

49
20j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE SALES, COMPUESTOS ORGANICOS Y
REGULADORES DE CRECIMIENTO EN**

Rosa chinensis in vitro.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

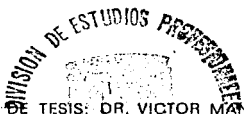
B I O L O G A

P R E S E N T A :

HILDA FRIAS PALOS



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1997



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

M. en C. Virginia Abrín Baule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto de Sales, compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento
en Rosa chinensis in vitro.

realizado por Hilda Frías Palos.

con número de cuenta 7685116-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario
Propietario
Propietario
Suplente
Suplente

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Dr. Guillermo Laguna Hernández

Dra. María Esther de la Rosa Duque

Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco

Consejo

Biología

C. Alejandro Martínez Mena
C. [Redacted] [Redacted]
DE BIOLOGÍA

¡GRACIAS DIOS, POR DARME AMOR!,

¡GRACIAS DIOS, POR DARME VIDA!,

¡GRACIAS DIOS, POR HACERME COMO YO SOY!.

HILDA ARACELI PEREZ FRIAS.

EN LA VIDA HAY OBSTACULOS QUE DEBES VENCER A TODA COSTA,
ES MUY DIFICIL, YO LO SE;
PERO TENER FE, ES TENER A DIOS EN TU CORAZON

HILDA ARACELI PEREZ FRIAS.

DEDICATORIA

A Dios, por darme y sobre todo por negarme, lo que soy y lo que no soy.

A mi hija, Hilda Araceli, por brindarme la oportunidad de reencontrarme con la vida y el amor.

A mis amados padres, los mejores que pude tener.

A mis queridos hermanas y hermanos por enseñarme, a intentar, con sus actos, a tolerar y respetar al ser humano.

A mis amigos, Fortino Mercado, Víctor Manuel Chávez Avila, Federico García Santibañes, Graciela Zarazúa, Ricardo Anaya, e Isidoro Martínez por enseñarme, a intentar, confiar y dar sin esperar.

A quienes sin estar consiente de ello, me brindaron la oportunidad de levantarme y continuar una y otra vez.

A todos aquéllos que son buscadores de la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida escuela, Fac. Ciencias UNAM, personificada por el Dr. Víctor Manuel Chávez Avila y Dra. Judith Márquez, por su calidad humanitaria y capacidad de enseñanza.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, representado dignamente por el Dr. Federico García Santibañes y Dra. María Esther de la Rosa Duque; donde se realizó este trabajo, y a cada una de las personas que participaron de cualquier forma en su realización.

A mis sinodales, por sus valiosas aportaciones y comentarios a esta tesis.

Al Ingeniero, sobre todo amigo, Ricardo Anaya, por su instrucción y ayuda en computación.

INDICE

	Pág.
Abreviaturas empleadas	1
Resumen	2
Introducción	6
Historia de la Rosa	9
Descripción Botánica	13
Importancia Económica	13
Cultivo de Tejidos Vegetales	
Historia	20
Asepsia	23
Medio Nutritivo	24
Sales Minerales	24
Compuestos Orgánicos	26
Carbohidratos	28
Sistema de soporte	30
Reguladores de Crecimiento	31
Explante	36
Su Origen	37
Tamaño del Explante	37
Estado fisiológico	38
Genotipo	38
Luz	39
Fotosíntesis	39
Fotomorfogénesis	40
Temperatura	41

Efecto de Sales, Compuestos Orgánicos y Reguladores de Crecimiento en *Rosa chinensis* in vitro

Subcultivos	41
Antecedentes	42
Objetivos	45
Materiales y Métodos	
Plantas Donadoras o Plantas Madre	46
Equipo	46
Explantos, Desinfección y Siembra	46
Medio de Cultivo	47
Adaptación a condiciones de invernadero	49
Parámetros de medición de resultados	50
Tabla 1. Medios con Sales MS 100%	51
Tabla 2. Medios con 8, 24, 50 % de sales MS	51
Tabla 3. Medios con sales MS 120%	52
Resultados y Discusión	
Efecto de la variación de la concentración de sales. Oxidación y sobrevivencia de explantes	53
Respuestas Morfogenéticas	59
Efecto de los compuestos orgánicos	61
Efecto de los reguladores de crecimiento	62
Aclimatación en Invernadero	73
Tabla 4. Cultivo <u>in vitro</u> de yemas de <u>Rosa chinensis</u>	75
Conclusiones	76
Apéndice	
Medio de Cultivo MS	84
Fitohormonas	85
Acido Giberélico	85
Bibliografía	86

ABREVIATURAS EMPLEADAS.

AG,	Acido Giberélico.
AIA.....	Acido Indol-3- Acético.
ANA.....	Acido 1-Naftalén Acético.
BA.....	6-Bencilaminopurina.
B5.....	Medio de cultivo de Gamborg, Miller y Ojima (1968).
2, 4-D.....	ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
ININ.....	Instituto Nacional de Energía Nuclear.
MS.....	Medio de Cultivo Murashige & Skoog (1962).
K.....	6 Furfuril Aminopurina, Kinetina.

RESUMEN.

La rosa es una planta que ocupa un lugar muy especial entre las especies ornamentales, existen casi 300 especies y unas 30,000 variedades, es cultivada por la belleza de sus flores y la fragancia de sus aceites esenciales, los cuales son usados en la fabricación de perfumes. En la industria mundial de la producción de flor fresca de corte, tan sólo el mercado de Estados Unidos compra 300 millones de rosas de híbridos de Té y 120 millones de rosas floribundas con un valor comercial de 79 millones de dólares anuales.

Por la dificultad que presentan en su enraizamiento algunas rosas se cultivan como patrones. La mayoría de las rosas con calidad ornamental se propagan por injerto, pero este proceso es lento, consume mano de obra y puede llevar a la transmisión de enfermedades. Debido a estos factores, muchas empresas buscan una alternativa que llegue a reducir la dependencia que hay de los injertos.

Una de las especies de mayor importancia comercial en nuestro país es Rosa chinensis (Foto 1), que podría derivar beneficios económicos si en su producción se aplican en forma intensiva y extensiva métodos modernos de propagación por cultivo de tejidos que permitiría una producción en corto tiempo, controlada, libre de patógenos, independiente de factores climáticos adversos y facilitaría la obtención de nuevas variedades mejoradas.

El sistema más recurrido para ello es el cultivo de tejidos. A través de este sistema se puede inducir la producción de callo y la proliferación de brotes y/o raíces, además el cultivo de yemas axilares o apicales puede de manera directa, llevar a la producción de un gran número de plantas en un tiempo relativamente corto al promover su desarrollo in vitro.

Debido a lo cual, en el presente estudio se planteó el siguiente objetivo: variar las condiciones experimentales (medio nutritivo MS y fitorreguladores) para lograr la regeneración de plantas completas de Rosa chinensis a partir del cultivo in vitro de yemas.

Se encontró que en términos generales, los medios con más bajas (8% y 24%) y las más altas (120%) concentraciones de sales, provocaron la muerte de la mayoría de los explantes, básicamente por dos causas: a) alteración de los niveles de los nutrientes minerales y b) una fuerte necrosis provocada por oxidación de compuestos fenólicos.

En base a nuestros resultados, se recomienda para evitar estos efectos nocivos, una primera etapa con un medio bajo en sales MS de 50%, posteriormente subcultivar los explantes a un medio con una mayor concentración de sales (100%). Además de la adición de 400 mg/l de carbón activado.

Efecto de Sales, Compuestos Orgánicos y Reguladores de Crecimiento en *Rosa chinensis* in vitro.

Existe un efecto estacional en la respuesta de los explantes cultivados provocado por la condición fisiológica de la planta madre.

No se observaron diferencias de desarrollo ó morfológicas atribuibles a los compuestos orgánicos (vitaminas, glicina inositol), fueron más determinantes las concentraciones de sales.

Los mejores tratamientos hormonales que promovieron el desarrollo de las yemas, fueron BA 2 mg/l (medio a) o BA 3 mg/l (medios c y b) en combinación con AIA 0.3 mg/l. Por cada explante de yema se obtuvo 4 brotes.

En los medios en que ocurrió una severa oxidación, la presencia de BA en altas concentraciones se promovió aún más la necrosis de los tejidos, quizá por hacer más sensible a las células ante la oxidación.

Las irregularidades en cuanto a la longitud alcanzada por las yemas en desarrollo en un mismo tratamiento, pueden atribuirse a que los explantes se disectaron a lo largo de los tallos de distintas plantas y lo que se observa en nuestros resultados, es la manifestación de la influencia de la dominancia apical. En nuestro trabajo ésta se logró romper al aplicar una combinación de BA 2 mg/l, 0.3 mg/l de AIA.

La concentración óptima, en éstas condiciones, de AG, fue de 0.15 mg/l, con la cual se elongaron más los brotes, y desarrollaron el mayor número de hojas con un aspecto normal.

INTRODUCCION

La familia Rosaceae esta integrada por 115 géneros y mas de 3,200 especies, repartidas por todo el planeta. Tiene una gran importancia económica, muchas especies son plantas frutales de cultivo: el manzano, *Pyrus malus*; el peral, *Pyrus communis*; el durazno, *Prunus persica*; el chabacano, *Prunus armenica*; el ciruelo, *Prunus domestica*, el cerezo, *Prunus avium*; el membrillo, *Cydonia oblonga* (Sánchez, 1978), el género *Rosa* contiene cerca de 300 especies, cada una de las cuales produce flores simples típicas de cinco pétalos. En cuanto al número de variedades se conocen más de 30,000 (Ortiz, 1991) en su mayoría con gran importancia económica industrial, tal es el caso de la industrialización de las rosas *R. borboniana*, *R. centifolia*, *R. damascena* que poseen los más aromáticos aceites, que se encuentran en las células epidérmicas de los pétalos para la fabricación de perfumes (Gupta y Shukla, 1971). En la industria mundial de la producción de flor fresca de corte, tan solo el mercado de Estados Unidos compra 300 millones de rosas de híbridos de Té y 120 millones de rosas floribundas con un valor comercial de 79 millones de dólares anuales (Hasek, 1988 citado por Larson, 1988).

