



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
GUAUTITLAN

12
Lej

REGENERACION DE PLANTULAS DE ANTURIO
(*Anthurium andromum* Lind.) A DIFERENTES
NIVELES DE CITOCININA: 6-BENCILAMINOPURINA,
IN VITRO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A ;
ARTURO GARCIA PEREZ

ASESOR: ING. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
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:

"Regeneración de plántulas de anturio (Anthurium andreaeanum Lind.)

a diferentes niveles de citocinina: 6-bencilaminopurina, in vitro".

que presenta el pasante García Pérez Arturo
con número de cuentas: 8436344-8 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniero Agrícola.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN 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 28 de Agosto de 1996.

PRESIDENTE	<u>Biol. Elva Martínez Olguín</u>	
VOCAL	<u>Ing. Francisco Cruz Pizarro</u>	
SECRETARIO	<u>Ing. Guillermo Basante Butrón</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. César Maycotte Morales</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Roberto Guerrero Agama</u>	

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Juan García Vargas y Margarita Pérez Hernández.
Con todo mi cariño y respeto. Porque gracias a ustedes he llegado a este momento tan importante para mí. Gracias por el apoyo incondicional que me han dado en todo momento, por escucharme, guiarme y alentarme día con día para seguir superándome.

A MIS HERMANOS (AS):

Concepción, Gabriel, Rosa, Cecilia, Juan y Sara.
En agradecimiento por ser como son, su apoyo y consejos, porque he aprendido cosas importantes de cada uno de ustedes, que me han servido en momentos claves de mi vida, y como una invitación a que nunca desistan hasta alcanzar las metas trazadas

A MIS CUÑADOS Y SOBRINOS:

Por todo lo que han aportado a mi familia.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

A ustedes que con su ayuda me brindaron un fuerte impulso para lograr este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por darme la oportunidad de mi formación profesional.

Al Ing. Francisco Cruz Pizarro, por su gran apoyo, dirección y valiosa orientación para realizar este trabajo de tesis.

A los profesores que integran el jurado:

BIol. Elva Martínez Olgin, Ing. Guillermo Basante Butrón, Ing. Cesar Maycotte Moreles e Ing. Roberto Guerrero Agama, por la revisión y acertadas sugerencias para el mejoramiento del presente trabajo.

Al Ing. Jesús Vleyra Ramírez e Ing. Margarita Plancarte Margarito.

Por su valiosa y desinteresada cooperación para el desarrollo de este trabajo en laboratorio.

A todas aquellas personas que de una u otra forma participaron para lograr este trabajo.

CONTENIDO

	Pag.
Índice de cuadros	iv
Índice de figuras	v
RESUMEN	vi
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVOS	3
III.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Generalidades de la especie	4
3.2. Origen e historia del cultivo	4
3.3. Importancia económica	5
3.4. Clasificación taxonómica	6
3.4.1. Descripción botánica y fisiología	7
3.5. Propagación de anturio	9
3.5.1. Reproducción sexual	9
3.5.2. Multiplicación asexual	10
3.6. Cultivo <i>in vitro</i>	11
3.6.1. Definición	11
3.6.2. Generalidades del cultivo <i>in vitro</i>	11
3.6.2.1. Métodos básicos de cultivo de tejidos	12
3.6.2.2. Etapas de propagación de plantas por cultivo de tejidos	12

3.6.3. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> en anturio	14
3.6.4. Medio de cultivo	16
3.6.4.1. Sales minerales	18
3.6.4.2. Vitaminas	19
3.6.4.3. Azúcares	20
3.6.4.4. Agentes gelificantes	20
3.6.4.5. pH	21
3.6.4.6. Reguladores de crecimiento	21
3.6.4.6.1. Auxinas	22
3.6.4.6.2. Citocininas	23
3.6.5. Establecimiento aséptico del cultivo	24
3.6.6. Morfogénesis y regeneración de explantos	25
3.6.6.1. Inducción de callo	28
3.6.6.2. Cultivo de callos	30
3.6.6.3. Regeneración de brotes	31
3.6.6.4. Formación de raíces adventicias	35
3.6.7. Condiciones de cultivo	37
3.6.7.1. Luz e intensidad lumínica	37
3.6.7.2. Temperatura	38
3.6.7.3. Humedad relativa	38
3.6.8. Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	38
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	40

4.1. Ubicación del experimento	40
4.2. Material vegetal empleado	40
4.3. Medio de cultivo	40
4.4. Desinfección del material vegetal	41
4.5. Implantación del material vegetal	41
4.6. Condiciones de incubación	42
4.7. Fechas de siembra	42
4.8. Diseño experimental	42
4.9. Toma de datos	43
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
5.1. Porcentaje de contaminación	44
5.2. Formación de callo	45
5.3. Número de brotes	48
5.4. Longitud de brotes	51
5.5. Longitud de raíz	54
VI.- CONCLUSIONES	57
VII.- BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE CUADROS

No.		Pag.
1	Taxonomía del anturio	6
2	Investigaciones de cultivo <i>in vitro</i> en anturio	14
3	Medio de cultivo de Murashige y Skoog	17
4	Diseño experimental	43
5	Análisis de varianza para diámetro de callo	47
6	Comparación de medias en diámetro de callo	47
7	Análisis de varianza para número de brotes	50
8	Comparación de medias en número de brotes	50
9	Análisis de varianza para longitud de brotes	52
10	Comparación de medias en longitud de brotes	53
11	Análisis de varianza para longitud de raíz	55
12	Comparación de medias en longitud de raíz	55

ÍNDICE DE FIGURAS

No.		Pag.
1	Planta típica de anturio y sus partes	8
2	Morfogénesis en anturio	27
3	Porcentaje de contaminación	45
4	Diámetro de callo por explanto	48
5	Número de brotes por explanto	51
6	Longitud de brotes por explanto	53
7	Longitud de raíz por explanto	56

RESUMEN

El anturio (*Anthurium andreanum* Lind.) es una planta ornamental que se cultiva tanto para flor de corte como para maceta.

En la propagación del anturio a través de los métodos tradicionales *in vivo*: hijuelos, esquejes y división de plantas se obtienen alrededor de 8 plantas por año. Por lo tanto, en el presente trabajo se investigó la alternativa de la propagación *in vitro*, con la perspectiva de acelerar el proceso de multiplicación, teniendo como objetivos evaluar el efecto de la citocinina 6-bencilaminopurina (BA) a diferentes niveles sobre la regeneración de plántulas y determinar la concentración óptima de BA para lograr la mejor proliferación de brotes, utilizando como explanto secciones de plántulas obtenidas asépticamente a partir de semillas inmaduras, estableciéndose en el medio de cultivo de Murashige y Skoog al 50% con los macronutrientes al 50% de su concentración, adicionado con 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/l de BA más 0.1 mg/l de ácido indol butírico (AIB).

Los resultados obtenidos indican que el mejor tratamiento para lograr una rápida regeneración de plántulas fue el número 2, con una concentración de 0.5 mg/l de BA más 0.1 mg/l de AIB, lográndose la mayor formación de callo con 1.24 cm de diámetro en promedio, y 11.14 brotes por explanto con una longitud de 0.94 mm. El enraizamiento de los brotes sólo fue posible en niveles de 0.5 a 1.0 mg/l de BA más 0.1 mg/l de AIB. La obtención de plántulas completas de *Anthurium andreanum* se logró en 12 semanas desde el establecimiento del explanto hasta en enraizamiento.

**La presente investigación forma parte de la:
"Catedra de Tecnología e Investigación en
Micropropagación Vegetal".**

**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
Departamento de Ciencias Agrícolas.
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.**

I.- INTRODUCCIÓN

Los anturios son plantas ornamentales cultivadas tanto para flor en maceta como para flor de corte. Están consideradas como flores de especialidad junto con las orquídeas, aves del paraíso y heliconas.

Las flores de anturio con sus variados colores en forma de corazón tienen demanda en el mercado nacional e internacional por la atractiva vistosidad con que adoman los arreglos; las flores rojas son las de mayor demanda y las más cultivadas, pero las rosadas, anaranjadas, blancas y bicolors son también muy apreciadas. La durabilidad de estas flores, su belleza y su valor, hacen que este cultivo tenga un potencial para cultivarse en el trópico mexicano (Murguía, 1993).

Sin embargo, la producción de anturios aún se encuentra limitada por varios factores. Los métodos tradicionales de propagación *in vivo*: hijuelos, esquejes y división de plantas, o bien son insuficientes para las necesidades reales (demasiado lentos, difíciles o incosteables) o a veces son completamente inviables (Pierik *et al.*, 1974; Kuniaki, 1980; Finnie y van Staden, 1986; Pierik, 1990).

Así mismo, la reproducción por semilla es bastante laboriosa, su viabilidad es muy corta y existe variación en la progenie (Pierik *et al.*, 1974; Geier, 1986; Geier, 1990).

La propagación por medio del cultivo *in vitro* es una alternativa para propagar clonalmente plantas con características deseables o para selección de nuevos cultivares.

A pesar del grado de aplicabilidad llevado a cabo en *A. andreaeanum*, aún existen observaciones críticas acerca de la eficiencia en las técnicas de micropropagación, sobre

todo en la etapa de establecimiento; aquí hay una notable proporción de materiales vegetales, los cuales no pueden ser inducidos a regenerar o en los cuales el crecimiento es lento e inconsistente para la propagación a gran escala (Geier, 1990).

La finalidad de esta investigación es evaluar la influencia de la citocinina BA, en combinación con la auxina AIB, sobre el crecimiento y desarrollo de los explantos de A. andreaum, para alcanzar una mayor eficiencia en la obtención masiva de plantas.

II.- OBJETIVOS

2.1.- EVALUAR EL EFECTO DE LA CITOCININA 6-BENCILAMINOPURINA A DIFERENTES NIVELES EN LA REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS DE ANTURIO

(*Anthurium andreamum* Lind.).

2.2.- DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CITOCININA PARA LA REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS DE ANTURIO.

III.- REVISIÓN DE LITERATURA.

3.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE.

Con aproximadamente 600 especies distribuidas en los trópicos de América, el género *Anthurium* constituye el más grande de la familia Araceae. Varias especies se cultivan como ornamentales en jardines botánicos, colecciones privadas o a gran escala comercial (Geier, 1990). *A. crystallinum* Lind. et André y algunas otras especies tienen su valor ornamental por las hojas decorativas; se les encuentra en el mercado en pequeñas cantidades. Por mucho, las especies más populares y económicamente importantes son *A. andreanum* Lind. y *A. scherzerianum* Schott, ambas poseen atractivas y duraderas inflorescencias (Geier, 1990).

A. andreanum es originario de Colombia y se introdujo a Europa en 1876 (Geier, 1990; Higaki y Watson, 1972).

3.2. ORIGEN E HISTORIA DEL CULTIVO.

Los anturios comerciales para flor de corte (*Anthurium andreanum*) nativos de Colombia (Graf, 1974; Higaki y Watson, 1972), fueron introducidos a Hawai procedentes de Londres en 1889 (Higaki y Watson, 1972); en las islas se empezaron a cultivar, y después de mucho tiempo de hibridación a partir de tonos rosas, se obtuvo una amplia gama de colores (Higaki y Watson, 1972). A mediados de siglo, los holandeses comenzaron también un programa de mejoramiento que junto con los hawaianos en la actualidad son los principales productores de variedades.

En México no se tiene una fecha precisa de cuándo fueron introducidos éstos, pero se cree que en la década entre 1930 y 1940, se empezaron a cultivar a nivel de traspatio, o como planta de interior en la región de Fortín de las Flores, Veracruz (Murguía, 1991).

3.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA.

A. andreaeanum se cultiva casi exclusivamente para la producción de flor de corte (Geier, 1990). En el mundo, los principales productores son Estados Unidos con 200 hectáreas en Hawaii (Hara; Nishijima; *et al* 1989); Holanda con 60 hectáreas; Italia; Alemania; España (Saenz, 1992); Tahiti; Filipinas; Brasil; Venezuela y Colombia (Alvarez, 1991).

En Hawaii el *A. andreaeanum* es el cultivo más importante como flor de corte; el valor de las flores producidas en 1986 fue de 9.9 millones de dólares (Geier, 1990).

En México, se estima que se cultivan 10 hectáreas para flor de corte (Murguía, 1993), siendo los principales estados productores: Veracruz, en Fortín de las Flores, Córdoba y Coatepec; Morelos, en Cuernavaca; Colima y Querétaro.

