variation
among plants derived from anther cultures of liliu
longiflorum. In vitro cellular and developmental Biology,
vol 24 num. 5 (471.476).
38. - Zimmermann R.H. and Debergh P.C; 1981; Micropropagation
technology and application. Edit Kluwers Academic Publisher,
Netherlands.