Después del éxito en la multiplicación de orquídeas mediante el cultivo de meristemas reportado por Morel (1965, citado por Evans et al., 1983) se ha incrementado recientemente el interés por aplicar el cultivo de tejidos como una alternativa en la

propagación asexual en plantas ornamentales económicamente importantes, como es el caso de las rosas, debido a las siguientes ventajas:

(1) Únicamente una pequeña cantidad de tejido de la planta se necesita como explante para la regeneración de miles y potencialmente hasta millones de plantas clonales en un solo año, en tanto que esto no se logra por métodos tradicionales (Robert, 1985).

(2) Muchas especies de plantas son altamente resistentes a los métodos convencionales de reproducción asexual. La micropropagación in vitro es una posible alternativa para estas especies.

Comúnmente las rosas son propagadas por injertos, el cual es un método muy lento. Debido a este factor muchas compañías dedicadas al cultivo de esta planta ornamental, buscan poder eliminar o minimizar la utilización de injertos. Uno de los proyectos más ambiciosos, al aplicar el cultivo de tejidos es la posibilidad de eliminar completamente el uso de patrones de raíces, que se realizan actualmente, para ayudar a las rosas a obtener un crecimiento más vigoroso y resistir así, a los ataques de insectos y patógenos, o mostrar tolerancia a condiciones particulares de pH, textura, concentración de sales y temperatura al pasarlas a suelo (Ammirato et al., 1990).

(3) El cultivo de tejidos es un método que facilita el rápido intercambio en el mercado internacional de plantas ornamentales, debido a la eliminación del riesgo de introducir enfermedades, mediante las propias plantas. Gracias a esta técnica, el período de cuarentena es reducido o innecesario.

(4) Las plantas desarrolladas a partir de meristemos o yemas cultivadas in vitro son generalmente fenotípicamente homogéneas, con lo cual indican una estabilidad genética, debido a que su regeneración se lleva a cabo a través de un brote incipiente, que se ha diferenciado previamente in vivo (Mc Cown y Amos, 1979 citados por Evans et al., 1983). Así el desarrollo de la planta completa se basa únicamente en la elongación y diferenciación de la raíz. A diferencia de la organogénesis y embriogénesis in vitro, en las que se llevan a cabo modificaciones en el desarrollo del explante, que generalmente involucran la formación de callo. En estos casos la frecuencia de cambios genéticos se incrementa por las anomalías mitóticas, especialmente en forma de poliploidias y aneuploidías (Bayliss, 1973, citados por Evans et al., 1983).

Historia de la Rosa.

Las primeras rosas aparecieron en Asia central hace aproximadamente 60 millones de años. El origen de la rosa miniatura o Rosa chinensis (Foto 1), se remonta a más de 5,000 años, es una rosa pequeña procedente de China. Confucio en el año 500 A.D. las menciona al describir los jardines reales, las cita como flores rosadas o blancas. Su cruce con las rosas híbridas de té originaron gran cantidad de cambios en sus colores, así como un aumento en el tamaño de las plantas (Dowden y Thomson, 1965).

En Estados Unidos los registros fósiles más antiguos de rosas datan de 35 millones de años (Ortiz, 1991). Esto indica que la rosa existió mucho antes que el hombre, aún cuando no se tiene idea de cuándo éste comenzó a interesarse por ella.

La especie silvestre de México conocida comúnmente con los nombres de "Escaramujo", "Rosa de Moctezuma", "Garambullo", "Agabanazo" la cual florece en los meses de abril a mayo en: el Desierto de los Leones (D.F.), Cañada de Contreras (D.F.), Santa Fe (D.F.), Calacoaya (Estado de México), Carretera México-Querétaro (Sánchez, 1978), representa el ejemplo característico de estructura floral que poseían las rosas primitivas con una corola sencilla.

El árbol genealógico de las rosas modernas es increíblemente intrincado y sus inicios se pierden en la historia. Los botánicos calculan cerca de 300 especies, cada una de las cuales produce

flores simples típicas de cinco pétalos, muchas de ellas carecen de nombre común. En cuanto al número de variedades se conocen más de 30, 000 (Ortiz, 1991).

Algunas especies silvestres pueden distinguirse con relativa facilidad; el problema se presenta al tratar de identificar los antepasados de la rosa de jardín. Aún Linneo contribuyó a esta confusión, al adjudicar la categoría de especies a muchas rosas que ahora se sabe, son híbridos (Dowden y Thomson, 1965).

Estudios efectuados sobre la genética de las rosas han arrojado alguna luz sobre este tema. Parece probable que de los cientos de especies botánicas conocidas, solo nueve son realmente importantes en el desarrollo de las rosas actualmente cultivadas (Dowden y Thomson, 1965). Como conductor de ese desarrollo, el hombre ha evaluado y perpetuado ciertos caracteres definidos, el más importante es posiblemente, la transformación sufrida por los pétalos y la corola de la flor; del tipo original de cinco pétalos, pasados por semidobles, ha llegado a desarrollar el tipo doble, debido a la transformación de los estambres a pétalos, esta transformación es manifiesta aun en la rosa actual por la existencia de estambres petaloides (estambres modificados con una porción en forma de pétalo) que ilustran las sucesivas fases de transformación (Dowden y Thomson, 1965). Desde un principio, los floricultores han contribuido artificialmente, por medio de injertos, a aumentar el número de pétalos. Además del número y

forma de la flor, existen muchas otras características consideradas deseables como la fragancia, la frondosidad, el vigor del crecimiento y el tiempo de floración (Gupta y Shukla, 1971), que se han trabajado y mejorado para llegar a la transformación actual de las especies silvestres, las cuales se han ido modificando en esa dirección a través de los últimos treinta siglos.

Los injertos y cruces empleados se derivan claramente de dos grupos de antepasados: de las variedades cultivadas en Europa y Asia Menor desde los tiempos clásicos, y de las especies chinas introducidas en Europa a partir de 1790 (Dowden y Thomson, 1965).

Entre las rosas que se cultivaron en Europa antes de 1792 consideradas como rosas antiguas se encuentran: *R. gallica*, o rosa roja o del boticario; *R. damascena* y *R. damascena bifera* conocidas también como rosas de damasco; *R. alba*, o rosa blanca o rosa York; *R. moschata*, rosa mosqueta ; y *R. centifolia*, rosa de Castilla.

Todas ellas bellas y fuertes sin embargo sólo florecían una vez por año, excepto la rosa Damasco de Otoño (*R. damascena bifera*), la cual en algunas ocasiones, florecía dos veces al año.

Las rosas modernas nacieron en Inglaterra y Francia en 1792, con la llegada desde China de la *Rosa chinensis* o de Bengala. Esta planta florecía constantemente desde mayo hasta octubre, al cruzarse con las especies antiguas más robustas de *R. damascena* , *R. damascena*

bifera y R. moscheta, dieron origen a Borbones y Noisettes (Avellanas), las primeras rosas europeas de floración perenne. En 1825 llegaron a Europa otras dos especies procedentes de China: las fragantes rosas de Té "Rubor de Hulme" (R. odorata) y la Amarilla de Parke" (R. odorata ochroleuca) así en la primera mitad del siglo XIX había ya cuatro nuevos tipos de rosas de floración repetitiva en un año -las de China, de Té, Noisettes y Borbones- que podían ser cruzadas con las antiguas R. gallica, R. ianascena y R. moschata (Dowden y Thomson, 1965).

Un largo proceso de cruza produjo finalmente las vigorosas y populares híbridas reflorecientes. Estas, a su vez, se cruzaron con las rosas del Té, y a finales del siglo XIX resultaron las híbridas del Té, muy vigorosas siempre en floración y de formas exquisitas, abundan hoy día en los jardines rivalizando sólo con las Floribundas, recientemente obtenidas de la cruza de las híbridas de Té con la rosa miniatura.

En base a la genética actual se ha aclarado que estas mejoras se deben a la recombinación de genes y por otra parte a la frecuencia en que aparecen cambios somáticos basados en mutaciones espontáneas, los cuales son característicos a cada planta, las frecuencias más elevadas que se han observado se encuentran en R. chinensis (Helost, 1966) por lo cual se ha considerado un excelente material de trabajo para tratar de promover cambios genéticos y lograr variedades mejoradas.

El número cromosómico de las rosas va desde $2n=14$ a $2n=56$ pero varias especies son tetraploides.

Descripción Botánica

El género, Rosa presenta un eje floral hueco, en forma de cántaro. Cáliz de cinco pétalos foliáceos (con aspecto de hoja), extendidos o reflejos. Corola y estambres en el borde del tubo calicinal (correspondiente al cáliz). Cinco pétalos; estambres numerosos; ovarios (región ensanchada y basal del pistilo, que encierra los óvulos) libres, numerosos, ocultos en la cavidad del cáliz; estilos (parte superior del pistilo) laterales, salientes. Los frutos son aquenios (fruto seco que no abre al madurar), duros, encerrados en el receptáculo floral carnoso, de color rojo. Arbustos provistos de agujones, con las hojas compuestas, imparipinadas (hoja pinada, que termina en un folíolo). Estipulas (expansiones laminares que se observan en la inserción de algunas hojas) adheridas al pecíolo (parte de la hoja que la une al tallo) (Sánchez, 1978).

Importancia Económica.

En varios aspectos el cultivo de la rosa ha tenido implicaciones económicas en las distintas civilizaciones desde épocas pasadas, un ejemplo es la farmacopea antigua. Hipócrates incluyó a la rosa entre las plantas medicinales, si bien muchas de sus propiedades eran meras supersticiones, algunos remedios tenían propiedades terapéuticas reales. En el siglo XIII, el pueblo de Provins, en Francia, se convirtió en el centro de cultivo de la medicinal rosa

roja (*R. gallica officinalis*). La industria farmacopea de Provins duró más de 600 años, alcanzó su apogeo en el siglo XVII. Las rosas de Provins también se usaron mucho en Inglaterra y en la India. En 1860, se enviaron a América 36,000 kg de pétalos para su uso farmacéutico. Casi siempre la medicina se administró como agua de rosas. En la actualidad, todavía puede encontrarse aceite de rosas, agua de rosas y pétalos de rosas en las farmacopeas de Inglaterra y Estados Unidos, sin embargo su aplicación se limita a la rama de los cosméticos en estos países.