En el país, en 1992 una docena de flores de anturio llegó a valer N\$ 250.00 (Saenz, 1992), y partiendo de que una hectárea puede producir 500 mil flores al año (Arellano, 1991), se deduce que los rendimientos económicos son bastante halagadores, aunque los costos de producción son también elevados.

Sin embargo, la producción nacional surte un mercado nacional insatisfecho, lo que hace que se importen flores básicamente de Holanda (Murguía, 1991; Murguía, 1993).

3.4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Los anturios pertenecen a la familia Araceae, subfamilia Pothoideae (Cuadro 1), y son del género *Anthurium* (Croat, 1983). Este género cuenta con más de 600 especies (Geier, 1990), distribuidas desde el norte de México y las Grandes Antillas, hasta el sur de Brasil, norte de Argentina y Paraguay; tan sólo en México y Centroamérica en forma silvestre hay aproximadamente 219 especies del género *Anthurium* (Croat, 1983).

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Reino:	Vegetal
División:	Embriophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Monocotyledoneae
Orden:	Espathiflorae
Familia:	Araceae
Subfamilia:	Pothoideae
Género:	<i>Anthurium</i>
Especie:	<i>A. andreanum</i>
FUENTE: Bailey, 1977; Croat, 1983	

Dentro del género *Anthurium* se encuentran entre otras, las siguientes especies (Graf, 1974; Sheffer y Kamemoto, 1979):

A. andreanum = Es la especie más importante desde el punto de vista económico, y es donde están la mayoría de las variedades comerciales; tienen espatas o brácteas grandes.

A. scherzerianum = Segunda especie en importancia económica, se caracteriza por tener hojas más pequeñas, no acorazonadas, tienen brácteas rojo-naranja o blancas con manchas rojo-naranja y espádice largo y helicoidal.

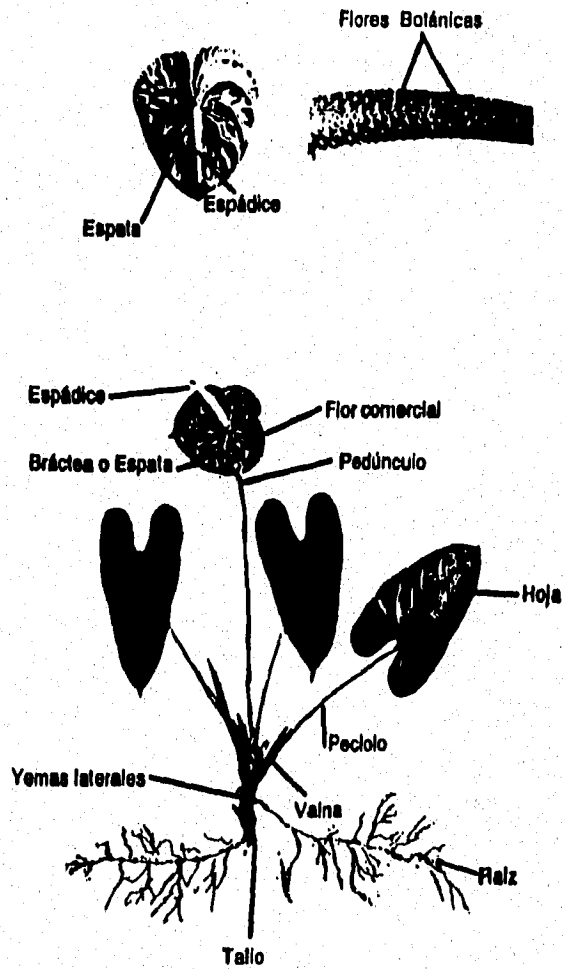
A. crystallinum = De hojas grandes, acorazonadas y rayado blanco, son plantas bellas por su follaje.

3.4.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y FISIOLÓGICA.

La planta de anturio es perenne con una vida productiva de varios años, es herbácea y monocotiledonea (Higaki, Rasmussen y Carpenter, 1984).

La raíz es fibrosa, cilíndrica, de consistencia carnosa, no profundiza mucho, blanca, con producción de raíces adventicias. El tallo es caulinar, monopódico, simple, herbáceo cuando joven y semi-leñoso cuando adulto, llega a crecer hasta 1.5 m. (Higaki, Rasmussen y Carpenter, 1984). Las hojas son grandes, anuales, de 30 cm. de longitud por 20 cm. de ancho, de peciolo largo y color verde brillante, de ápice agudo y base cordiforme, el borde es liso, con una disposición alternada en el tallo, el peciolo de la hoja es envuelto por una vaina inserta en el tallo (Bailey, 1977; Higaki, Rasmussen y Carpenter, 1984). El tallo principal produce de 3 a 8 hojas por año dependiendo de su nutrición, ambiente y variedad (Figura 1). Las flores están agrupadas en una inflorescencia en forma de espádice, éste es de unos 9.5 cm. aproximadamente, grueso, de colores amarillo, blanco, verde, rojizo, con aproximadamente 300 florecillas diminutas, las cuales son blancas, hermafroditas, con 1 ovario, 2 carpelos y 4 anteras. El perianto consiste de 4 pétalos carnosos. Cuando madura la flor, el estigma aparece con una protuberancia redondeada en el espádice; cuando están listos para ser polinizados aparecen húmedos y brillantes.

FIGURA 1. PLANTA TÍPICA DE ANTURIO Y SUS PARTES.



Fuente: Murguía, 1993

El espádice está cubierto por una gran hoja modificada llamada espata o bráctea de colores vistosos como rojo, naranja, blanco, rosado, café, colores combinados y, diferentes tonalidades de los colores anteriores (Higaki, Rasmussen y Carpenter, 1984; Higaki y Watson, 1972).

3.5. PROPAGACIÓN DE ANTURIO.

En principio las plantas se pueden multiplicar de dos maneras: vegetativamente (de forma asexual, también llamada clonado), y de forma generativa (sexualmente, por semillas). Los dos tipos de propagación pueden ser imposibles en determinadas condiciones. Cuando la multiplicación sexual no es satisfactoria (no se forman semillas, se forman muy pocas, o las semillas pierden rápidamente su capacidad germinativa), se suele buscar la multiplicación vegetativa. (Pierik, 1990).

3.5.1. REPRODUCCIÓN SEXUAL.

Convencionalmente, los anturios son propagados por semillas. *A. andreanum* y *A. scherzerianum* son una mezcla de especies con flores protogineas. A pesar de que las plantas son compatibles, usualmente se prefiere la polinización cruzada entre plantas seleccionadas, en la producción comercial de semillas. El tiempo requerido desde la polinización a la maduración de las semillas es de 6 a 7 meses para *A. andreanum* y de 10 a 12 meses para *A. scherzerianum*. Las semillas no pueden ser almacenadas y por eso se deben sembrar inmediatamente. (Geier, 1990).

La propagación por semilla es un método largo que toma de 1-1/2 a 3 años para que las plantas florezcan, y los cultivares no se reproducen con fidelidad por semillas (Higaki y Watson, 1972).

3.5.2. MULTIPLICACIÓN ASEXUAL.

Una forma común de propagar plantas es por métodos asexuales. Para propagar plantas asexualmente se usan porciones de éstas como estacas, rizomas, tubérculos, etc., que pueden dar origen a nuevos individuos. La propagación asexual asegura que las plantas derivadas de una planta inicial tengan la misma información genética para constituir un clon y conservan las mismas potencialidades productivas de la planta inicial. (Hartman y Kestner, 1988).

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).

La propagación de anturios se realiza con vástagos, con raíces aéreas del tallo principal o esquejes terminales de 2 o 3 hojas, enraizados bajo rocío intermitente (Hartmann, Kester, y Davis, 1990).

El anturio se puede propagar por métodos *in vitro* usando un explanto de yema vegetativa (Kunisaki, 1980).

3.6. CULTIVO *IN VITRO*.

3.6.1. DEFINICIÓN.

La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street, 1977; citado por Navarro y Vera, 1994).

3.6.2. GENERALIDADES DEL CULTIVO *IN VITRO*.

La propagación *in vitro*, micropropagación o cultivo de tejidos es uno de los sistemas de multiplicación de plantas en forma asexual que en la actualidad ofrece una serie de ventajas sobre los sistemas tradicionales de propagación (estacas, estolones, tubérculos, rizomas y bulbos) (Murashige, 1978; citado por Cruz, 1983).

La propagación clonal de plantas por cultivo de tejidos se basa en el principio de que toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo, y para que la célula pueda expresar este potencial es necesario que se le proporcionen las condiciones ambientales adecuadas, utilizando principalmente medios nutritivos de composición definida en recipientes de vidrio y condiciones asépticas en todas las etapas de propagación. Estas condiciones han sido agrupadas de la forma siguiente:

- a) Condiciones químicas o medio de cultivo: compuestos inorgánicos como macronutrientes y micronutrientes; compuestos orgánicos como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, complejos orgánicos y sustancias de soporte físico como agar.
- b) Condiciones físicas: temperatura, iluminación, humedad relativa y gases atmosféricos.

3.6.2.1. MÉTODOS BÁSICOS DE CULTIVO DE TEJIDOS.

Bengochea y Dodds (1983) mencionan seis métodos básicos de cultivo de tejidos por los que puede ser propagada una planta:

a) Cultivo de callos y de células en suspensión, b) Cultivo de órganos, c) Cultivo de embriones, e) Cultivo de anteras y polen y, f) Cultivo de células en aislamiento y protoplastos.

3.6.2.2. ETAPAS DE PROPAGACIÓN DE PLANTAS POR CULTIVO DE TEJIDOS.

Murashige (1974) describió un esquema de propagación *in vitro* estableciendo una serie de cuatro etapas; posteriormente fue revisado por Debergh y Maene (1981) para considerar cinco etapas de propagación en base a la experiencia obtenida en laboratorios comerciales:

ETAPA 0. Preparación de plantas madre bajo condiciones higiénicas.

Se ha enfatizado que hay un gran potencial para la dispersión de patógenos sistémicos en plantas propagadas vegetativamente y que la condición fisiológica de las plantas madre determina la respuesta en el medio de cultivo, por lo que el objetivo de esta etapa es proporcionar material vegetativo en situación sanitaria adecuada que ayude a reducir la contaminación durante la etapa de establecimiento de cultivos asépticos.

ETAPA I. Establecimiento de un cultivo aséptico.

Al establecer tejidos vegetales en el medio de cultivo se busca que este sea aséptico. En esta etapa puede ocurrir un alargamiento de brotes apicales, enraizamiento de brotes, proliferación de callos, etc. El objetivo principal es que el cultivo sea establecido libre de

contaminación por microorganismos, que una adecuada proporción de los explantos sobrevivan al cultivo y que tengan un rápido crecimiento.

ETAPA 2. Multiplicación de propágulos.

Se busca que produzca un rápido incremento de órganos y otras estructuras, las cuales posteriormente pueden dar origen a plantas. El incremento puede ser obtenido por inducción de órganos adventicios, formación de embriones o por incremento de brotes axilares.

ETAPA 3. Preparación para restablecimiento de plantas en suelo.

El objetivo es preparar a los propágulos para una exitosa transferencia a suelo por lo que en esta etapa se considera:

- a) El enraizamiento de los brotes (en algunas especies).
- b) Crecimiento de los brotes.
- c) Endurecimiento de las plantas para impartir alguna tolerancia a tensión de humedad.
- d) Obtención de cierto grado de resistencia a ciertos patógenos.
- e) Conversión de las plantas de un estado heterotrófico a un autotrófico.

Los cultivos de la etapa 3 frecuentemente son llevados a invernadero para endurecimiento y para ayudar a reducir dificultades en la transferencia de *in vitro* a *in vivo* (Sagawa y Kunisaki, 1990).

ETAPA 4. Enraizamiento *in vivo* y aclimatación.

La aclimatación es necesaria para plantas producidas *in vitro*. La aclimatación se define como el proceso por el cual un organismo se adapta a un cambio ambiental. La transferencia de plantas o brotes de medio de cultivo a un sustrato para enraizamiento y

aclimatación debe considerar el uso de mezclas de enraizamiento esterilizadas, uso de sombras parciales y de alta humedad relativa por algunos días.

3.6.3. ANTECEDENTES DEL CULTIVO *IN VITRO* EN ANTURIO.

Pierik *et al.* (1974) iniciaron la propagación de *A. andreaum* por cultivo de tejidos (Ver cuadro 2). Este método descrito en 1976 por Pierik se basó en la formación de callos sobre explantos de hoja, en el subcultivo de callos, en la regeneración de brotes adventicios y, en el corte de brotes de raíz.

Igualmente, Ferzing y Lutz (1977) (citados por Soczek y Hempel, 1989), Keller *et al.* (1986) utilizaron el subcultivo de callos como base de la micropropagación de *Anthurium andreaum*.

Kunisaki (1977, 1980) estimuló la organogénesis en *A. andreaum* utilizando brotes desarrollados de yemas axilares y llevó al cabo su proliferación.

Rosario y Lapitan (1981) (citados por Geier, 1990) indujeron la regeneración de plantas via callo embrionario.

CUADRO 2. INVESTIGACIONES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN <i>ANTHURIUM ANDREANUM</i> .			
Especie	Explanto	Objetivos y Resultados	Referencia
<i>A. andreaum</i>	Embriones y tejidos inmaduros de plantas adultas (hoja, pecíolo, espata, pedúnculo).	Potencial morfogénético de varios tipos de explantos. Formación de callos, brotes adventicios de callos, enraizamiento de brotes.	Pierik <i>et al.</i> (1974a,b), Hauzinska (1976).
	Callos derivados de espata y de hojas.	Crecimiento de callo en cultivo líquido. Mejoramiento en los índices de crecimiento.	Pierik (1975).

CUADRO 2. (Continuación)

<i>A. andreaeanum</i>	Hoja	Mejoramiento del medio para inducción y multiplicación de callos, formación de brotes y enraizamiento de brotes. Efecto del NH ₄ NO ₃ sobre la formación de brotes.	Pierik <i>et al.</i> (1975). Pierik (1976).
	Hoja.	Reevaluación y evaluación de plántulas regeneradas vía callo. Efecto del genotipo en la regeneración.	Leffring <i>et al.</i> (1976a,b, 1977). Novak y Nepustil (1980).
	Hoja, pedúnculo, espata.	Estudio comparativo sobre inducción de callos, formación de brotes adventicios y enraizamiento de brotes.	Ferzing y Lutz (1977).
	Hoja.	Mejoramiento de los métodos de micropropagación utilizando la proliferación de brotes.	Leffring y Soede (1978, 1979a,b).
	Hoja.	Efecto del NH ₄ , las citocininas y la luz en la formación de brotes adventicios de callo primario.	Pierik <i>et al.</i> (1979).
	Yemas axilares.	Método de micropropagación (no se dan detalles).	Holdgate (1977).
	Yemas axilares.	Método de micropropagación usando proliferación de brotes.	Kunizaki (1977, 1980).
	Semillas.	Regeneración de plántulas vía callo embrionario.	Rosario y Lapitan (1981).
	Hoja.	Uso de un estabilizador celulósico en el medio como sustituto del agar.	Keller <i>et al.</i> (1986).
	Hoja, peciolo, espata, espádice, raíz.	Efecto del medio y la luz sobre el callo y la regeneración de brotes.	Finnie y van Staden (1986).

Fuente: Geier, 1990.

3.6.4. MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo es uno de los factores esenciales para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales en la propagación *in vitro*. (Murashige, 1974).

Los nutrientes, como elementos básicos de un medio de cultivo, se componen de una mezcla balanceada de macro y micronutrientes inorgánicos (sales de cloruros, nitratos, sulfatos, fosfatos, además de iones de calcio (Ca), Magnesio (Mg), Potasio (K), Sodio (Na), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn) y boro (B); y compuestos orgánicos (vitaminas, aminoácidos y carbohidratos) (López, 1985).

Cada especie, cada órgano, tiene probablemente, según su estado fisiológico, requerimientos nutricionales diferentes (Margara, 1988). La búsqueda de las necesidades para cada especie es una tarea ardua y muy difícil. Esto ha hecho que ciertos medios propuestos por diferentes autores, y que han dado una respuesta satisfactoria de crecimiento, hayan sido aceptados con ligeras variantes y generalizado su uso. (Guevara, 1987a).

Algunos medios de cultivo de uso general se mencionan a continuación:

a) Murashige y Skoog o MS (1962). Inicialmente desarrollado para el cultivo de callos en tabaco, ha probado ser muy exitoso en muchas especies con ligeras modificaciones. Presenta concentraciones altas de nitrato y amonio lo que permite su uso en cultivo de meristemos y estudio de organogénesis. Es probablemente el medio más utilizado. (Cuadro 3).

b) Medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Desarrollado inicialmente para el cultivo de células de soja, su uso se ha generalizado en el cultivo de células. Presenta bajos contenidos de amonio.

c) Schemk y Hildebrandt (1972) (SH). Utilizado para la formación de callos tanto en monocotiledoneas como en dicotiledoneas.

d) Woody Plant Medium (Lloy y Mc Cown, 1980) (WPM). Aunque muy reciente, tiende a generalizarse para las plantas leñosas que han manifestado problemas en el medio MS por su alto contenido mineral. Su bajo contenido iónico lo hace adecuado para la segunda fase del cultivo.

CUADRO 3. MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962).			
SALES INORGÁNICAS			
MACRONUTRIENTES (mg/l)		MICRONUTRIENTES (mg/l)	
NH ₄ NO ₃	1650	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	KI	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Na ₂ - EDTA	37.3	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
COMPUESTOS ORGÁNICOS			
Myo-inositol	100 mg/l	Glicina	2.0 mg/l
Ac. Nicotínico	0.5 mg/l	Sacarosa	30 gr./l
Piridoxina	0.5 mg/l	Agar	6.0 gr./l
Tiamina	0.1 mg/l		
Fuente: Gamborg, <i>et al.</i> , 1976.			

En la mayoría de las investigaciones del cultivo *in vitro* en Anthurium andreaeanum, el medio básico utilizado deriva de la fórmula MS (Geier, 1990).

Excepto Kunisaki (1977,1980) quién empleó el medio MS con las sales minerales al 100% de su concentración, los demás investigadores utilizaron básicamente el medio MS con los macronutrientes a la mitad de su concentración, ó inclusive menos concentrada, y los micronutrientes al 100%.

Pierik y colaboradores (1975) (citados por Geier, 1990) y Pierik (1976) iniciaron una serie de modificaciones al medio MS cambiando la concentración individual de las sales para las etapas sucesivas de inducción de callos, multiplicación y regeneración de plántulas en *Anthurium andreaeanum*.

Posteriormente, Lefring y Soede (1979) (citados por Geier, 1990) adoptaron esta secuencia en la modificación del medio básico; así como también Novak y Nepustil (1980) (citados por Geier, 1990).

Geier (1982) y Geier y Reuther (1991) (citados por Geier, 1990) utilizaron el medio modificado de Nitsch (1969); que tiene una composición similar al MS, para cultivar tejidos en *A. scherzerianum*.

Lightbourn y Prasad (1990) utilizaron el medio básico de Nitsch (1969) para cultivar hojas de cuatro cultivares de *A. andreaeanum*.

Para cultivar explantos de espádices y segmentos de hoja de *A. andreaeanum*, Foja y Sangama (1991) emplearon el medio modificado de Nitsch.

3.6.4.1. SALES MINERALES.

Los elementos necesarios para la vida de la planta se dividen en macronutrientes y micronutrientes:

a) Macronutrientes.

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además del carbono, oxígeno e hidrógeno, que forman cerca del 95% de la materia seca, los otros seis macronutrientes indispensables y más utilizados en el cultivo *in vitro* son: nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio. (López, 1985; Margara, 1988).

El nitrógeno, el fósforo y el azufre son constituyentes fundamentales de los tejidos vegetales (proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Los otros tres, intervienen en la conservación de los equilibrios iónicos en la planta y sus efectos son múltiples. (Margara, 1988).

b) Micronutrientes.

Los micronutrientes juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno y boro.

3.6.4.2. VITAMINAS.

Varias vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivo *in vitro* (Margara, 1988).

De todas las vitaminas empleadas, únicamente las del complejo B (tiamina, ácido nicotínico, Piridoxina HCL) son necesarias (Guevara, 1987a) y de éstas, sólo a la tiamina se le reconoce habitualmente un efecto neto, aportada generalmente a concentraciones de entre 0.1 y 1.0 mg/l. (Margara, 1988).

Un compuesto que frecuentemente se agrega a las vitaminas es el myo-inositol (no es propiamente una vitamina sino un azúcar-alcohol). Su efecto sobre la proliferación de tejidos

y eventualmente sobre la activación de la organogénesis es, en ocasiones muy claro. Puede emplearse a fuertes concentraciones (50 a 500 mg/l) (Guevara, 1987a; Margara, 1988).

3.6.4.3. AZÚCARES.

La mayoría de los cultivos *in vitro* son heterotróficos (Pierik, 1990), con respecto al carbono, debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica, y requieren de una fuente de carbohidratos para obtener la energía necesaria para su crecimiento y desarrollo (Guevara, 1987a; Margara, 1988).

La sacarosa es la fuente de carbohidratos de mayor uso en los cultivos, su concentración generalmente va de 1 a 5%. (Guevara, 1987a; Pierik, 1990). En ciertos casos se recomiendan otros azúcares como la glucosa o la fructuosa. Esto va a depender del cultivo y la especie.

Los azúcares están involucrados en los procesos de diferenciación celular, favoreciendo la formación de elementos vasculares y de la clorofila en los cultivos. (Margara, 1988).

3.6.4.4. AGENTES GELIFICANTES.

Muchos cultivos se desarrollan en un medio líquido sin necesidad de un soporte para el explanto. Si bien se logra crecimiento en algunos casos, casi nunca se observa organogénesis. Es así que en muchos cultivos se utiliza un medio líquido incorporando un puente de papel filtro sobre el cual se deposita el explanto (Guevara, 1987a).

Un agente gelificante que ha sido utilizado en forma casi unánime hasta el momento es el agar: una sustancia derivada de algas. La solidez del medio varía según la cantidad agregada, generalmente es de 7 a 8 gr./l. Esta va a variar según la pureza del compuesto y la fineza de su preparación. (Guevara, 1987a, Pierik, 1990).

Actualmente han sido propuestas otras sustancias gelificantes más puras como el Gel-rite, Bacto-agar Difco, Phytagar, etc.) pero su uso aún no es tan amplio como el agar. (Guevara, 1987a).

3.6.4.5. pH.

El pH del medio de cultivo debe ser tal que no altere la función de las membranas celulares o el sistema buffer del citoplasma (Guevara, 1987a). Se considera que un pH en el rango de 5.0-6.5 es apto para el crecimiento y desarrollo *in vitro*. (Pierik, 1990). Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones (Butenko, 1968; citado por Pierik, 1990):

a) La auxina AIA y el ácido giberélico se vuelven menos estables, b) el agar pierde su rigidez, c) algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitar, d) la vitamina B₁ y el ácido pantoténico se vuelven menos estables y e) se retarda la absorción de iones amonio.

3.6.4.6. REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en un lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades.

Aparte de estos productos naturales se han desarrollado otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores de crecimiento. (Pierik, 1990).

Actualmente, los reguladores de crecimiento se agrupan en cinco tipos básicos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. (Margara, 1988).

Los principios de la técnica de cultivo *in vitro*, así como su desarrollo posterior, reposaban en parte en el conocimiento y utilización de las auxinas. La expansión actual de las investigaciones sobre la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta o secuencial de auxinas y citocininas. (Margara, 1988).

La importancia de las giberelinas en el cultivo *in vitro* parece mucho menor (Margara, 1988) y generalmente este grupo de compuestos no se utiliza (Pierik, 1990).

El ácido abscísico (ABA) y los compuestos que desprenden etileno solamente se han utilizado en algún caso excepcional. (Margara, 1988).

3.6.4.6.1. AUXINAS.

Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales (Barba, 1994), generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias; inhiben la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente favorecen la embriogénesis en los cultivos en suspensión. (Pierik, 1990).

Las auxinas sintéticas y relativamente más activas que se añaden frecuentemente a los medios de cultivo son: ácido indol butírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). Se utilizan en concentraciones de 0.001 a 10.0 mg/l. (Pierik, 1990).

El ácido indol acético es una auxina que se produce de forma natural en las plantas, se agrega a los medios en concentraciones de 0.01 a 10.0 mg/l. (Pierik, 1990); pero tiene el inconveniente de degradarse fácilmente con la luz (Guevara, 1987b).

El AIA y el AIB son auxinas relativamente débiles, el ANA es una auxina fuerte, muy estable, utilizada especialmente para provocar la rizogénesis, el 2,4-D es una auxina muy fuerte que se hace tóxica para concentraciones elevadas y provoca la reacción hiperhídrica de los tejidos. Con frecuencia resulta poco eficaz sobre la organogénesis (Margara, 1988).