Precisamente cuando las rosas estaban a punto de desaparecer de la medicina, se encontró un uso científico para su fruto. Se descubrió que contienen 400% más vitamina C que las naranjas, lo cual explica en parte sus antiguos poderes curativos. Durante la segunda guerra mundial, al escasear las frutas cítricas, en Inglaterra grupos de niños y mujeres se movilizaron para recoger los frutos de las rosas y agregar con ello un poco de vitamina C a su dieta (Dowden y Thomson, 1965).

Los jarabes y las conservas de rosas -tanto de las flores como de los frutos- aunque originalmente eran medicinales, también se servían como golosinas. En la cocina romana se usaban mucho las rosas, pero su empleo casi desapareció en la Edad Media, quizá porque los primeros cristianos rechazaron firmemente las rosas, pues las asociaban con la lujuria romana. Pero una flor tan íntimamente ligada a la vida y emociones de los hombres, no podía

permanecer mucho tiempo olvidada, resurgió en el siglo XVII, volvió a ser muy popular y se mantuvo como el principal condimento durante 200 años, hasta que fueron reemplazadas por la vainilla. En la actualidad aún existen múltiples recetas en las cuales como ingrediente principal se encuentran las rosas.

Otra característica de las rosas que en la actualidad ya se ha industrializado en gran escala es su fragancia. El perfume de las rosas se debe al aceite esencial que se encuentra principalmente en las células epidérmicas de los pétalos, este aceite puede ser liberado de muy diversas maneras. El primer perfume de rosas fue el humo de pétalos quemados. Luego durante la época de los egipcios, griegos y romanos, los pétalos frescos se empapaban en aceite, agua, o alcohol. Cuando se descubrió el arte de destilar agua de rosas -probablemente por los árabes en el siglo X- este método superó a todos los otros y se produjo en asombrosas cantidades. El attar, o aceite perfumado de las rosas, siempre ha sido un producto comercial. Esta sustancia es muy cotizada industrialmente en la actualidad, a pesar de que el aceite esencial de los pétalos de rosa aparece en pequeñas cantidades en la superficie del agua de rosa destilada, se estima que 60,000 rosas producen sólo 30 g de aceite el cual parece mantequilla trasparente, en general verde o amarilla, pero algunas veces rosada o parda.

En la actualidad el valle de Bulgaria, alcanza en la producción de las rosas Damasco una calidad no igualada en ningún otro lugar del

mundo. Esta zona es el centro principal de producción de attar, sin embargo la gran industria de perfumes del sur de Francia también produce un fino aceite de rosa, ahora derivado de la Rose de Mai, un híbrido de la *R. gallica* y la *R. centifolia* la cual es el producto de muchos años de observación, selección y cuidados.

Las rosas más cotizadas por su fragancia en la industria de la perfumería son; *Rosa borboniana*, *Rosa centifolia*, *Rosa damascena* (Gupta y Shukla, 1971). Por lo que la industria requiere aumentar el contenido de aceites y la prolongación del período de floración. Por ejemplo la *R. damascena* es muy aromática pero el contenido de aceite es bajo, para mejorarlo se ha recurrido a la hibridación o a la inducción de mutaciones somáticas, estos dos métodos pueden ser usados alternativamente para obtener ventajas económicas (Galil *et al.*, 1991; Sarma y Talukdar, 1991). Para conseguir esto se han hecho numerosos trabajos en la inducción de mutaciones somáticas aplicando radiaciones ionizantes (Galil *et al.*, 1991; Dommergues, 1962; Broertjes, 1963; Helost, 1966; Nakajima, 1965; Streitberg, 1966; Yamaguchi, 1969; Walther y Sauer, 1986).

Otra industria con gran importancia en la actualidad es la producción de flor fresca de corte, Holanda tiene el primer lugar por hectáreas de producción mundial para rosas, con 829 mil hectáreas, Italia con 812 mil, Francia con 406 mil, Japón con 344 mil. Otras potencias son Israel con 140 mil y Colombia con 275 mil hectáreas; desde 1960 estos dos últimos países han incrementado

significativamente su producción en la floricultura (Verhaegh, 1991 citado por Hoyos, 1991).

Análisis de la producción mundial de flores tanto en Holanda como en EUA vaticinan que en corto plazo México podría ubicarse en los primeros lugares en la producción de flores ornamentales (Verhaegh, 1991 citado por Hoyos, 1991) su adormecido potencial, en floricultura debe terminar si se toma en cuenta que es un país en donde se puede cosechar todo el año inclusive en invierno, gracias a su situación geográfica septentrional y con luz suficiente para producir flores de buena calidad (Fjeld et al., 1994). Además México está a menos distancia de los centros florícolas de EUA, el cual es el mayor consumidor de flores de todo el planeta. Esto permitiría la disminución de costos en la producción, y se garantizaría un mayor éxito. A California podría enviar flores por tierra que permite un transporte mucho más barato. También México tiene una red de comunicaciones aéreas con una frecuencia elevada de vuelos a importantes regiones de consumo de EUA. Otro factor importante son los bajos costos de la mano de obra.

Si se toma en cuenta que más de 300 millones de rosas de híbridos de Té y 120 millones de rosas floribundas se venden tan sólo en los Estados Unidos anualmente con un valor comercial al mayoreo de 79 millones de dólares (Hasek, 1988 citado por Larson, 1988) estos datos enfatizan la importancia de que en México se desarrolle y se aplique una tecnología adecuada para la producción de flores

frescas de corte, para luego intentar incursionar en otras ramas de la industria de la rosa.

México tiene como principal limitante, el que los mercados internacionales de flores se desarrollan a gran velocidad y solamente los productores de máxima eficiencia y calidad en sus productos pueden competir, por lo cual podrá participar si cultiva flores de mejor calidad, para esto una tecnología adecuada y bien estructurada es indispensable para producir calidad exportable en combinación con un continuo aumento de productividad.

Un ejemplo claro del impacto económico de la floricultura es lo que sucede en Colombia. Más de 65 000 familias han encontrado una fuente de empleo al depender de esta industria. En esta fuerza laboral, cerca del 80% son mujeres que proveen un salario secundario a la familia. Por lo general, cada hectárea colombiana destinada a esta empresa ocupa de 12 a 15 personas (Tayama, 1991).

Las variedades comerciales de rosa son propagadas vegetativamente para mantener la uniformidad del fenotipo. Una de las técnicas modernas más eficientes es el cultivo de tejidos del que países como el nuestro podrían obtener beneficios económicos a mediano plazo. Sin embargo, a pesar de que han transcurrido ya cerca de dos décadas de que se fundó la Asociación Mexicana de Cultivo de Tejidos Vegetales y con ello ha realizado su labor de difusión de estas técnicas, (Robert y Loyola, 1985) éstas han tardado en ser

asimiladas y aplicadas por productores de plantas en nuestro país.

Para proveer el material biológico en la cantidad, la calidad y en el tiempo requerido para ésta investigación, un requisito previo es el establecimiento de las técnicas de regeneración de plantas de interés a partir, por ejemplo, de yemas vegetativas.

En el ININ, una de las metas es llegar a generar plantas ornamentales o de interés agrícola mejoradas a través de mutaciones inducidas por radiación ionizante aplicadas a material vegetativo clonado in vitro. Un tipo de estructura que facilitaría esta tarea serían yemas vegetativas, las cuales tienen una zona meristemática apical la cual posee la capacidad de regenerar todos los tejidos de una planta completa.

Por lo que si se cultivan in vitro yemas vegetativas irradiadas se podrán obtener plantas completas que manifestarán los cambios genéticos inducidos.

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

HISTORIA

La historia del cultivo de tejidos *in vitro* comenzó a integrarse con la teoría celular formulada por Schwann y Schleiden en 1838, en la que está implícito el concepto de que cada célula de un organismo es totipotente y cada célula sería capaz de tener autonomía y ejercer su capacidad regenerativa a tal grado de poder formar una planta completa bajo condiciones apropiadas externas.

Durante la última parte del siglo XIX varios biólogos hicieron observaciones sobre fragmentos de tejidos vegetales aislados.

Los primeros intentos por comprobar esta teoría, se realizaron en 1902 por Haberlandt, quien trató de cultivar tejidos vegetales *in vitro* en un medio nutritivo. Sin embargo no lo logró debido a que utilizó un medio muy simple y a que eligió células de mesófilo altamente diferenciadas (Navarro y Vera, 1987; Pierik, 1987). No obstante vislumbró que se tendrían grandes ventajas en el medio de cultivo si se emplearan fluidos del saco embrionario; y previó la posibilidad de cultivar embriones artificiales a partir de células vegetativas (Dodds y Roberts, 1982). Durante los siguientes 30 años no hubo avances significativos en el cultivo de tejidos vegetales debido a los problemas de elegir el material vegetal correcto y a la falta de medios nutritivos satisfactorios. La atención a estas limitantes llevó al siguiente gran avance, con la demostración del

crecimiento potencialmente indefinido de ápices de raíces de jitomate logrado por White en 1934, que significó el primer cultivo de órganos.

LaRue en 1936 cultivó embriones de varias gimnospermas. En 1937 Went y Thiman aislaron la auxina ácido indol acético (AIA).

Los primeros estudios sobre cultivos de callo por tiempo indefinido se publicaron casi simultáneamente en 1939 por tres distintos investigadores Gautheret, Nobécourt en Francia y White en Estados Unidos, sus estudios se realizaron con raíz de zanahoria. La meta en ese tiempo era demostrar el crecimiento ilimitado de un cultivo de células no diferenciadas.

A partir de 1941 se extendió ampliamente la utilización del agua de coco como medio de cultivo después de que Van Overbeek obtuvo resultados positivos en el cultivo de embriones de Datura.

En 1948 Skoog y Tsui obtuvieron a partir de callo de tabaco, brotes adventicios y raíces y propusieron que la organogénesis podría ser regulada químicamente por cambios en el medio.

Cuatro años después Morel y Martin obtuvieron las primeras plantas libres de virus a partir del cultivo de meristemas de tallo. Otro gran logro fue el cultivo de células en suspensión a partir de callo, por Muir en 1953.

En 1955, Skoog identificó la 6-furfurilaminopurina (kinetina). En 1957 Skoog y Miller descubrieron la regulación y formación de los órganos, raíces y brotes, al combinar distintos balances de citoquininas y auxinas. Este principio es la columna vertebral del cultivo de tejidos vegetales.