3.6.4.6.2. CITOCININAS.

Las citocininas promueven la división celular; generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo estimular en muy bajas concentraciones la iniciación del crecimiento de las raíces laterales; además inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas (Barba, 1994); actúan en el retraso de la senescencia, en la disminución de la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis (Guevara, 1987b; Pierik, 1990; Barba, 1994); ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o secciones de tallo (Barba, 1994).

La inducción *in vitro* de órganos por las citocininas está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción de citocininas alta con respecto a las auxinas (Barba, 1994).

Las citocininas que se utilizan con mayor frecuencia para estimular el crecimiento y el desarrollo *in vitro* son: 6-furfurilaminopurina (Kinetina), 6-bencilaminopurina (BA), 2-isopentiladenina (2iP) y 6-(4-hidroxi-3-metil-2-butenilamino)purina (Zeatina) (Margara, 1988; Pierik, 1990). La citocinina 6-bencilaminopurina se utiliza con frecuencia debido a su gran actividad y bajo costo (Margara, 1988).

3.6.5. ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO DEL CULTIVO

En 1990 Geier describe un método para la desinfección del material vegetal, con el fin de lograr un óptimo establecimiento de los cultivos *in vitro*, basado en la experiencia obtenida por Pierik *et al.* (1974), Kunisaki (1977, 1980), Pierik *et al.* (1979), y Geier (1986). El material vegetal se desinfecta en alcohol al 70% durante algunos segundos, seguida por una inmersión en solución de NaClO; hasta contener 15 g/l de cloro activo y suplementado con 0.5 ml/l de Tween 20. Las hojas tiernas son mantenidas en esta solución durante 10-15 minutos. Las inflorescencias con la espata aún cerrada son desinfectadas en la misma forma; después de eliminar la espata, el espádice es tratado nuevamente con una solución de NaClO. Igualmente, los explantos de yema después de ser extraídos, previamente desinfectadas las secciones nodales, así como también las semillas. La superficie de la semilla es esterilizada, después se disecciona y son nuevamente desinfectadas utilizando el mismo tratamiento aplicado a las hojas. La solución de NaClO tiene que removerse

perfectamente para obtener un óptimo crecimiento en los cultivos primarios; se recomienda tres enjuagues consecutivos con agua esterilizada. Las semillas son desinfectadas más efectivamente, en los explantos de hoja se espera un promedio de contaminación del 10 al 20%. Los mayores índices de contaminación se presentan en explantos de yemas axilares y en espádices; en los explantos de espádices de *A. scherzerianum* no es raro un índice de hasta el 75% de cultivos contaminados. Aparte de las infecciones observadas en los cultivos primarios, la contaminación puede volverse aparente después de repetir los subcultivos.

El tamaño de los explantos utilizados comúnmente es de 10 a 14 mm cuadrados, en el caso de las hojas y secciones de espata, de 8-10 mm. de longitud para las secciones de peciolo, pedúnculo y espádice; y de 1-2 mm de diámetro para yemas axilares. Para inducir la regeneración de los embriones, lo más conveniente es separar las semillas longitudinalmente.

3.6.6. MORFOGÉNESIS Y REGENERACIÓN DE EXPLANTOS.

La regeneración de órganos (por formación adventicia o por nueva formación) que no estuvieran presentes en el momento del aislamiento, es un proceso extremadamente complejo, por las siguientes razones (Pierik, 1990):

- a) Las correlaciones existentes deben ser rotas, antes de establecer otras nuevas que conduzcan a la regeneración de órganos.
- b) En ese proceso se pueden distinguir las siguientes etapas:
 - Desdiferenciación de células diferenciadas.
 - División celular, puede comenzar la diferenciación de órganos.
 - Diferenciación de órganos (formación).
 - Desarrollo de órganos.

c) Existen limitaciones tanto cualitativas como cuantitativas debidas a un gran número de factores: inherentes al material vegetal, debidos a las condiciones de crecimiento de los vegetales en el invernadero o en el campo, debidos a la posición del explanto sobre la planta, a la época del año, al nivel de hormonas endógenas, etc.

La regeneración de plántulas de *A. andreaenum* se ha obtenido vía callo a partir de cultivo de embriones y de explantos de hoja, pecíolo, pedúnculo, espata y espádice, o también, sin la formación de callos y con explantos de yemas axilares (Geier, 1990) (Figura 2).

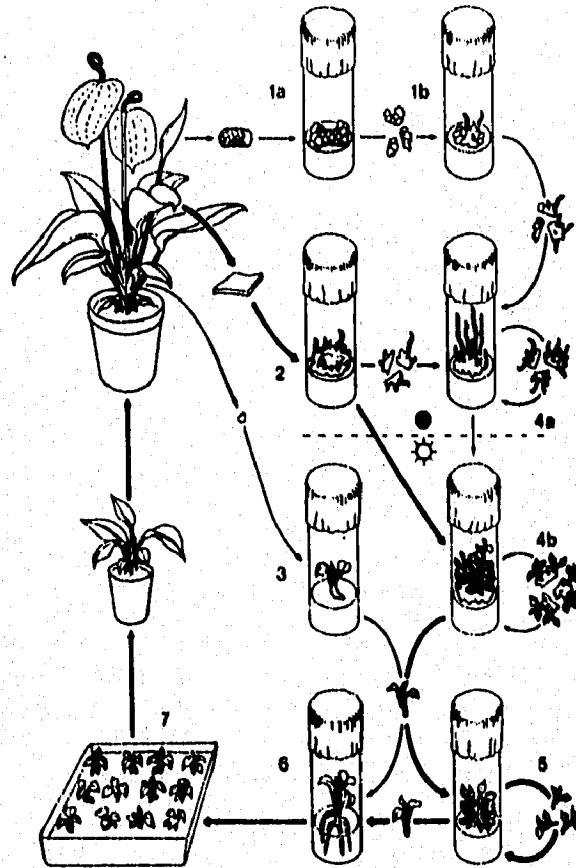
Pierik y colaboradores (1974) lograron inducir, por primera vez, la regeneración, de plantas en *A. andreaenum*, primero en tejidos de embriones y plántulas y, posteriormente, en partes no meristemáticas de plantas maduras. En sus experimentos, todos los tipos de explantos formaron callo espontáneamente después por subcultivo dieron origen a brotes adventicios.

Considerando que Pierik (1976) propuso un método de micropropagación de *A. andreaenum* basado en el método de multiplicación de callos, Kunisaki (1977, 1980) y Lefring y Soede (1978, 1979a,b) (citados por Geier, 1990) desarrollaron métodos alternativos utilizando la proliferación de brotes como medio de multiplicación.

Kunisaki (1977, 1980) evitó la formación inicial de callo utilizando como explanto brotes desarrollados de yemas axilares. La formación de brotes fue inducida con un bajo crecimiento de callo.

Zimmer y Bahnand (1982) (citados por Geier, 1990) indujeron la proliferación de brotes en semillas germinadas de *A. scherzerianum*.

FIGURA 2. MORFOGÉNESIS EN ANTURIO.



(1a,b) Formación de callo a partir de secciones de espádice. (2) Establecimiento de callo a partir de secciones de hoja. (3) Formación de brotes a partir de yemas axilares. (4a) Proliferación de callos en la oscuridad. (4b) Multiplicación de callos bajo iluminación. (5) Multiplicación de brotes aislados para proliferación de brotes. (6) Enraizamiento de brotes aislados. (7) Establecimiento de plántulas a suelo.

Fuente: Geier, 1990

Zens y Zimmer (1988) (citados por Geier, 1990) al estudiar la histología en la proliferación de brotes en plántulas de *A. scherzerianum* revelaron dos tipos de organogénesis: desarrollo directo del brote a partir del epicótilo y desarrollo indirecto vía formación de callo a partir de todas las partes de la plántula.

3.6.6.1. INDUCCIÓN DE CALLOS.

Un callo es básicamente un tejido tumoral, más o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Se llama inducción de callos al inicio de su formación. La formación de callos es posible en muchas especies diferentes; una vez formado el callo se cultiva en un medio diferente, y nos referimos a ello como subcultivo de callos. Cualquier tipo de órgano (raíz, tallo, hoja, flor, etc.) o tejido puede ser utilizado como material inicial para la inducción de callo. Si ésta resulta difícil o se precisa un callo juvenil, se utilizan embriones (inmaduros) o fragmentos de plántulas (Pierik, 1990).

En el caso de las monocotiledoneas, debido a que la iniciación del callo resulta a veces difícil si se parte de embriones, se suele utilizar como material inicial hojas jóvenes, plántulas o primordios florales muy jóvenes (Pierik, 1990).

Los primeros reportes sobre la inducción de callos en *A. andreaum* son los de Pierik y colaboradores (1974). Un bajo porcentaje de embriones formaron callo uniforme en ausencia de hormonas. La adición de 1.0 mg/l de BAP [6-(bencilamina)-9-(2-tetrahidropiridin-9H-purina)] en el medio de cultivo dio como resultado la formación de un callo consistente en casi el 100% de los embriones.

La citocinina BAP resultó ser esencial para la inducción de callos en secciones de hoja, peciolo, espata y espádice. Al suplementar el medio de cultivo con auxinas combinado con citocininas, generalmente se mejoró la inducción de callos y el crecimiento en subcultivo (Pierik *et al.* 1974).

Hauzinska (1976) (citado por Geier, 1990) empleó 3.0 mg/l de ANA (ácido naftalenacético) para inducir la formación de callo en embriones y tejidos jóvenes de plantas adultas.

Finnie y van Staden (1986), también utilizó la citocinina ANA a una concentración de 0.6 mg/l., para evaluar el efecto sobre la formación de callo y la regeneración de brotes en *A. andreanum*.

Geier (1990) menciona que la mayoría de los investigadores observaron una formación óptima de callo y un crecimiento constate en oscuridad continua y a temperatura alrededor de 25 °C; Finnie y van Staden (1986) reportaron la mejor producción de callo con luz natural. Además, afirmaron que el callo caulogénico, una vez establecido bajo estas condiciones, puede ser mantenido en ausencia de reguladores de crecimiento (fitohormonas) aplicadas exógenamente.

Pierik y Steegmans (1976) fueron los primeros en obtener callos en explantos de hoja de *A. scherzerianum* en condiciones casi idénticas a las utilizadas en *A. andreanum*.

Ferzing y Lutz (1977) (citados por Geier 1990) compararon la regeneración de los explantos en ambas especies (*A. andreanum* y *A. scherzerianum*), encontraron un bajo potencial en la formación de callo en *A. scherzerianum* cuando los tejidos fueron cultivados en el medio MS, suplementado con 1.0 mg/l de BA y 0.1 mg/l de 2,4-D, pero al adicionar 2

gr/l de extracto de levadura, resultó inhibitorio en *A. andreanum* mientras que en *A. scherzerianum* se promovió fuertemente la formación de callo.

Probablemente el factor más crítico en el cultivo de tejidos de *Anthurium* es el genotipo. Pierik y colaboradores (1975) (citados por Geier, 1990) estudiaron 38 genotipos de *A. andreanum*, observaron una moderada a fuerte formación de callo en segmentos de hoja en 31 genotipos, muy poco callo en 4 genotipos y no hubo respuesta en los 3 genotipos restantes.

3.6.6.2. CULTIVO DE CALLOS.

Una vez conseguida la inducción, el callo se cultiva sobre un medio nuevo. El primer repicado suele llevarse a cabo sobre un medio sólido, aunque en algunos casos es posible empezar directamente sobre un medio líquido (Pierik, 1990).

Pierik (1975) realizó una comparación del índice de crecimiento de callo entre el clon A 42-3 y otros 6 genotipos. El medio de cultivo utilizado fue el MS, adicionado con 1.0 mg/l. de BAP. Los índices de crecimiento en peso fresco, obtenidos después de 5 semanas fueron de 30.0 para el clon A 43-2 y 6.7, 9.2, 12.3, 21.3, 32.2 y 34 para los otros 6 genotipos.

Leffring y Soede (1979a) (citados por Geier, 1990) mencionan que los callos de aquellos genotipos que no respondieron en los cultivos primarios, por lo menos en parte formaron brotes después de transferidos a un medio de cultivo nuevo.

Los genotipos con mala regeneración a veces requieren 3 meses para producir callo visible y hasta 6 meses para iniciar la brotación. En ciertos genotipos que no regeneran

brotos fácilmente pueden requerirse una o varias transferencias de callo no organizado para forzar la formación de brotes (Geier, 1990).

El establecimiento de callo caulogénico de espádice, normalmente requiere de 4-5 meses de cultivo inicial, seguido por dos o más subcultivos de 3 meses cada uno, esto puede ser necesario para obtener suficiente callo y producción de brotes (Geier, 1990).

La multiplicación de callo caulogénico se lleva a cabo en el mismo medio utilizado para establecer el callo, ambos en oscuridad continua o bajo las mismas condiciones de luz utilizadas en la proliferación de brotes (Geier, 1990).

3.6.6.3. REGENERACIÓN DE BROTES.

La formación de brotes adventicios puede producirse sobre el callo, si existe una baja concentración de auxina y una alta concentración de citocinina (Pierik, 1990).

La citocinina BA es la más eficaz a la hora de inducir la formación de brotes adventicios (Pierik, 1990).

Usualmente, las condiciones aplicadas para la inducción y el subcultivo de callos en *A. andreaanum*, en cierto grado permitió además la formación de brotes adventicios; así estos brotes pudieron surgir espontáneamente en callos primarios o en subcultivos. Sin embargo, las condiciones óptimas para la formación de brotes adventicios son diferentes (Geier, 1990).

Pierik y colaboradores (1975) (citados por Geier, 1990) y Pierik (1976) demostraron la importancia en el nivel de amonio sobre la formación de brotes en callos de *A. andreaanum*; los callos formados en explantos de hoja no formaron brotes en presencia de 1.0 mg/l de

BAP en el medio MS con los macronutrientes a la mitad de su concentración y únicamente pudieron inducir brotes al disminuir la concentración de NH_4NO_3 de 10.3 a 2.5 mM.

Pierik (1976) llegó a la conclusión de que el factor más importante y a la vez limitante, en la fases de inducción de callo, subcultivo de callo e inducción de brotes, en *A. andreaenum*, es la presencia de una citocinina. La formación de brotes adventicios fue promovida por la adición de 1.0 mg/l. de BAP.

Pierik y colaboradores (1979) estudiaron los efectos de la adenina; las citocininas: BA, KIN, 2iP y Zeatina, las cuales fueron aplicadas en niveles de 0.05 a 10.0 mg/l, el 2,4-D y varios fotoperíodos, sobre la formación de brotes en callos primarios de hojas en un sólo clon de *A. andreaenum*. Estos investigadores demostraron que la óptima formación de callo y brotes ocurrió cuando se adicionó 1.0 mg/l. de zeatina (25.5 brotes en promedio por explanto) seguido por el BA a 0.5 mg/l. (12.1 brotes por explanto), la Kinetina a 1.0 mg/l. (8.5 brotes) y el 2iP (4.8 brotes). La formación de brotes fue promovida por la auxina 2,4-D con un óptimo de 0.08 mg/l. Cuando los cultivos se mantuvieron bajo iluminación continua durante todo el período del experimento (20 semanas), la formación de brotes fue inhibida casi completamente. Sin embargo, con 4 a 12 semanas de iluminación proporcionadas hacia el final del período de cultivo, dio como resultado un ligero incremento en el número de brotes por explanto comparados con los cultivos mantenidos en oscuridad continua.

Ferzing y Lutz (1977) (citados por Geier, 1990) observaron caulogénesis espontánea en tejidos de *A. scherzerianum* cultivados en el medio MS suplementado con 1.0 mg/l de BA y 0.1 mg/l de 2,4-D; en tanto que Pierik y Steegmans (1975) (citados por Geier, 1990) utilizaron un segundo medio, reduciendo la citocinina y omitiendo el 2,4-D para el desarrollo

de brotes. En ambas investigaciones, la formación de callo y brotes se realizó en el medio MS con los macronutrientes a la mitad de su concentración con una media de 10.3 mM de NH_4NO_3 .

Geier (1986) reveló el efecto marcadamente benéfico de los bajos niveles de NH_4NO_3 (2.5 mM) sobre la regeneración de explantos de hoja en *A. scherzerianum*. En un número uniforme de genotipos, el medio con contenido de amonio parece ser un requisito esencial para la inducción de callos y brotes.

Leffring y Soede (1979) (citados por Geier, 1990) utilizando medio sólido y líquido en agitación, suplementado cada uno con BA o KIN en concentraciones que van de 1.0 a 3.0 mg/l observaron una óptima brotación de *A. andreaeanum* en el medio líquido que contenía 3.0 mg/l de KIN. Después de 6 semanas de cultivo en este medio, se formaron 6.1 brotes nuevos en promedio por brote inicial. El BA así como también el 2iP provocaron baja brotación, pero en el mismo tiempo se promovió la formación de callo.

Leffring y Soede (1979a) (citados por Geier, 1990) ajustaron el nivel de citocininas en el medio de cultivo para incrementar la proporción en la regeneración de 23 genotipos de *A. andreaeanum*. 22 de los 23 genotipos representativos formaron callo en presencia de 3.0 mg/l de 2iP, comparado con sólo 12 cuando se empleó BA a 1.0 mg/l. Mientras que 7 de 23 genotipos formaron brotes en callo primario de hoja, en presencia de 1.0 mg/l de 2iP, sólo dos genotipos formaron brotes cuando se utilizó 1.0 mg/l de BA. Al aumentar el nivel de 2iP a 3.0 mg/l hasta 15 genotipos pudieron inducirse a formar brotes.

Kunisaki (1980) utilizó niveles bajos de la citocinina BA (0.2 - 1.0 mg/l). Sus resultados muestran que la concentración de 0.2 mg/l fue considerada la óptima para inducir

la proliferación de brotes (3.1 brotes por explanto), sin el desarrollo concomitante de callo, porque a altas concentraciones de BA la producción de callo se incrementó y los brotes fueron disminuyendo.

Geier (1986) estudió la capacidad de regeneración en 18 genotipos de *A. scherzerianum*, en los cuales obtuvo los siguientes resultados: 3 genotipos no mostraron regeneración alguna, 5 formaron sólo callo, y 10 produjeron callo caulogénico. En este último grupo, el número de brotes formados en promedio por explanto, después de 20 semanas de cultivo fue: más de 10 en 2 genotipos, de 1 a 10 en 3 genotipos y, menos de 1 en 5 genotipos.

En *A. scherzerianum*, el BA a niveles de 0.2 y 0.5 mg/l promovió más efectivamente la proliferación de brotes, que a 0.5 mg/l de KIN y a 0.5 mg/l de 2iP (Geier 1986).

Al comparar la capacidad de regeneración en varios órganos de *A. patalum*, Eapen y Rao (1985) observaron la formación continua de callo y brotes en segmentos de hojas jóvenes, pedúnculo y espata, mientras que los explantos de pecíolo sólo formaron callo. Todos los tipos de explanto fueron cultivados en el medio MS modificado, suplementado con 1.0 mg/l de BA y 0.5 mg/l de 2,4-D.

Hirunratana (1988) cultivó las yemas de *A. andreaum* var. "Double Spathe" en el medio MS. Cuando adicionó BA a una concentración de 0.6 mg/l, emergieron las puntas de los brotes cuatro meses después y posteriormente también desarrollaron las raíces.

Soczek y Hempel (1989) utilizaron brotes tiernos de *Anthurium X cultorum* Birdsey, como explanto primario, los cuales fueron cultivados en el medio MS con los macronutrientes a la mitad de su concentración y suplementado con BAP, KIN, ZEA y 2iP a

diferentes niveles. La concentración óptima de citocininas (0.5 a 1.0 mg/l de Zeatina) estimuló el más alto número de brotes (3.4 brotes/explanto) y su crecimiento. La mayor concentración de citocininas (2.0 mg/l.) estimuló el crecimiento de callo (0.39 cm de diámetro), cuando se utilizó BAP y Zeatina; 0.31 cm con 2iP; y 0.26 cm. con la KIN. El BAP a una concentración de 0.5 mg/l. produjo 2.6 brotes en promedio por explanto. La duración del experimento fue de 12 semanas de cultivo.

Del Rosario (1990) encontró que la auxina 2,4-D a concentraciones de 0.05 a 1.0 mg/l., resultó ser la más efectiva para la formación de callo en cuatro cultivares de *Anthurium*. Por otra parte, la citocinina BA dio los más altos grados de formación de callo y regeneración de brotes con 0.5 a 1.5 mg/l., seguido por las citocininas 2iP, BAP y finalmente la KIN.

Lightbourn y Prasad (1990) reportan que una buena multiplicación de brotes (3-5 brotes por callo) fueron obtenidos en 0.2 a 0.8 mg/l de BA en los cuatro cultivares evaluados. Ellos utilizaron como explanto inicial cortes de hoja de 1-2 cm cuadrados, los cuales fueron inoculados en cajas de petri con el medio básico de Nitsch.

La regeneración de plántulas en callos de 4 cultivares de *A. andreanum*, cultivados durante un largo período (12 a 13 meses) se logró al cultivar los callos en el medio de Kuniaki, conteniendo 0.5 a 5.0 mg/l de BA (Kuehne y Sugii, 1991).

3.6.6.4. FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS.

Los callos son generalmente más capaces de regenerar raíces, que los vástagos adventicios (Thomas y Davey, 1975: citados por Pierik, 1990).

El enraizamiento de los brotes de *A. andreaanum* es promovido por una disminución en la concentración de macronutrientes y por la omisión de citocininas (Pierik, 1976).

Pierik *et al* (1979), aún cuando evaluaron la regeneración de raíces en explantos de hoja, no presentan los datos debido a que el inicio y desarrollo de la raíz fue muy pobre bajo todas las condiciones.

Leffring y Soede (1979) (citados por Geier, 1990) observaron un enraizamiento más rápido cuando la concentración de agar fue menor a 5 g/l.

A diferencia de la inducción de callos y brotes, el enraizamiento se retarda considerablemente con 1.25 a 2.5 mM de NH_4NO_3 , comparada con 9.0 mM de NH_4NO_3 (Geier, 1986).

La capacidad de enraizar de los brotes de *A. scherzerianum*, decreció progresivamente durante la repetición de los subcultivos en presencia del BA como único regulador de crecimiento (Geier, 1986).

La formación de raíces generalmente tiene lugar en medios con concentraciones relativamente altas de auxina, pero concentraciones de citocinina bajas (Pierik, 1990).

El enraizamiento de los brotes puede ocurrir espontáneamente cuando los cultivos son expuestos a largos periodos de iluminación. Sin embargo, es más rápido y consistente el enraizado cuando se aíslan los brotes y se transfieren a un medio especial de enraizamiento. Con *A. andreaanum* se utilizó el medio MS modificado y desprovisto de reguladores de crecimiento principalmente para este propósito (Geier, 1990).

Aunque no necesariamente las auxinas han sido incluidas en el medio para aumentar el enraizamiento, Pierik y Steegmans (1976) emplearon 0.47 mg/l de AIA sal de potasio;

Ferzing y Lutz(1977) (citados por Geier, 1990) utilizaron 0.01 a 0.1 mg/l de 2,4-D o 1.0 mg/l de AIB.

3.6.7. CONDICIONES DE CULTIVO.

Los principales factores físicos del medio climático en los cultivos *in vitro* son: la luz, temperatura y en menor grado la humedad relativa. (Murashige, 1974; Margara, 1988).

3.6.7.1. ILUMINACIÓN E INTENSIDAD LUMÍNICA.

Generalmente, la iluminación de las cámaras de cultivo se realiza mediante tubos fluorescentes de luz blanca (Margara, 1988; Pierik, 1990). A menudo, la conservación de capas de tejidos se realiza bajo intensidades lumínicas relativamente bajas (2000 a 5000 luxes). La iniciación de los fenómenos de la organogénesis (rizogénesis, caulogénesis) generalmente se ha observado con iluminaciones del mismo orden y a veces menores (Margara, 1988).

La influencia del fotoperíodo sobre el crecimiento de los callos o la organogénesis está poco estudiada (Margara, 1988). Actualmente, se utilizan con frecuencia fotoperíodos de 12 a 16 horas-luz (Margara, 1988; Pierik, 1990).

Aparentemente, el cultivo de callos de *A. scherzerianum* no tiene requerimientos específicos de luz, ya que el subcultivo ha sido exitoso, al llevarlo a cabo en oscuridad continua (Geier y Reuther, 1981; citados por Geier, 1990) y Geier (1982); así como también bajo un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 horas-oscuridad (Zens y Zimmer, 1986; citados por Geier, 1990).