En el año de 1958 Steward et al. y Reinert, en forma independiente lograron embriogénesis somática in vitro (zanahoria) en angiospermas. Sin embargo ya en 1948 La Rue había descrito formas semejantes a embriones en germinación a partir de gametofitos femeninos de una gimnosperma, de la cicada Zamia pumila (Attree y Fowke, 1993).

Otro gran avance fue la degradación enzimática de la pared celular, para obtener protoplastos en 1960 por Cocking.

El desarrollo del medio nutritivo con sales inorgánicas de Murashige y Skoog en el año de 1962, hasta la fecha se sigue aplicando ampliamente, ha ayudado enormemente a aumentar el número y la diversidad de investigaciones in vitro.

En 1966 Guha y Maheshwari lograron el primer cultivo de plantas haploides a partir de anteras (gametofitos masculinos) en angiospermas. Ya en 1948 La Rue había obtenido plántulas haploides a partir de megagametofitos (gametofitos femeninos) la cicada Zamia pumila.

Desde la década de los años setenta la técnica de cultivo in vitro se ha utilizado en forma confiable en diversos campos como el de la genética, para seleccionar células y/o individuos mutantes in vitro con tratamiento físico, químico o sin él (variación somaclonal), han proliferado estudios de fisiología, metabolismo, organogénesis, embriogénesis, entre otros para resolver problemas científicos y tecnológicos, principalmente en las áreas hortícola, agrícola y químico-farmacéutica (Murashige, 1978).

A través del tiempo y de los trabajos integrados de múltiples investigadores, se han logrado definir los factores de mayor importancia que intervienen en el establecimiento de los tejidos in vitro y el desarrollo normal de las plántulas regeneradas (Ammirato et al., 1990; Conger, 1987; Vasil, 1984; Evans et al., 1983), entre ellos:

(1) Asepsia.

Esta condición primaria es esencial, la pérdida de inóculos y medios nutritivos causadas por agentes microbianos contaminantes, puede evitarse al utilizar autoclaves, campanas de flujo laminar, lámparas de luz ultravioleta, para esterilizar el área y el material de trabajo, así como las soluciones empleadas.

(2) Medio de Cultivo

La morfogénesis *in vitro* de brotes, raíces y embriones somáticos mediante el cultivo de tejidos puede ser controlada por el balance de la composición del medio de cultivo, el cual consiste básicamente en una mezcla de sales integrada por "macro" y "micro" nutrientes, una fuente de carbohidratos, usualmente la sacarosa. Compuestos orgánicos como aminoácidos y vitaminas, así como de concentraciones precisas de reguladores de crecimiento, que son específicas a nivel de especie, variedad y aún del estado fisiológico del individuo ensayado.

2.1 Sales Minerales.

2.1.1 Macronutrientes.

Son iones inorgánicos llamados de este modo debido a las concentraciones relativamente grandes requeridas, por las plantas, y que son mayores que las de micronutrientes.

Los macronutrientes son seis; N, P, K, Ca, Mg, y S. La selección adecuada de las sales con macronutrientes se basa en la correcta concentración y balance entre los elementos individuales. Su acción en la planta puede involucrar un mecanismo pasivo o activo, con gasto de energía (George y Sherrington, 1984). De las modificaciones más significativas que se han realizado, en la composición de las soluciones de macronutrientes, se encuentra la introducción del Nitrógeno en la forma de NH_4^+ , además del uso de

concentraciones altas de NO_3^- y del K^+ . Estos cambios han permitido la inducción de embriogénesis somática en múltiples especies (George y Sherrington, 1984).

Dentro de las principales fórmulas de macronutrientes utilizadas, se encuentra la publicada por Nitsch y Nitsch (1956 citados por George y Sherrington, 1984), en la cual se usan por primera vez altos niveles de NO_3^- y K^+ .

Murashige y Skoog (1962), formularon sales (MS), para el cultivo de tejidos del tabaco con altas concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ , y es desde su publicación el medio más utilizado en el mundo por su éxito con muy diferentes especies y distintos propósitos.

Gamborg y Wetter (1968), desarrollaron el medio B5 para cultivo de células en suspensión de soja, posteriormente se ha aplicado a otras investigaciones. Su característica principal es la baja concentración de NH_4^+ (no debe exceder a los 2 mM).

En el medio de Lloyd y McCown (1980-1981 citados por George y Sherrington, 1984), casi todos los componentes se encuentran en concentraciones bajas, a diferencia de los sulfatos cuyo contenido es muy elevado. Estas cantidades son seguidas en otros medios, ideados para especies forestales, árboles comerciales y matorrales ornamentales.

2.1.2 Micronutrientes.

Entre ellos Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co y Mo son necesarios en concentraciones pequeñas, menores que las de los macronutrientes e intervienen en la composición de las proteínas celulares, además de la gran importancia que poseen para el metabolismo y fisiología vegetal. Por lo menos cinco de estos elementos son esenciales para la síntesis de clorofila y el funcionamiento de los cloroplastos (Sundgvist et al., 1980).

2.2 Compuestos Orgánicos.

El crecimiento y la morfogénesis en el cultivo de tejidos vegetales se puede mejorar al agregar pequeñas cantidades de algunos compuestos, denominados con el término de compuestos orgánicos como son las vitaminas y los amino-ácidos.

2.2.1 Vitaminas

Las vitaminas son sustancias necesarias en las células vegetales para realizar reacciones específicas catalíticas esenciales en el metabolismo. Las más frecuentes son: tiamina (B1), ácido nicotínico y piridoxina (B6).

Las plantas intactas son capaces de sintetizarlas, sin embargo, esto no sucede en cultivos de células vegetales. En los primeros trabajos in vitro realizados, estos requerimientos se suministraron agregando complejos orgánicos, de composición química no definida, como: jugos de fruta, agua de coco, extracto de levadura, harina de pescado y caseína hidrolizada (George y Sherrington, 1984).

El desarrollo de una combinación de vitaminas de amplia aplicación comenzó con los descubrimientos casi simultáneos de Bonner (1937-1938), Robbins y Bartley (1937) y White (1937), sobre los beneficios de agregar tiamina a los medios. La adición al medio, del ácido nicotínico y la piridoxina mezclados con la tiamina, fue por primera vez publicado por Bonner (1940), seguido por Gautheret (1942) y White (1943), esta combinación es ampliamente utilizada (citados por George y Sherrington, 1984).

2.2.2 Myo-inositol.

A pesar de no ser una vitamina y de tener actividad como carbohidrato y de regulador de crecimiento, el compuesto es convencionalmente clasificado como una vitamina vegetal. Debido a su efecto estimulativo en el crecimiento de la planta y en su morfogénesis, es usado como un suplemento nutritivo. Además se encontró que interacciona con la citoquinina para promover la división celular (Letham, 1968).

Se utilizó por primera ocasión por Jacquiot (1951), a una concentración de 20-1000 mg/l. Wood y Braun (1961), después Murashige y Skoog (1962) combinaron el Myo-inositol, a una concentración de 100 mg/l, con la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina. Esta mezcla se sigue utilizando en múltiples medios (citados por George y Sherrington, 1984).

2.3 Carbohidratos.

Un número muy reducido de células vegetales aisladas y cultivadas in vitro son capaces de sintetizar sus propios carbohidratos a partir de la fotosíntesis (Larosa y col., 1981 citado por George y Sherrington, 1984) de éstos, unos cuantos cultivos autotróficos, sólo logran un crecimiento muy reducido (Fukami, 1967 citado por George y Sherrington, 1984) por lo tanto, se hace indispensable en los cultivos de células, tejidos u órganos incorporar una fuente energética de carbono dentro del medio. La sacarosa es ampliamente usada en el cultivo de tejidos, para este propósito.

El primer trabajo sobre los efectos de los carbohidratos en el desarrollo de los tejidos vegetales, fue publicado por Gautheret (1945 citado por George y Sherrington, 1984) la sacarosa resultó ser la fuente de carbono óptima, debido a la invariabilidad y calidad de los carbohidratos que la constituyen (Minocha, 1974 citado por George y Sherrington, 1984) seguida por la glucosa, maltosa y al final el azúcar doméstica refinada, lo suficientemente pura.

Sin embargo existen excepciones, como es el caso del crecimiento de los brotes a partir de las yemas apicales de la mora, las cuales no son promovidas por la sacarosa, únicamente por la maltosa, glucosa y fructosa (Oka, 1982 citado por George y Sherrington, 1984).

El sorbitol, es un suplemento de carbono que ayuda a desarrollar el cultivo de callo de la manzana (Conger, 1987), así como un crecimiento mas vigoroso en varias especies de la familia de las rosáceas (Coffin y col., 1976 citado por George y Sherrington, 1984), su baja o nula tasa de asimilación permite suponer que su papel principal es como un agente osmótico.

La disponibilidad de la sacarosa depende del rompimiento de los constituyentes de la hexosa, tal hidrólisis ocurre en el tejido (Helgeson et al., 1972). El rompimiento es acentuado, en el medio de cultivo, al ser sometido a la presión y temperatura de esterilización en la autoclave (Ball, 1953 citado por George y Sherrington, 1984).

Los niveles de sacarosa normalmente usados como soporte de crecimiento en los cultivos de tejidos, son con frecuencia inhibidores de la síntesis de clorofila (Rier, 1964 citado por George y Sherrington, 1984) pero el grado varía de acuerdo a la especie cultivada.

2.4 Sistema de soporte o estado físico del medio nutritivo.

El agar es usado exclusivamente como un agente gelificante, que proporciona un soporte sólido o semi-sólido al explante, presenta las siguientes ventajas (George y Sherrington, 1984):

- Se disuelve en agua a temperaturas superiores a 80°C, y al enfriarse forma geles estables en todos los rangos de temperaturas de incubación de tejidos vegetales.

- Los geles no son digeribles por enzimas vegetales.

- El agar no reacciona con ningún componente del medio de cultivo. La importancia del uso de agar puro es ampliamente reconocida, aunque presenta como impurezas, varios iones de polisacáridos sulfonados y largas cadenas de ácidos grasos (Chashghaie et al., 1991) que son inhibidores en el cultivo de algunas bacterias, su efecto en el desarrollo de células vegetales in vitro aún no se clarifica totalmente (Romberger, 1971 citado por George y Sherrington, 1984).