3.6.7.2. TEMPERATURA.

Es constante en muchas cámaras de cultivo manteniéndose entre 22 y 25 °C. La temperatura óptima puede ser más elevada para plantas tropicales (27 a 28 °C) ó, al contrario, más baja para algunas especies (Margara, 1988).

3.6.7.3. HUMEDAD RELATIVA.

Sobre la influencia de la humedad en la cámara de crecimiento y desarrollo *in vitro*, existe poca información (Pierik, 1990). Generalmente, el sellado de los recipientes de cultivo asegura una humedad relativa suficiente de la atmósfera ambiente. Por consiguiente, no es necesario prever dispositivos adicionales que permitan controlar la hidrometría de la cámara de cultivo (Margara, 1988).

3.6.8. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CULTIVO *IN VITRO*

Hu y Wang (1983) y Sagawa y Kunisaki (1990) señalan algunas ventajas del cultivo de tejidos con respecto a otros sistemas de propagación:

- a) Con una pequeña cantidad de tejido que es lo que constituye un explanto o inóculo, potencialmente se puede regenerar millones de plantas. El explanto es un fragmento de planta que es establecido *in vitro*.
- b) Esta técnica representa una opción para la multiplicación de especies con dificultades para ser propagadas por métodos convencionales.
- c) El número de plantas derivadas por genotipo, se puede incrementar rápidamente y en un tiempo más corto.

- d) Los niveles de nutrientes, luz, temperatura y otros factores pueden ser más fácilmente controlados para acelerar la multiplicación vegetativa y regeneración.
- e) Se pueden multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- f) Se puede controlar la sanidad del material propagado.
- g) Los materiales se pueden transportar bajo las condiciones *in vitro* a otros países con menos restricciones.
- h) En la mayoría de los casos la micropropagación es independiente de las estaciones del año.
- i) Las plantas *in vitro* requieren atención mínima entre subcultivos, por tanto, no son necesarios trabajos y materiales para riegos, deshierbes, aspersiones, etc.

Sagawa y Kunisaki (1990) encuentran algunas desventajas de la micropropagación con respecto a otros métodos convencionales de propagación:

- a) La micropropagación requiere técnicas avanzadas, instalaciones y equipo especializado.
- b) Los propágulos son relativamente caros debido a los métodos usados en el trabajo intensivo.
- c) Métodos específicos para obtener resultados óptimos con cada especie deben ser desarrollados.
- d) las plántulas inicialmente son muy pequeñas.
- e) La posibilidad de producir variantes somaclonales es alta.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencias Agrícolas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan - UNAM.

4.2. MATERIAL VEGETAL EMPLEADO.

El material vegetal utilizado se obtuvo mediante cruza de anturios realizadas en el municipio de Teocelo, estado de Veracruz.

Se emplearon los explantos obtenidos de plántulas asépticas a partir de semillas inmaduras.

4.3. MEDIO DE CULTIVO.

Se utilizó como medio de cultivo base para todo el experimento el de Murashige y Skoog (MS) con los macronutrientes al 50% de su concentración.

El desarrollo del trabajo se dividió en dos etapas: en la primera se sembraron las semillas en el medio MS al 50% de su concentración de sales inorgánicas con la adición de reguladores de crecimiento (BA y AIB), para estimular la germinación. La segunda etapa consistió en el trasplante del inóculo al mismo medio pero con los tratamientos a evaluar.

4.4. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

Para la desinfección del material vegetal, primero se lavaron las semillas con agua y detergente comercial, enseguida se enjuagaron y se colocaron en una solución de alcohol al 70% durante 3 minutos, agregándose una gota de Tween 80, posteriormente se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 20% manteniéndose durante 30 minutos en agitación. Al término del tiempo se enjuagaron con agua destilada-esterilizada en la campana de flujo laminar.

4.5. IMPLANTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

En la primera etapa del experimento la siembra se realizó con la ayuda de la campana de flujo laminar. Se colocaron las semillas directamente en los tubos que contenían el medio de cultivo, enseguida fueron tapados y sellados perfectamente.

Para la segunda etapa del experimento, se utilizaron las plántulas obtenidas asépticamente. Estas fueron colocadas en cajas de petri esterilizadas para realizar enseguida cortes en los entrenudos y obtener porciones de tallo con una hoja completa de aproximadamente 3-4 mm de longitud. Con la ayuda de unas pinzas se introdujeron los explantos en los frascos con el medio de cultivo y los tratamientos a evaluar. Finalmente fueron tapados y sellados; toda esta operación también se realizó en la campana de flujo laminar.

4.6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Después de establecidas las semillas en los tubos se introdujeron en el cuarto de cultivo, con un ambiente controlado, manteniendo una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, un fotoperíodo de 16 horas-luz y una intensidad lumínica de 3000 luxes. Durante las dos primeras semanas de incubación, las semillas permanecieron en oscuridad.

Para la segunda etapa del experimento, los explantos se colocaron en el cuarto de cultivo bajo las mismas condiciones de incubación.

4.7. FECHAS DE SIEMBRA.

La fecha de siembra para la primera etapa del experimento (germinación de semillas) fue el primero de marzo de 1994.

La segunda etapa del experimento tuvo como fecha de siembra el 23 de septiembre de 1994 y se evaluó 12 semanas después, es decir, el 16 de diciembre de 1994.

4.8. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Vera (1994) señala que en investigaciones donde se emplea la técnica de cultivo de tejidos vegetales, generalmente se utiliza el diseño completamente al azar, puesto que el material es homogéneo (por ejemplo, se usa para determinar cuál es el mejor medio de cultivo para meristemos, callos, anteras, hojas, embriones, óvulos, etc.).

El diseño experimental utilizado para el análisis de los datos fue un completamente al azar (DCA) con 7 tratamientos y siete repeticiones cada uno. Quedando de la siguiente manera:

CUADRO 4. DISEÑO EXPERIMENTAL.		
TRATAMIENTOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO	
	BA (mg/l)	AIB (mg/l)
1	0.0	0.0
2	0.5	0.1
3	1.0	0.1
4	1.5	0.1
5	2.0	0.1
6	2.5	0.1
7	3.0	0.1

4.9. TOMA DE DATOS.

La toma de datos se realizó en base a las siguientes variables de estudio:

- a).- Porcentaje de contaminación. El desarrollo de patógenos (hongos y bacterias) en los medios de cultivo se evaluó 72 horas después de establecido el inóculo.
- b).- Formación de callo. Esta variable se cuantificó en base al porcentaje de explantos que formaron callo y al diámetro promedio de callo por explanto.
- c).- Número de brotes. Se consideró para cuantificar esta variable, todos los brotes con por lo menos 2 mm. de longitud y con 2 hojas.
- d).- Longitud de brote. La medición de los brotes se realizó a partir de la superficie del callo formado hasta la punta del brote.
- e).- Longitud de raíz. En esta variable se consideró la longitud promedio de raíces.

Las cuatro últimas variables se evaluaron 12 semanas después de establecido el cultivo.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN.

La principal dificultad encontrada en *A. andreaenum* es la obtención de cultivos asépticos en los explantos iniciales. La alta contaminación requiere el uso de explantos pequeños, pero esto, en muchas ocasiones resulta en una alta mortalidad y pérdida de explantos (Kunisaki, 1977).

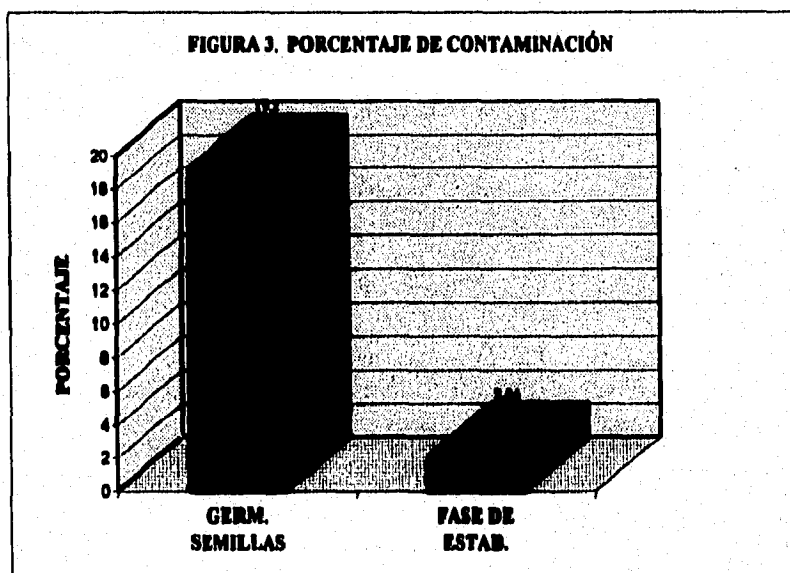
En la presente investigación, el método utilizado para la desinfección del material vegetal (5 minutos en alcohol al 70% y 30 min. en hipoclorito de sodio al 20%) dio como resultado un 80.8% de cultivos asépticos y un 19.2% de contaminación en la primera parte del experimento, es decir, en la siembra de semillas inmaduras. De los cultivos contaminados el 11.7% fue por bacterias y el 7.5% por hongos.

De acuerdo con estos resultados, se considera que la desinfección del material vegetal, en general, fue aceptable, debido a que el porcentaje de contaminación presentado (19.2%) se encuentra ligeramente por encima de lo reportado por Geier (1986) y Kunisaki (1977, 1980).

Sin embargo, estos resultados son aceptables, pero pueden mejorarse si se realiza una previa desinfección de la superficie de la semilla, antes de ser diseccionada y desinfectada (Geier, 1986).

En la segunda parte del trabajo (Etapa de establecimiento de los explantos) únicamente se presentó contaminación en una unidad experimental del tratamiento 5, lo que representa un 2.04% de contaminación en todo el experimento (Ver figura 3).

Este resultado se considera dentro de lo normal, ya que siempre existen factores que influyen en la contaminación de los cultivos. Aún cuando se trabajó con explantos obtenidos de cultivos asépticos, la contaminación puede deberse al medio de cultivo, la calidad del aire en el área de trabajo y/o la destreza del operador para manipular el material (Pierik, 1990).



5.2. FORMACIÓN DE CALLO.

La variable formación de callo se cuantificó en base al diámetro de callo en cm. El análisis de varianza para esta variable muestra que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos (niveles de citocininas) (ver cuadro 5). Al realizar la comparación de

medias, aplicando la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5% (Cuadro 6) da como resultado que el tratamiento 2, con un diámetro promedio de callo de 1.24 cm. es estadísticamente diferente y superior a los demás tratamientos. Seguido por el tratamiento 3, con 0.76 cm de diámetro, el cual, también resultó diferente a los tratamientos 4, 5, 6, 7 y 1.

Los tratamientos 4, 5, 6 y 7 marcados con la letra C, son estadísticamente iguales entre sí, con un diámetro promedio de callo entre 0.34 y 0.44 cm.

El tratamiento 1 (testigo) no mostró formación alguna de callo, en ausencia de citocinina, siendo estadísticamente inferior a los demás tratamientos.

Sin embargo, cuando se empleó la citocinina BA en niveles de 0.5 a 3.0 mg/l y 0.1 mg/l. de AIB se logró la formación de callo en el 100% de los explantos. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Pierik *et al.* (1974) quienes únicamente utilizaron 1.0 mg/l de BAP como citocinina.

En la Figura 4 se aprecia que dentro de las concentraciones de BA, el mejor nivel para inducir la formación de callo fue el de 0.5 mg/l más 0.1 mg/l de AIB (tratamiento 2).

Al incrementar las concentraciones de BA, en el orden de 1.0 a 3.0 mg/l. resultó en una fuerte disminución en la formación de callo, situación contraria a lo obtenido por Ferzing y Lutz (1977) (citados por Geier, 1990) quienes obtuvieron una óptima formación de callo con una concentración de 1.0 mg/l. de BA más 0.1 mg/l. de 2,4-D; por Pierik *et al.* (1979), los cuales lograron la mejor producción de callo con únicamente 1.0 mg/l de BA; y por Soczek y Hempel (1989), quienes incrementaron la producción de callo al aumentar el nivel de BAP hasta 2.0 mg/l. en combinación con la auxina 2,4-D a 0.1 mg/l.