El difco "Bacto" agar es un producto ampliamente usado, sin embargo produce resultados intermedios en contraste con el mejor crecimiento de meristemas de clavel obtenidos al aplicar el agar Difco "Noble" que es más puro (Davies y Hopwood, 1980).

2.5 Reguladores de Crecimiento.

Entre los compuestos sintetizados en el interior de los tejidos de la planta (endógenos), los reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal son generalmente activos a concentraciones muy bajas y se les conoce como hormonas vegetales.

Los compuestos sintetizados químicamente con similares actividades fisiológicas de estas sustancias de crecimiento, o de compuestos con la capacidad de modificar el crecimiento vegetal, son denominados con el término de reguladores de crecimiento o fitorreguladores para indicar que en realidad son sustancias inductoras, externas al tejido vegetal (exógenos) (George y Sherrington, 1984; Ammirato et al., 1990).

Los Reguladores de Crecimiento son:

2.5.1 Auxinas.

2.5.2 Citoquininas.

2.5.3 Giberelinas.

2.5.4 Etileno.

2.5.5 Acido Abscísico.

La morfogénesis de brotes y raíces in vitro parece ser universal y controlado comúnmente por el balance de dos clases de hormonas, las citoquininas y las auxinas, de acuerdo con el modelo propuesto por Skoog y Miller en los años 50', se postula que a mayor concentración de citoquininas en relación a las auxinas se favorece

el desarrollo de brotes, y en concentraciones mayores de auxinas, se forman raíces. Los requerimientos hormonales en el medio parecen depender principalmente de la relativa disponibilidad de sus concentraciones endógenas en el tejido de cada especie (Hussey, 1978).

2.5.1 Auxinas.

Las auxinas son capaces de controlar varios procesos distintivos, tales como el crecimiento y elongación celular. La auxina natural, el AIA (ácido 3-indolacético) es más común, pero menos activa. La concentración y tipo de auxina requerida depende según George y Sherrington (1984) principalmente de:

- El tipo de crecimiento y desarrollo deseados.
- El nivel natural de la auxina dentro del explante, en el momento de ser disectado.
- La capacidad del tejido cultivado, para sintetizar en forma endógena la auxina.
- La interacción, de alguna forma, entre la auxina sintética aplicada y las sustancias endógenas de la planta.

Auxinas Sintéticas.

- 1.- 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)
- 2.- IBA (ácido indol-3-butírico)
- 3.- NAA (ácido 1-naftalén acético)

Entre las auxinas más utilizadas se encuentran: un análogo sintético del ácido indol 3-acético (AIA), el ac. indol 3- butírico (IBA) catalogado como el de mayor actividad y estabilidad. El ácido 1-naftalén acético, es también muy usado; un compuesto altamente activo es el 2,4-diclorofenoxi- acético, 2,4-D, es el más efectivo para la formación de callo, sin embargo posee el inconveniente de llegar a inhibir la formación de brotes (Hussey, 1978), además de inhibir la formación de clorofila en callos y células en suspensión (Ammirato *et al.*, 1990), este último efecto es menor, al aplicar AIA y NAA al medio de cultivo (Davey y col. 1971 citado por George y Sherrington, 1984).

2.5.2 CITOQUININAS.

Son sustancias endógenas reguladoras de crecimiento vegetal e intervienen en la morfogénesis en el cultivo de tejidos. Las hay naturales y análogas sintéticas.

Algunos de sus efectos en el tejido vegetal son en la división celular. Su ausencia provoca un alargamiento en la metafase de la mitosis, esto ha sugerido que las citoquininas pueden ser requeridas para regular la síntesis de proteínas (Cline, 1994)

involucradas en la formación y funcionamiento del uso mitótico (Jouanneau, 1970, 1975 citado por George y Sherrington, 1984). Las citoquininas son muy efectivas en promover la iniciación de brotes, concentraciones altas son aplicadas, para reducir la dominancia apical, de esta forma el crecimiento de las yemas axilares se incrementa (George y Sherrington, 1984). A concentraciones de 0.5 - 10 mg/l, también puede inhibir la formación de raíz (Burger y Liu 1990; Harris, 1964 citado por George y Sherrington, 1984; Torres, 1989; Davies, 1980; Hasegawa, 1979, 1980).

La primer citoquinina descubierta fue la Kinetina aislada por el profesor Skoog, con ella logró promover el crecimiento continuo de callos de tabaco. A pesar de la presencia natural de las citoquininas en todas las plantas, muchos tejidos y órganos aislados cultivados in vitro son incapaces de sintetizar suficiente concentración de ellas (Letham, 1968), por lo cual es de suma importancia el suministro de citoquininas exógenas. Sin embargo en monocotiledóneas se ha logrado cultivar callos en ausencia de auxinas y citoquininas (Kemp y Stoltz, 1979 citados por George y Sherrington, 1984). También se ha encontrado que las citoquininas tienden a promover la formación de clorofila en callos y en células en suspensión (Davey y col, 1971 citado por George y Sherrington, 1984).

Diferentes análogos químicos de citoquininas naturales son preparados principalmente a partir de derivados de la 6- adenina.

Las citoquininas más empleadas son: kinetina, K, es la menos activa; 6-benzilaminopurina, BA y la gama-gama-dimetilaminopurina, ZIP.

2.5.3. Giberelinas.

Son compuestos químicos naturales, se han aislado de los tejidos vegetales más de 50 giberelinas, pero sólo 2 o 3 compuestos activos son viables comercialmente. Se aplican a las plantas para acelerar su crecimiento y desarrollo de varias formas, por ejemplo para incrementar la longitud del tallo, para promover la floración o el desarrollo del fruto. Estos efectos son debidos a la estimulación de la síntesis y activación de enzimas específicas y/o a la disponibilidad de auxinas endógenas, provocada por las reacciones de las giberelinas. Además a nivel molecular, se ha encontrado que el ácido giberélico promueve el crecimiento debido al incremento de transporte del ión potasio (De la Guardia y Benlloch, 1980 citados por George y Sherrington, 1984).

2.5.4. Etileno.

Es un gas C_2H_4 atmosférico, el cual también se produce en las plantas completas y en los cultivos de raíces, tallos y hojas vegetales. El papel del etileno en el cultivo in vitro aún no es claro. Sin embargo, se ha observado en el cultivo de células de *Rosa hybrida*, que el aumento en la producción de etileno y su acumulación en el tubo de ensayo incrementa el requerimiento de AIB o AIB en $1-1 \text{ mg/l}$ y de IAA en $1-1 \text{ mg/l}$ de citoquininas (Wolfe y Sussals, 1980 citados por George y Sherrington, 1984).

Se han encontrado mayores concentraciones de etileno producido por tejidos no morfogénéticos que en aquellos que si son regenerativos, y en el caso de formarse brotes o embriones éstos presentan malformaciones (Aubuiron et al., 1990; Wann et al., 1987).

2.5.5 Acido Abscísico.

Es otra sustancia natural de crecimiento, la cual es sintetizada en los plastidios o los cloroplastos de la planta (Milborrow, 1974 citado por George y Sherrington, 1984). El ácido abscísico es generalmente considerado como un inhibidor de crecimiento, además de estar involucrado en la abertura de estomas, y en el cultivo de tejidos se ha sugerido que puede modificar la síntesis o las actividades de las citoquininas (Van Overbeek, 1967 citado por George y Sherriton, 1984). Se ha reportado la existencia de un efecto sinérgico del ácido abscísico (Scotti y Pais, 1990; Jacobs et al., 1970), al unirse con las auxinas, para promover el desarrollo de raíz (Basu, 1970 citado por George y Sherrington, 1984).

3.- Explante.

Es una porción de tejido, órgano o son células aislados de la planta. El cultivo del explante esta influenciado por factores inherentes al mismo, tales como su origen, genotipo, estado fisiológico (edad) y dimensiones (George y Sherrington, 1984; Evans et al., 1983).

3.1 Su Origen.

En general, los explantes tomados de individuos maduros son menos morfogénicos que los de individuos jóvenes. Además, ápices del brote, yemas axilares, tejidos embrionarios, cambium, son más morfogenéticos que hojas, raíces o entrenudos.

Existe una capacidad regenerativa diferente, influenciada por la posición o polaridad original del explante en la planta, (Van-Acker, 1994) de tal forma que los brotes de Echeveria elegans se desarrollan con mayor frecuencia si su origen se encuentra en la parte distal de las hojas maduras, en comparación con los explantes extraídos de los segmentos proximales (Raju y Mann, 1971 citados por George y Sherrington, 1984). Esto mismo ocurre con los explantes de hoja de la orquídea Phalaenopsis (Tanaka, 1975 citado por George y Sherrington, 1984). En los explantes de raíz y tallo, la morfogénesis es mayor si el explante tiene un origen proximal (Bowes, 1976a citado por George y Sherrington, 1984).

3.2 Tamaño del Explante.

En términos generales los explantes de mayor tamaño, sobre todo en el cultivo de yemas, las de mayor tamaño serán más regenerativas que las pequeñas, y éstas más regenerativas que los meristemas aislados.

Existe con frecuencia un tamaño óptimo del explante, que se debe determinar según la especie y la estructura utilizada en el cultivo

in vitro. La sobrevivencia de un explante muy pequeño es muy baja en el medio de cultivo, y un explante grande pueda tener dificultades de contaminación o presentar problemas en su manipulación (Davies y Hopwood, 1980; Dale, 1980 citado por George y Sherrington, 1984).

3.3 Estado fisiológico.

Entre otros factores fisiológicos, la edad influye en la capacidad morfogénica. Teóricamente de cualquier estructura vegetal debe ser posible regenerar plantas, sin embargo, la experiencia ha demostrado que los embriones y tejidos de plántulas son morfogénicamente más plásticos que los tejidos maduros (Ammirato et al., 1990).

3.4 Genotipo.

En general en los cultivos de tejidos, el crecimiento, así como su morfogénesis, son probablemente más influenciados por el genotipo que por cualquier otro factor. Debido a lo cual el medio y el desarrollo del cultivo, con frecuencia necesita ser modificado según el género o especie trabajada (George y Sherrington, 1984). La experiencia ha demostrado que algunas leguminosas, cereales, pastos, angiospermas leñosas y especialmente gimnospermas son difíciles de regenerar in vitro, o bien ésto no se ha logrado (Ammirato et al., 1990).

Un ejemplo en el cual se observa la importancia del genotipo es en el desarrollo de las líneas puras de cultivos de tomate, en comparación de sus recíprocos híbridos, estos últimos poseen una mayor capacidad en la inducción de brotes en una misma combinación de auxinas y citoquininas. La manera en que los genes determinan el crecimiento de tejidos y órganos in vitro no ha sido aclarado totalmente (Bigot, 1977 citado por George y Sherrington, 1984).

4. Luz.

La luz es energía radiante con longitudes de onda que produce la sensación visual en el ojo, además de influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, (Fjeld et al., 1994) es un requerimiento esencial debido a su participación en:

4.1 La Fotosíntesis.

Es el proceso mediante el cual la energía luminosa es convertida en energía química para la biosíntesis de carbohidratos a partir del bióxido de carbono y agua.

Sólo en un número reducido de cultivos in vitro se ha demostrado que los tejidos realizan fotosíntesis, la que en ocasiones es suficiente para mantenerlos vivos y aún en crecimiento.

4.2 La Fotomorfogénesis.

Se refiere a la inducción que ejerce la luz, en el desarrollo de estructuras organizadas del inóculo. En este fenómeno no necesariamente esta involucrada la absorción de grandes cantidades de energía luminosa (Tsuji y Dutton, 1983). Se han propuesto sistemas de receptores lumínicos (Yasuhira et al., 1991) que optimizan la morfogénesis vegetal (Huguette et al., 1991; Capellades et al., 1990; George y Sherrington, 1984).

Tanto en la fotosíntesis como en la fotomorfogénesis intervienen pigmentos clorofílicos presentes en los cloroplastos de los tejidos, los cuales absorben radiaciones con longitudes de ondas particulares (George y Sherrington, 1984).

La fotosíntesis no se lleva a cabo en forma importante en la mayoría de los cultivos in vitro y mantienen una conducta principalmente heterótrofa, dependiente de la sacarosa suministrada en el medio nutritivo. Por lo cual, la función in vitro de la luz, más importante, es en su efecto sobre la fotomorfogénesis (George y Sherrington, 1984). En el momento de trasplantar la plántula a suelo la fotosíntesis toma un papel preponderante en su sobrevivencia.

5. Temperatura.

La temperatura óptima para la morfogénesis varía entre las especies vegetales. En algunas se ha observado que al someterse el inóculo a un tratamiento previo con temperatura fría, para luego mantenerse el cultivo a una temperatura generalmente mayor y constante, se aumenta en forma determinante el desarrollo de los brotes. Es similar el efecto del frío en la plántula para romper su estado de latencia (Hussey y Falavigna, 1980 citados por George y Sherrington, 1984) en la práctica es común incubar desde un principio a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6. Subcultivos.

Los subcultivos a medio fresco son importantes para mantener un incremento constante en el crecimiento del inóculo. La frecuencia de cambio varía conforme los requerimientos de cada especie. En algunos casos como en el crecimiento de callos, o de estructuras que sufren oxidación (por polifenoles) los subcultivos son más necesarios debido a la acumulación de metabolitos tóxicos en el medio, además del agotamiento de determinados iones o bien debido a la deshidratación del mismo, por lo cual se recomiendan los cambios cada 4 o 6 semanas (George y Sherrington, 1984).

El cultivo de tejidos se ha utilizado a escala comercial con múltiples especies hortícolas, entre ellas: el clavel, crisantemo, varias especies de aráceas, helechos, cactáceas, orquídeas

(Murashige, 1978). Entre las especies más apreciadas dentro y fuera de nuestro país se encuentra la rosa.

Determinar las condiciones experimentales y en particular un medio de cultivo in vitro que pueda propiciar el rápido desarrollo en rosas facilitaría el trabajo de selección, propagación y una posterior aclimatación ambiental costeable que llevaría a una producción competitiva en el mercado de rosas, las cuales gozan desde la antigüedad de amplias demandas comerciales.

Una de las especies de mayor importancia comercial en nuestro país y cuyo mejoramiento genético y en los métodos de propagación derivarían beneficios económicos a corto plazo, es *Rosa chinensis*.

Antecedentes

La demostración universal de la propagación de vegetales mediante el cultivo de tejidos de muchas especies y variedades florícolas y hortícolas resultó en un auge en la creación de laboratorios de cultivo de tejidos en la década de los años setenta y han llegado a establecer procedimientos estándar en la producción comercial de grandes viveros.

El cultivo de ápices y yemas axilares ha facilitado esta tarea, estas estructuras tienen una zona meristemática apical la cual posee la capacidad de regenerar todos los tejidos de una planta completa (Barnhill, 1979 citado por George y Sherrington, 1984). El

cultivo de yemas es usado para propagar y mantener determinados genotipos. Además se ha utilizado en protocolos para aislar meristemas y tratar de inducir transformaciones genéticas (Bommineni, 1984 citado por George y Sherrington, 1984).

Para proveer el material biológico en la cantidad, la calidad y en el tiempo requerido para estas investigaciones, un requisito previo es el establecimiento de las técnicas de regeneración de plantas de interés a partir de yemas vegetativas.

Entre los estudios que se citan en la literatura internacional sobre la micropropagación de Rosa chinensis se encuentran los siguientes.

Avramis et al. (1982 citados por Skirvin et al., 1990) lograron plantas completas de R. chinensis var. al inducir el enraizamiento de secciones de tallo, redujo la concentración de NH_4NO_3 y aumentó la concentración de sacarosa del medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Walter et al. (1977 citados por Skirvin et al., 1990) obtuvieron plantas completas a través del cultivo y enraizamiento de yemas axilares cultivadas en MS al que suplementaron con una mayor concentración de tiamina y la adición de sulfato de adenina, sin embargo citan que el medio que permitió mejores respuestas fue el **MS**, con lo cual Skirvin et al. (1990) señalan no estar de acuerdo.

Chu et al. (1993) investigaron el efecto del medio líquido sobre la regeneración de plantas completas de *R. chinensis* a partir de secciones nodales de tallo cultivadas en MS.

El género Rosa ha sido cultivado en una amplia gama de distintos medios de cultivo (Knudson, Knop, Berthelot, Schenk y Hildebrandt, White), y no obstante que entre los más citados está el MS, aún éste ha debido ser modificado para alcanzar los resultados deseados (MS50%, MS25%, MS adicionado de macronutrientes de KC, MS modificado en su contenido de nitrógeno, solución de fierro, concentraciones y tipos de vitaminas) (citados por Skirvin et al. 1990).

No obstante estos cambios, es muy común que al tratar de transferir esta tecnología, surjan problemas (ausencia o baja capacidad regenerativa, oxidación, hiperhidratación) en el desarrollo de plántulas que pueden resolverse al experimentar modificaciones al medio de cultivo.

En el ININ, una de las metas es llegar a generar plantas ornamentales o de interés agrícola mejoradas a través de mutaciones inducidas por radiación ionizante aplicadas a material vegetativo clonado in vitro, para hacerlas llegar a los viveristas nacionales. Por lo que el presente estudio tuvo las siguientes metas y objetivos:

Metas

Establecer en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del ININ la metodología para la micropropagación in vitro de Rosa chinensis.

Objetivos

Variar las condiciones experimentales referentes al medio nutritivo MS y fitorreguladores para lograr la regeneración de plantas completas de Rosa chinensis a partir del cultivo in vitro de yemas.

MATERIALES Y METODOS.

Plantas Donadoras o Plantas Madre.

Fueron adquiridas de un vivero comercial. Con base en observaciones de las plantas. Fueron seleccionadas plantas libres de patógenos y de enfermedades. Para ello se consideró la ausencia de cualquier parásito o de algún signo de marchitamiento y cambio de color en tallos y hojas.

Equipo.

Balanzas: granataria, analítica; parrilla de agitación y calentamiento, autoclave, microscopio estereoscópico, cuarto de siembra con lámparas germicidas de luz ultravioleta.

Instrumental, Cristalería y Materiales diversos.

Material de disección pinzas, agujas, tijeras, bisturíes, navajas (p/bisturí) # 5, # 11, cajas de petri, tubos de ensayo, portaobjetos, gradillas (p/tubos de ensayo), gasas, papel aluminio, alcohol etílico industrial, tween 80, blanqueador doméstico (NaOCl).

Explantos, Desinfección y Siembra.

Secciones de 13 mm long de tallo, se desinfectaron superficialmente al agitarlos durante 10 min en alcohol etílico 70 % y después 25

min en blanqueador comercial 15 % (v/v) con 1-2 gotas de tween 80 por cada 100 ml de solución. Posteriormente fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada esterilizada.

Los tejidos dañados (blancos) por el desinfectante fueron removidos, y bajo microscopio estereoscópico se disectaron ápices y nudos de 2-9 mm long. Fueron sembrados en tubos de ensayo, 100 explantes por tratamiento.

Medio de Cultivo.

Se utilizó medio de Murashige y Skoog (1962) (MS o MS 100%) como medio nutritivo basal, así como distintas modificaciones a la concentración original de las sales minerales: 8%, 24%, 50%, 120%. También se variaron las concentraciones de las vitaminas y la glicina. Los únicos componentes que no se modificaron y siempre se adicionaron en su concentración original (MS, 1962) fueron: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $Na_2FeEDTA$, el inositol y la sacarosa.

Los 5 distintos medios aquí utilizados, derivados del MS, fueron complementados con los reguladores de crecimiento citados por Bressan y Kim (1982) BA 3mg/l y AIA 0.3 mg/l, así como de K, AIB, ANA y 2,4-D (0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 mg/l) de acuerdo a las tablas 1, 2, 3. Fueron sembrados 100 explantes por tratamiento.

Optimización de las respuestas en el tratamiento a (tabla 1).

Se ensayaron combinaciones adicionales de BA 2 y 3 mg/l con AIA 0, 0.1, 0.3, y 3 mg/l.

Efecto del Acido Giberélico.

Se ensayaron distintas concentraciones de AG₃ (0, 0.1, 0.15 mg/l) esterilizado por autoclave. Cada lote experimental se formó con 52 explantes.