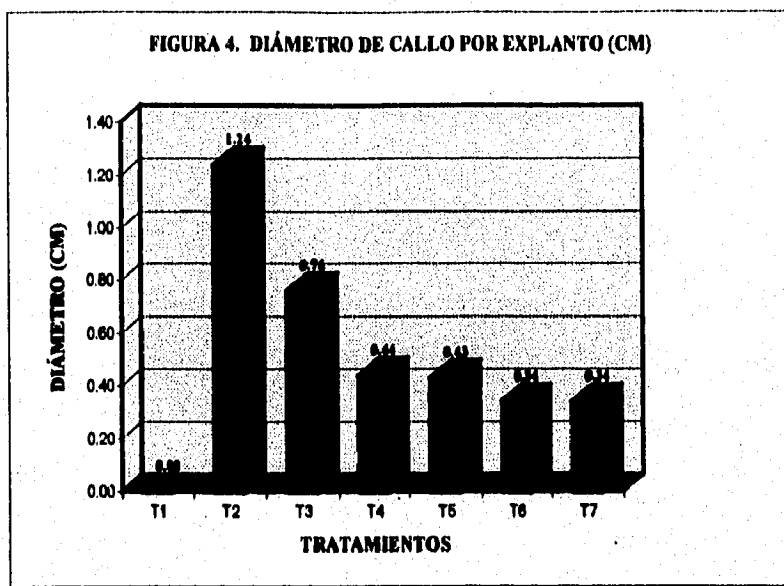
La concentración de BA, efectivamente, afectó el crecimiento del callo. Sin embargo, también es posible que la disminución de callo se deba al tipo de auxina utilizada en el medio (AIB), ya que en los trabajos revisados, casi siempre, se utilizó el 2,4-D; con el cual, se favoreció el desarrollo del callo.

CUADRO 5. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA DIÁMETRO DE CALLO.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
TRAT.	6	6.48	1.08	52.68	0.05= 2.33 * 0.01= 3.27 **
ERROR	42	0.86	0.0205		
TOTAL	48	7.34			

CUADRO 6. COMPARACIÓN DE MEDIAS EN DIÁMETRO DE CALLO MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY.

Trat. 2 = 1.24	a	$DMHS = 4.39 \sqrt{\frac{0.0205}{7}}$ $DMHS = 0.2375$ $\alpha 0.05 = 4.39$
Trat. 3 = 0.76	b	
Trat. 4 = 0.44	c	
Trat. 5 = 0.43	c d	
Trat. 6 = 0.34	c d e	
Trat. 7 = 0.34	c d e f	
Trat. 1 = 0.0	g	



5.3. NÚMERO DE BROTES.

Doce semanas después de establecido el cultivo, la variable número de brotes presentó diferencias altamente significativas en la fuente de variación tratamientos (niveles de citocinina), tal como se muestra en el cuadro 7.

Al realizar la comparación de medias, mediante la prueba de Tukey (Cuadro 8) el tratamiento 2 con una concentración de 0.5 mg/l de BA y 0.1 mg/l de AIB, fue estadísticamente superior a los demás tratamientos, ya que se obtuvo un promedio de 11.14 brotes.

Los tratamientos 3 y 4 resultaron ser significativamente iguales, con un promedio de 6.36 y 4.64 brotes, respectivamente.

Los tratamientos 5, 6, 7 y 1 (testigo) fueron los que produjeron el menor número de brotes con un promedio inferior a 2.21.

En la Figura 5 se ilustra el número de brotes promedio por tratamiento.

A través de los resultados obtenidos se demuestra que la concentración de BA a 0.5 mg/l. y 0.1 mg/l. de AIB fue la mejor para inducir una mayor cantidad de brotes. Este comportamiento pudiera explicarse si se toma en cuenta que también, para esta concentración de BA, el tratamiento 2 presentó el mayor crecimiento de callo y se considera que Geier (1986) reportó la existencia de una fuerte correlación entre la formación de callo y la regeneración de brotes.

Los efectos de las concentraciones de BA, sobre el número de brotes, difieren con los trabajos reportados por los siguientes investigadores: Lefring y Soede (1979) (citados por Geier, 1990) donde obtuvieron una baja respuesta en la brotación (menos de 6.1 brotes en promedio por brote inicial), utilizando concentraciones de BA entre 1.0 y 3.0 mg/l.; Kunisaki (1980); Del Rosario (1990) y Lightbourn y Prasad (1990) utilizaron niveles de BA entre 0.2 y 1.0 mg/l., logrando en promedio de 3 a 5 brotes por callo.

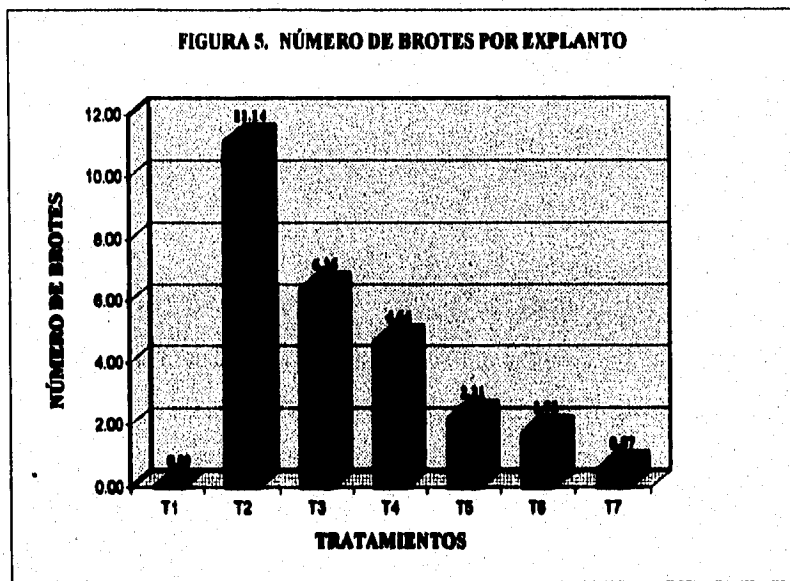
Los datos reportados por Pierik y colaboradores (1979) superan ligeramente a los resultados obtenidos en este trabajo, respecto al número de brotes (12.1 brotes en promedio) cuando utilizaron la citocinina BA a una concentración de 0.5 mg/l., pero se debe considerar que el tiempo de cultivo fue mayor. Es muy probable que la adición de 0.1 mg/l de AIB al medio de cultivo haya influido de manera directa, tanto en la formación de callo como en la diferenciación de brotes. De tal forma que esto sugiere la posibilidad de manejar,

en futuras investigaciones, concentraciones bajas de BA en combinación con AIB, para favorecer una mejor capacidad de regeneración en los explantos.

Cabe recalcar que, mientras Pierik (1974); Pierik *et al* (1979) necesitaron más de 20 semanas en obtener un buen número de brotes, pasando los cultivos por fase oscura y con luz, y Geier (1986) necesitó de una fase oscura y seis trasferencias para obtener buenos resultados; con la presente investigación, el tiempo de regeneración de los brotes fue de sólo 12 semanas, con un fotoperíodo normal de 16 horas luz por 8 de oscuridad.

CUADRO 7. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE BROTES.					
FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
TRAT.	6	650.27	108.30	64.9	0.05= 2.33 * 0.01= 3.27 **
ERROR	42	70.14	1.67		
TOTAL	48	720.41			

CUADRO 8. COMPARACIÓN DE MEDIAS EN NÚMERO DE BROTES MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY.	
Trat. 2 = 11.14 a	$DMHS = 4.39 \sqrt{\frac{1.67}{7}}$ $DMHS = 2.14$ $\alpha 0.05 = 4.39$
Trat. 3 = 6.36 b	
Trat. 4 = 4.64 b c	
Trat. 5 = 2.21 d	
Trat. 6 = 1.71 d e	
Trat. 7 = 0.57 d e	
Trat. 1 = 0.0 e	



5.4. LONGITUD DE BROTES.

El análisis de varianza para la variable longitud de brote, arroja diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos (ver cuadro 9) Esto quiere decir que el nivel de citocinina BA afectó considerablemente, tanto en el diámetro de callo y el número de brotes, como en la longitud alcanzada por los brotes regenerados.

En la comparación de medias por la prueba de Tukey (cuadro 10) se aprecia que los niveles de citocinina de 0.5 y 1.0 mg/l. (tratamientos 2 y 3) son estadísticamente iguales, superando a los demás tratamientos, incluyendo al testigo, con 0.94 y 0.83 cm de longitud. (Ver Figura 6), respectivamente. Sin embargo, se puede considerar al tratamiento 2, con una

concentración de 0.5 mg/l. de BA, superior al tratamiento 3, por haber tenido una mayor respuesta en el número de brotes, con un promedio de 11.14 y una longitud de 0.94 cm.

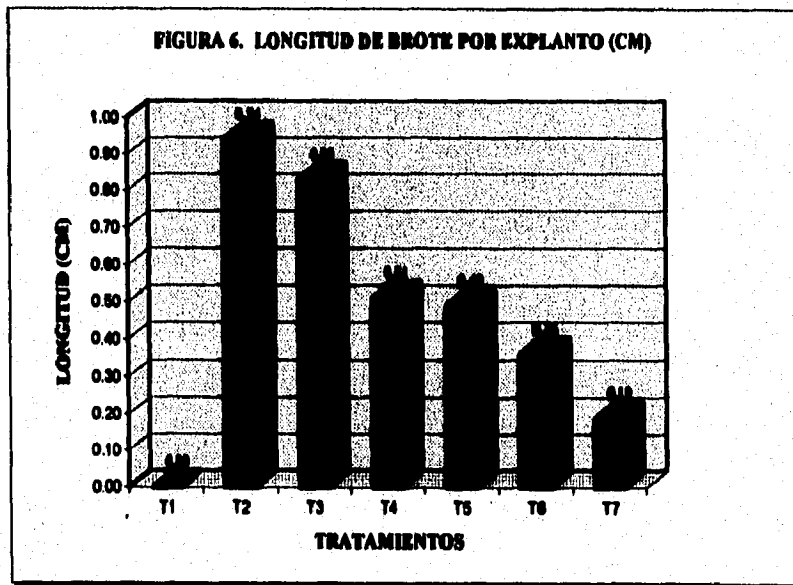
La concentración de BA en el rango de 1.5 a 2.5 no mostró diferencias estadísticas respecto a la longitud de brote, presentándose un promedio de 0.36 a 0.51 cm.

Los tratamientos 7 y I (testigo) fueron los que menor respuesta presentaron respecto a esta variable y resultaron ser estadísticamente similares. Aunque en el caso del testigo, el dato correspondiente a la longitud de brote es cero, debido a que tampoco hubo respuesta para las variables: número de brotes y formación de callo. Con esto se aprecia que es necesaria la adición de citocininas para inducir, en primer lugar, la formación de callo y posteriormente, el desarrollo de brotes.

En general, se puede decir que el desarrollo que lograron los brotes fue sobresaliente con longitudes promedio de hasta 0.94 cm. y 11.14 brotes a las doce semanas del establecimiento, teniéndose en poco tiempo material completamente desarrollado. Sin embargo, no existen referencias precisas respecto a la longitud alcanzada por los explantos, ya que de los trabajos revisados ninguno reporta datos para esta variable.

CUADRO 9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LONGITUD DE BROTES.					
FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
TRAT.	6	4.69	0.78	47.56	0.05= 2.33 * 0.01= 3.27 **
ERROR	42	0.69	0.0164		
TOTAL	48	5.38			

CUADRO 10. COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LONGITUD DE BROTES MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY.	
Trat. 2 = 0.94 a	$DMHS = 4.39 \sqrt{\frac{0.0164}{7}}$ $DMHS = 0.2125$ $\alpha 0.05 = 4.39$
Trat. 3 = 0.83 a b	
Trat. 4 = 0.51 c	
Trat. 5 = 0.49 c d	
Trat. 6 = 0.36 c d e	
Trat. 7 = 0.19 e f	
Trat. 1 = 0.0 f	



5.5. LONGITUD DE RAÍZ.

El análisis estadístico para la variable longitud de raíz, muestra que existen diferencias altamente significativas entre los niveles de BA utilizados (Cuadro 11).

La comparación de medias para longitud de raíz, mediante la prueba de Tukey, indica que los tratamientos 2 y 3 son estadísticamente iguales con 1.41 y 0.96 cm de longitud, respectivamente. (Cuadro 12). Los datos anteriores resultaron, por mucho, superiores a los obtenidos en los tratamientos 4, 5, 6, 7 y 1 (Figura 7). Con estos resultados, se observa que al incrementar los niveles de citocininas disminuyó la formación de raíces hasta prácticamente ser nula, en concentraciones de 2.0 a 3.0 mg/l.

Pierik (1976); Pierik *et al.* (1979) y Geier (1986) reportan el efecto negativo de los altos niveles de BA sobre la emisión de raíces. Ante esta situación, estos investigadores utilizaron otro medio de cultivo, exclusivo para el enraizamiento de los brotes.