Efecto del Carbón Activado.

Se ensayó a 0, 200, 400 mg/l en el medio a (tabla 1).

Inducción de Enraizamiento in vitro.

Brotos cultivados durante 6 semanas en los tratamientos con AG, en el medio a (tabla 1) fueron subcultivados al mismo medio, sin AG₃, y adicionado de las combinaciones de BA 0, 0.2, 0.3, mg/l con AIA 0, 0.1, 0.3, 0.6, 1 mg/l. Cada tratamiento con 100 brotes.

Una vez que se determinaron las mejores respuestas en los tratamientos con BA y AIA se ensayaron dos concentraciones de agar 6 y 8 g/l. Un tratamiento adicional sin agar permitió utilizar agrolita como soporte dentro de los tubos de cultivo. Cada tratamiento constó de 120 brotes.

Previo a la adición de agar 8 g/l (6 y 8 g/l en enraizamiento) a todos los medios de cultivo se les ajustó el pH a 5.7 ± 0.1 con HCl

y NaOH 0.1, 0.5, 1 N. Una vez disuelto el agar, los medios se distribuyeron en tubos de ensayo (25x150 mm), 10 ml/tubo y fueron esterilizados durante 25 min a una presión de 1 Kg/cm², a 110° C. Los medios con carbón activado se agitaron cuando estaban gelificando, para así distribuir homogéneamente el carbón activado y para formar pequeñas burbujas de aire en el medio.

Adaptación a condiciones de invernadero.

Cuando los brotes desarrollaron hojas y raíces se intentó su adaptación a suelo. Se lavaron las raíces con agua corriente para quitar residuos de agar; las plántulas se establecieron en 4 distintos tipos de sustrato y se cubrieron con bolsas de plástico. Se hicieron riegos periódicos con solución nutritiva a sin agar, sin azúcar. Después de 8 días se perforaron las bolsas y así permanecieron durante 15 días y después se procedió a quitar las bolsas.

Composición del suelo.

Sustrato 1 - 1:1 tierra negra y hojarasca de encino.

Sustrato 2 - 1:1:2 tierra negra, hojarasca de encino y estiércol de vaca.

Sustrato 3 - 1:1:1 tierra negra, hojarasca de encino y estiércol de vaca.

Sustrato 4 - 2:2:1 tierra negra, hojarasca de encino y estiércol de vaca.

Parámetros de medición de resultados.

‡ de inducción de brotes.

Crecimiento de los brotes (cm/semana).

‡ letalidad.

‡ desarrollo de raíz.

TABLA 1. MEDIOS CON SALES MS 100%

	aa	a	c
	mg/l	mg/l	mg/l
BA	6	2	3
AIA	0.3	0.3	0.3
Glicina	0.2	0.2	0.2
Ac. Nicotínico	0.5	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5	0.5
Tiamina	0.1	0.1	0.1

TABLA 2. MEDIOS CON 8, 24, 50 % DE SALES MS

	rr 8%	ala 24%	ala, 24%	ala, 24%	ala, 24%	bet 24%	b 50%
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
BA	3	3	1	0.5	0.25	0.3	3
AIA	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glicina	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
Ac. Nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
Piridoxina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
Tiamina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.01

TABLA 3. MEDIOS CON SALES MS 120%

	Hia	RB ₁	RB ₂	RB ₃	RB ₄	i	ii	Ara
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Kinetina	0.2	0	0	0	0	0	0	0.1
BA	0	3	4	2	3	3	4	3
AIB	0.01	0	0	0	0	0	0	0
AIA	0	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3	0.3
ANA	0.01	0	0	0	0	0	0	0
2,4-D	0.1	0	0	0	0	0	0	0
Glicina	2	2	2	2	2	2	2	2
Ac. Nicotínico	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1
Piridoxina	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1
Tiamina	0.1	0.1	1	0.5	0.5	1	1	1

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la variación de la concentración de sales. Supervivencia y oxidación de explantes.

Los primeros resultados ocurrieron dentro de las primeras 4 semanas de cultivo. Bressan y Kim (1982) cuyo medio nutritivo sirvió de testigo, reporta sus resultados a las 6 semanas, para el desarrollo de los brotes y 2 semanas más para la iniciación de la raíz.

Durante la primer semana bajo condiciones in vitro 5% de los explantes presentaron contaminación por bacterias y hongos, lo cual disminuyó el número total de inóculos.

En términos generales los medios con más bajas (8% y 24%) (Tablas 2, 4) y las más altas (120%) (Tablas 3, 4) concentraciones de sales, provocaron la muerte de la mayoría de los explantes, básicamente por dos causas: a) alteración de los niveles de los nutrientes minerales y b) una fuerte necrosis provocada por oxidación de compuestos fenólicos.

Cuando los medios tuvieron 8% y 24% de la concentración original de sales del medio MS (Tablas 2, 4) sólo se alcanzó un 2% (2/95) de

sobrevivencia de los explantes. En tanto que con 120% de la concentración del MS (Tablas 3, 4) se tuvo un 20% (19/95) de sobrevivencia. Dentro del grupo de medios con 120% de concentración (Tabla 4) sólo el Hia permitió una mayor sobrevivencia que fue de 46% (44/95). Este medio difirió de los otros en que incluyó K 0.2mg/l (Ara tenía K 0.1 mg/l) y 3 auxinas (AIB, ANA y 2,4-D) (Tabla 3). Por otro lado, en los medios i y doble i (ii) la sobrevivencia inicial fue de 15% (14/95) pero después los explantes murieron.

Con base en nuestros resultados, el necrosamiento que sufrieron los tejidos al ser disectados, se vió fuertemente aumentado debido a las concentraciones de sales minerales de los medios de cultivo; estos resultados así ocurrieron no obstante que en ensayos preliminares fue adicionado ácido ascórbico 100 mg/l a los medios Hia y Ara. Skirvin y Chu (1979) señalan que el ácido ascórbico elimina el efecto oxidante en los explantes leñosos y evita así un efecto tóxico o inhibidor para el desarrollo de los tejidos, sin embargo, bajo nuestras condiciones de cultivo esto no ocurrió así y tal vez su concentración no fue suficiente para reducir la oxidación de nuestros explantes. Scotti y Pais (1990) agregaron tan sólo 5 mg/l de ácido ascórbico a sus medios, en su artículo no reportan problemas de oxidación.

Cabe la posibilidad de que algún componente en el medio induzca la oxidación de nuestros explantes. Jacobs et al. (1969) encontraron una relación directa entre el grado de necrosis con la

concentración de sales, principalmente con el ión NH_4 , el medio MS contiene una alta concentración de NH_4NO_3 , 1650 mg/l.

En una revisión amplia y detallada de los diferentes medios que hasta la fecha se han probado, en diferentes especies y variedades de Rosa, Skirvin y Chu (citados por Ammirato et al., 1990), señalan un medio determinado para R. chinensis, concluyen que la concentración óptima de NH_4NO_3 en las sales MS debe reducirse de 1650 mg/l a 400 mg/l. Entre los medios citados por Ammirato et al. (1990) se encuentran los de varios autores, como Scotti y Pais (1990), que disminuyen a la mitad la concentración de MS, pero también disminuyen la cantidad de reguladores de crecimiento suministrados, algunos ejemplos son el medio para R. canina por Khosh-Khui y Sink (1982); para "Bridal Pink" por Khosh-Khui y Sink (1981); el de "Improved Blaze" por Hyndman y Bressan (1982). Para R. hybrida ("Forever Yours") las sales MS se reducen aún más, hasta 25% de su concentración original. Nuestros mejores resultados ocurrieron en dos concentraciones de MS, la primera con la original y la segunda al reducirla a la mitad (Tabla 4), en ambas se promovió el desarrollo de brotes, sin embargo estos fueron más vigorosos con MS 100%, debido a esto se optó por trabajar en estas condiciones. En cuanto a la oxidación, fue menor al utilizar la mitad de sales (Tabla 4), una alternativa en un próximo estudio sería comprobar la influencia de reguladores del crecimiento a concentraciones altas y sales MS disminuidas a la mitad.

En el medio ala, se redujeron las sales de NH_4NO_3 , hasta 0.4 g/l,

ningún tejido resultó necrosado. En todos los medios reducidos de sales ala , ala_1 , ala_2 , ala , y rr , se presentó este resultado. El medio RB_1 presenta altas concentraciones de sales (120 mg/l), fue en este medio en el que el necrosamiento fue el más elevado (Tabla 4), por lo que encontramos una correlación con la concentración de sales, quizás especialmente con los iones NH_4 , por lo tanto la sobrevivencia depende directamente del grado de necrosamiento del explante, y son inversamente proporcionales entre si.

En nuestro trabajo sólo se utilizó la fórmula de sales de Murashige y Skoog por lo cual esta hipótesis no es concluyente. Sería recomendable tal vez, probar una fórmula en la que se eliminara el NH_4NO_3 , debido a posibles efectos inhibitorios que parecen estar relacionados con el metabolismo del nitrógeno el cual afecta a la organogénesis (Ishioka y Tanimoto, 1990), o bien podría aplicarse la fórmula de White (1963 citado por George y Sherrington, 1984) carente de iones NH_4 .

La adición de carbón activado, 200-400 mg/l, al medio a , permitió hacer las siguientes observaciones en relación a la oxidación de los explantes:

Con 200 mg/l se evitó la oxidación en 38%-40% (36-38/95) de los explantes, con 400 mg/l estas curvas fueron de 47%- 80% (45-76/95); en tanto el grupo testigo entre el 9% (9/95) y el 15% (14/95) evitaron la oxidación. Ammirato *et al.* (1990) señalan dos factores

principales como responsables de la limitación del crecimiento en las rosas *in vitro*, los cuales son, la contaminación y la oxidación, también cita los trabajos realizados por Pittet y Moncousin (1982 citados por George y Sherrington, 1984) en relación a este último factor y propone como solución mantener los cultivos en la obscuridad por uno o dos días debido a que la oxidación fénolica es inducida por la luz, quizá debido a esto, al colocar el carbón activado en el medio nutritivo y con ello al oscurecerlo se evitó la acción de la enzima PAL (George y Sherrington, 1984) que promueve la formación de polifenoles. Otra posible acción del carbón activado es su capacidad para absorber pigmentos y compuestos tóxicos liberados por los tejidos que pudieran provocar la oxidación de los explantes, el carbón activado actúa indiscriminadamente y es capaz de eliminar los compuestos orgánicos, como auxinas, citoquininas, etileno, vitaminas, y quelatos de Zn, Fe, etc. (Misson, 1983).