Sin embargo, en la presente investigación la emisión de raíces lograda en los tratamientos 2 y 3 resultó suficiente para extraer las plántulas de los frascos y lograr su aclimatación, sin que hubiera pérdidas considerables.

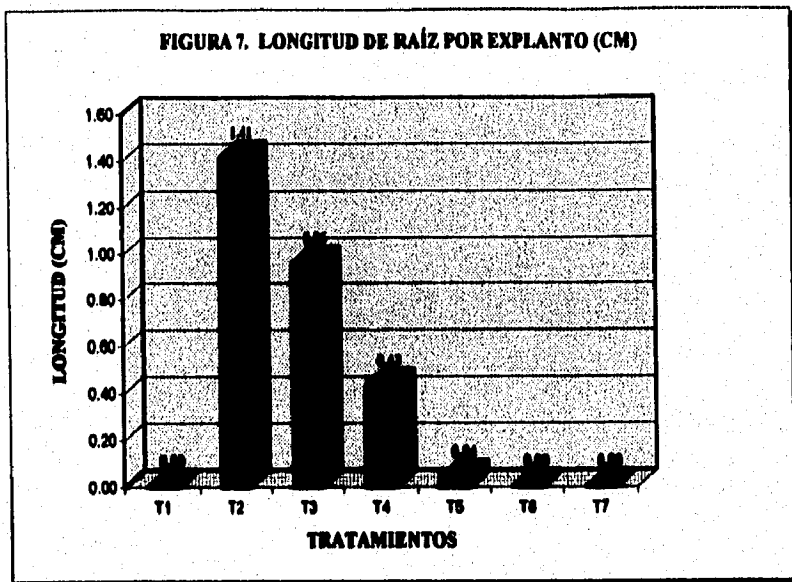
En definitiva, los resultados obtenidos con el tratamiento 2 a un nivel de 0.5 mg/l. de BA y con 0.1 mg/l de AIB difieren en gran medida de lo reportado en otras investigaciones. Si bien es cierto que ya se utilizaba el BA, en concentraciones de 0.5 a 2.0 mg/l., para favorecer el desarrollo de callo y brotes, no se consideraba aún al AIB como un factor adecuado para incrementar la capacidad regenerativa de los callos, incrementar el número de brotes, y a la vez favorecer el enraizado de las plántulas, sin la necesidad de utilizar dos o más medios de cultivo; con el consiguiente ahorro de una fase.

CUADRO 11. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LONGITUD DE RAÍZ.					
FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
TRAT.	6	13.63	2.27	26.77	0.05= 2.33 * 0.01= 3.27 **
ERROR	42	3.56	0.0848		
TOTAL	48	17.19			

CUADRO 12. COMPARACIÓN DE MEDIAS EN LONGITUD DE RAÍZ MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY.	
Trat. 2 = 1.41 a	$DMHS = 4.39 \sqrt{\frac{0.0848}{7}}$ $DMHS = 0.4833$ $\alpha 0.05 = 4.39$
Trat. 3 = 0.96 a b	
Trat. 4 = 0.43 c	
Trat. 5 = 0.04 c d	
Trat. 6 = 0.00 c d	
Trat. 7 = 0.00 c d	
Trat. 1 = 0.00 c d	

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

FIGURA 7. LONGITUD DE RAÍZ POR EXPLANTO (CM)



VI.- CONCLUSIONES.

La formación de callo y la proliferación de brotes, en los explantos de anturio, se logró con niveles de BA entre 0.5 y 3.0 mg/l., más 0.1 mg/l. de AIB.

La mayor formación de raíces en los explantos fue posible en las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/l. de BA con 0.1 mg/l. de AIB. A medida que se incrementó el nivel de BA disminuyó la formación de raíces hasta prácticamente ser nula.

La concentración óptima de BA para lograr una rápida regeneración de plántulas fue de 0.5 mg/l. Así mismo, es posible que la adición de la auxina AIB sea un factor importante para mejorar la capacidad de regeneración en los explantos y el enraizamiento de los mismos.

La obtención de plántulas completas de *Anthurium andreaeanum* se logró en sólo 12 semanas, desde el establecimiento del explanto hasta el enraizamiento.

En ausencia de reguladores de crecimiento no fue posible lograr regeneración alguna sobre los explantos de anturio.

VII.- BIBLIOGRAFÍA.

- Alvarez, A.M. (1991). Proceeding of the third *Anthurium* blight Conference, May 23-24, 1990 at the University of Hawaii USA. In: Review of Plant Pathology. Vol. 70 No. 4: 272-274.
- Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S. (1990). Handbook of plant cell culture. Vol. 5 Ornamental species. McGraw-Hill Publishing Company. USA.
- Arellano, R.A. (1991). Recomendaciones de un productor holandés para cultivar anturios en México. Boletín Holandés de Flores y Plantas. Imprenta Paralelo Creativo, S.A. México, D.F. pp. 10-11.
- Bailey, L.H. (1977). Manual of Cultived plants. MacMillan Publishing Co.Inc. New York. pp. 184-185.
- Barba, A.A. (1994). Reguladores del crecimiento vegetal. En: Hurtado, M.D. y Merino, M.M. (1994). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. pp.48-66.
- Bengochea, T. y Dodds, J. (1983). Uso de cultivo de tejidos para almacenar material genético en plantas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Ciencia y Desarrollo. Jul. - Ago. Num. 51 Año IX. p. 60-64.
- Croat, T.B. (1983). A revision of the genus *Anthurium* (Araceae) of México and Central America Annals of the Missouri Botanical Garden. 70:211-220.
- Cruz, P.F. (1983). Propagación *in vitro* de manzano (*Malus pumila* Mill). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.U.N.A.M.

- Debergh, P.C. and Maene, L.J. (1981). A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*. 14: 335-345.
- Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (1991). *Micropropagation. Technology and aplication*. Kluver Academic Publishers. Dondrecht, Netherlands. 219 p.
- Del Rosario, A.G. (1990). *In vitro* culture of four *Anthurium* cultivars: histological development and effect of different culture media. College, Laguna (Philippines).
- Finnie, J.F. and Staden, J.V. (1986). *In vitro* culture of *Anthurium andreaum*. *S. Afr. J. Bot.* 1986, 52:343-346.
- Foja, S. and Sangama. (1991). Micropropagation and plant conformity in *Anthurium andreaum*. Horticulture-new technologies and aplications. Proceedings of the International Seminar of New Frontiers in Horticulture. Bangalore, India. November 25-28, 1990.
- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.H. and Vasil, Y.K. (1976). Plant Tissue Culture Media. *In Vitro*. 12: 473-478.
- Geier, T. (1982). Morphogenesis and Plant Regeneration from spadix fragmens of *Anthurium scherzerianum* cultivated *in vitro*. In: Plant Tissue Culture. Tokyo, Japan. pp. 137-138.
- (1986). Factors afecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium andreaum* (araceae) culture *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 6:115-125. .

- (1990). *Anthurium*. In: Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S. (Eds.) Handbook of plant cell culture. Vol. 5 Ornamental species. McGraw-Hill Publishing Company, New York. p.228-252
- Graf, S.P. (1974). Araceae: *Anthurium*. In: Pictorial Cyclopedía of Exotic plants. pp.129-138.
- Guevara, B.E. (1987a). Métodos y medios de cultivo. En: II Curso de Cultivo de Tejidos. Memoria. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Catie, Turrialba, Costa Rica. Abril 1987. pp. 22-57.
- (1987b). Reguladores de crecimiento. En: II Curso de Cultivo de Tejidos. Memoria. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Catie, Turrialba, Costa Rica. Abril 1987. pp. 58-79.
- Hara, H.A., Nishijima, W.T. *et al.* (1989). Mechanical injury primary type of unmarketable *Anthurium* flowers in Hawaii. Hortscience 24(5): 846-847.
- Hartmann, H.T. y Kester, D.E. (1988). Propagación de plantas. Principios y prácticas. C.E.C.S.A., México. 814p.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E. and Davis, F.T. (1990). Plant propagation. Principles and Practices. Prentice Hall Career & Technology. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Higaki, T. and Watson, D.P. (1972). Anthuriums culture in Hawaii. University of Hawaii. Cooperative Extension Service Circular 420. p. 20.
- Higaki, T., Rasmussen, H.P. and Carpenter, W.J. (1984). A study of some morphological and anatomical aspects of *Anthurium andreanum* Lind. University of Hawaii at Hilo. Research series 030. p. 12.

- Hirunratana, C.O. (1988). Micropropagation of *Anthurium andreaum* Lind. Bangkok (Thailand), 48 p.
- Hu, G.Y. and Wang, P.J. (1983). Meristem, shoot tip and but culture. In: Evans, D.A., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (Eds.): Handbook of plant cell culture: Techniques for propagation and breeding. McMillan. New York, USA. Vol. 1.
- Hurtado, M.D.V. y Merino, M.M.E. (1994). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. 232 p.
- Keller, E.R., Brehmer, M. and Hofer, E. (1986). Micropropagation of *Anthurium andreaum* Lind. and the use of novel stabilizing substrate. Arch. Gartenbay, Berlin 34 (3):149-156.
- Kuehnle, A.R. and Sugii, N. (1991). Callus induction and plantlet regeneration in tissue cultures of hawaiians anthuriums. Hortscience. (USA). V.26(7). pp.919-921.
- Kunisaki, J.T. (1977). Tissue culture of tropical ornamental plants. Hortscience 12: 141-142.
- (1980). *In vitro* propagation of *Anthurium andreaum* Lind. Hortscience 15 (4):508-509.
- Lightbourn, G.J. and Prasad, P.V.D. (1990). *In vitro* techniques for rapid multiplication of four varieties of *Anthurium andreaum* in Jamaica. Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulturae. 1990 (34):3-5.
- López, P.C. (1985). Medios de cultivo. En Rosell, C.H., Villalobos, A.V.M. (1985). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Méx. p.15-19.

- Margara, J. (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiology*. 25:135-166.
- and Skog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* V.15 (1): 473-497.
- Murguía, G.J. (1991). El cultivo de anturios (*Anthurium andreanum* Linden). Memoria de Segundo Congreso Nacional sobre Horticultura Ornamental UPAEP-SEP-Puebla, México. p.10.
- (1993). El cultivo de anturios. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas. Folleto Técnico Num. 1. Córdoba, Ver. México. 28 p.
- Navarro, U.S. y Vera, E.R. (1994). Historia del cultivo de tejidos vegetales. En: Hurtado, M.D.V. y Merino, M.M.E. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, México. pp.15-34.
- Pierik, R.L.M. (1975). Callus multiplication of *Anthurium andreanum* Lind. in liquid media. *Neth. J. Agric. Sci.* 23:299-302.
- (1976). *Anthurium andreanum* Plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. *Physiol. Plant.* 37:80-82.
- (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editorial Mundi-Prensa.
- and Steegmans, H.H.M. (1976). Vegetative propagation of *Anthurium scherzerianum* Schott. through callus cultures. *Scientia Horticulturae*. 4:291-292

- Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. and Van Der Meys, J.A.J. (1974). Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andreaeanum* Lind. Science Horticulturae 2: 193-198.
- Pierik, R.L.M., van Leeuwen, P., and Rigter, G.C.C.M. (1979). Regeneration of leaf explants of *Anthurium andreaeanum* Lind. *in vitro*. Neth. J. Agric. Sci. 27:221-226.
- Rosell, C.H. y Villalobos, V.M. (1990). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO UNESCO. Roma, Italia.
- Saenz, C.A. (1992). En 2300 m² anturios de Holanda crecen en Colón, Qro. Floricultura Intensiva. No. 12:16-18.
- Sagawa, Y. and Kunisaki, T.J. (1990). Micropropagation of floriculture crops. In: Ammirato, P.V.; Evans, D.A.; Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S. (eds.): Handbook of plant cell culture. Ornamental species. McGraw-Hill. New York. Vol.5: 25-56.
- Sheffer, R.D. and Kamemoto, H. (1979). Cross compatibility in the genus *Anthurium*. J. Americ. Soc. Hort. Sci. 101 (6): 709-713.
- Soczek, U. and Hempel, M. (1989). Effect of cytokinins on growth and development of *Anthurium* X *Cultorum* Birsey shoot explant *in vitro*. Acta Horticulturae, Num.251: 249-254.
- Vera, E.R. (1994). Bioestadística aplicada al cultivo de tejidos vegetales. En: Hurtado, M.D.V. y Merino, M.M.E. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. pp. 162-198.