Ammirato *et al.* (1990) también señalan que este problema puede reducirse poco a poco, hasta eliminarse por completo, al transferir los explantes a medio fresco cada 3-5 días por varias semanas.

Chu *et al.* (1993) reportan que mientras en los medios sólidos, para rosa, la acumulación de fenoles es inmediata, en los medios líquidos, éstos se precipitan al fondo del tubo de cultivo, eliminando en forma sencilla el problema.

Fue notable que aún cuando los medios RB₁ y ii son iguales (Tabla 3) pero separados en el tiempo de su ensayo, dieron respuestas diferentes. En RB₁ aplicado en primavera se logró un 20% (19/95) de sobrevivencia (Tabla 4), en tanto un ensayo posterior (medio ii) en otoño (y al mismo tiempo de aplicación de i) un menor número de explantes respondieron (15/95), y no sobrevivieron más de un mes. Esto permite suponer que existe un efecto estacional en la respuesta de los explantes cultivados provocado por la condición fisiológica de la planta madre.

Estos porcentajes bajos de sobrevivencia contrastaron con lo observado cuando los medios estuvieron al 50% y al 100% de MS (glicina 10%) de la concentración original, al mantenerse vivos 98% (93/95) de los inóculos (Tabla 4), en ambas concentraciones.

Fue una condición general que en todos los medios nutritivos aún las yemas sobrevivientes no estuvieron exentas de la oxidación, pero en éstas no fue letal. Así, en los medios cuya concentración de sales fue de 120%, el 98% (93/95) de los explantes sembrados, presentaron tejido oxidado; en los medios con 100% de sales, 75% (71/95) de los explantes se mostraron de color café, y en los medios con 50% de sales, sólo el 38% (36/95) estuvieron oxidados (Tabla 4).

Sólo los medios con (8% y 24%) baja concentración de sales evitaron o minimizaron la oxidación de los explantes. Sin embargo sólo 2%

(2/95) de éstos sobrevivieron (Tabla 4), la posible explicación a ello es que los medios no brindaron el suficiente soporte nutricional para mantenerlos vivos a cambio de tener una condición no oxidada debido a la reducción de iones NH_4 (Jacobs *et al.*, 1969).

Esta observación es importante pues se eliminó totalmente el necrosamiento de las yemas, con todo esto surge la posibilidad de que se aplique por unos días una baja concentración de sales para que los explantes escapen de la oxidación, y posteriormente se pasen a un medio MS 50% - 100% para lograr una nutrición adecuada y con ello su sobrevivencia.

Todos los medios citados hasta esta etapa contenían 8 g/l de agar, posteriormente se disminuyó a 6 g/l. Según resultados obtenidos por von Arnold y Eriksson (1984), Scherer (1988), Debergh y Maene (1984) y Nairn (1988) (citados por Ghashghaie *et al.*, 1991) el necrosamiento de los brotes es debido a la concentración de agar.

Quizá la disminución total de la necrosis finalmente se debió al conjunto de medidas tomadas para abatirla.

RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS.

En los medios con 8% y 24% de la concentración original de sales minerales del MS, sólo el 2% de las yemas que sobrevivieron se desarrollaron después de 2 meses y lo hicieron de manera anormal,

pues formaron hojas pequeñas de una coloración amarillo verdoso, es decir, presentaron clorosis. En ningún caso formaron raíces.

En los medios con la más alta concentración de sales minerales, MS 120%, sólo después de 2 meses en H1a y RB₁-RB₂ ocurrió el desarrollo de las yemas. Se formaron brotes con escasas hojas de tamaño y coloración normales y se formó callo en la base de los tallos (Foto 3). En ningún caso en los medios RB hubo rizogénesis ni la formación de plántulas completas, en corto tiempo estos brotes se marchitaron. En el medio H1a, del 46% de las yemas sobrevivientes sólo el 24% enraizaron. Inicialmente las raíces fueron de color claro pero después se oxidaron (Foto 2).

En los medios i, ii, al término del primer mes no se encontró yema alguna sobreviviente; el caso extremo ocurrió en el medio Ara donde a los 7 días las yemas se habían necrosado totalmente y no generaron respuesta alguna.

Los medios con 50% y 100% de las sales MS resultaron más favorables para el desarrollo de brotes, lográndose un 98% de sobrevivencia en ambas concentraciones, a los 10 días de iniciados los cultivos las yemas se habían desarrollado en unos brotes con hojas normales. Sin embargo en los medios con sales al 100% la oxidación fue de un 75% mientras que en los medios con sales MS al 50%, fue menor, presentando un máximo de 38% de necrosamiento. Sin embargo el grado de oxidación no fue lo suficientemente grave para provocar una alta

mortandad. No hubo diferencia significativa entre los medios de ambas concentraciones de sales MS, en la formación de raíces y plántulas completas, ya que todos oscilaron entre 20-25% excepto el medio aa con 100% de MS el cual sólo presentó un 3% de rizogénesis (Tabla 4).

Efecto de los compuestos orgánicos (vitaminas, glicina, inositol)

A las concentraciones de los medios 8% y 24% en presencia de BA (0.25 - 3 mg/l) con los mismos compuestos orgánicos y similares concentraciones (Tabla 2), no se observaron diferencias atribuibles a estas sustancias (Tabla 4), fueron más determinantes las concentraciones de sales.

La respuesta casi generalizada fue la oxidación y muerte por deficiencias nutricionales. Estos hechos resultaron más patentes al comparar estos resultados con los obtenidos en medio b con MS 50% y en a y c 100%. En el medio 50% aun cuando se redujeron a la mitad las concentraciones de glicina, ácido nicotínico, piridoxina y en 50 veces la tiamina (en relación a los medios con 8% y 24%) (Tabla 2) se logró la sobrevivencia de 98% (93/95) de los explantes. Este mismo porcentaje alto se alcanzó en el medio 100% con tiamina 0.1 mg/l.

Los resultados en los medios b MS 50% y c MS 100% fueron

esencialmente similares y también en esta comparación los compuestos orgánicos no marcaron diferencias (Tabla 4), no obstante que la tiamina fue 10 veces menos concentrada en el medio MS 50% (Tabla 2).

En el grupo de medios MS 120%, los compuestos orgánicos tampoco tuvieron un efecto determinante y más bien parecieron confirmar que la concentración de sales fue más decisiva en esta etapa de resultados pues estos fueron muy homogéneos y sólo en el medio H1a se observó una respuesta diferente 46% (44/95) de sobrevivencia atribuible a los reguladores de crecimiento, pues los mismos compuestos orgánicos y concentraciones se ensayaron en RB, (Tabla 3) y en este medio no se dieron tales resultados (Tabla 4). El medio Ara sólo permitió 2% (2/95) de sobrevivencia. No obstante que el papel estimulante de los compuestos orgánicos no manifestó una clara tendencia, podemos señalar de manera general que los medios con mayor porcentaje de sobrevivencia tuvieron la concentración original del medio MS como en H1a (Tabla 3), (46% 44/95 sobrevivencia, Tabla 4), o con glicina al 10% como en los medios a, c (Tabla 1) con 98% (93/95 sobrevivencia); o básicamente a la mitad de la concentración original como en el medio b (Tabla 2) con 98% (93/95 sobrevivencia) (Tabla 4).

Efecto de los reguladores de crecimiento.

Durante el primer mes en cultivo, en la fase en que muchos

explantes se perdieron por oxidación, los mejores tratamientos hormonales que contribuyeron a reducir tal situación y permitieron prosperar a las yemas, que dieron origen a cuatro brotes/yema, fueron BA 2 mg/l (medio a) o con 3 mg/l, en el cual sólo desarrollaron dos brotes/yema (medios c y b) en combinación con AIA 0.3 mg/l.

Por otro lado, resultó notable que con el medio aa con los mismos compuestos orgánicos y la misma concentración de AIA que en los medios a y c, pero con BA 6 mg/l (triple que en a y el doble de c) (Tabla 1) la sobrevivencia de explantes fue sólo de 2% (2/95) (Tabla 4), similar a la de medios con 8% y 24% de la concentración de sales.

De aquí la importancia de emplear bajas cantidades de BA, lo cual se logró en nuestro trabajo ya que resultó favorable aplicar 2 mg/l de BA. Esto pareció indicar que en esta etapa de adaptación en la que se tenía que superar la oxidación, al aplicar altas concentraciones de este estimulante del metabolismo, se promovió aún más la necrosis de los tejidos, quizá por hacer más sensibles a las células ante la oxidación.

Otros medios con los más bajos porcentajes de sobrevivencia (i, ii con 15% cada uno y Ara con 2% en el primer mes, para después morir todas) también incluyeron BA en (concentraciones mayores a 2 mg/l) 3 y 4 mg/l (Tabla 3). Esta observación parece encontrar

confirmación en los resultados de sobrevivencia obtenidos en el medio Hia en el que aún con una alta concentración de sales (120%), se tuvo una sobrevivencia media 46% (44/95) (Tabla 4) sostenida por la presencia de bajas concentraciones de la citocinina Kinetina 0.2 mg/l y las auxinas AIA y ANA 0.01 mg/l y 2,4-D 0.1 mg/l (Tabla 3).

Las irregularidades en cuanto a la longitud alcanzada por las yemas pueden atribuirse a que los explantes se disectaron a lo largo de los tallos de distintas plantas y lo que se observa en los resultados, es la manifestación de la influencia de la dominancia apical (Foto 2). Bressan y Kim (1982) experimentaron con yemas de Rosa hybrida de distintas posiciones nodales a lo largo de la planta y encontraron una diferencia marcada en su crecimiento y desarrollo. En general, el promedio de la longitud en BA 2 mg/l fue de 0.63 cm y con BA 3 mg/l fue de 0.36 cm. Según la hipótesis de la inhibición por auxina, la cual infiere que la producción apical de auxina que se mueve en forma basipétala, hacia abajo del brote, inhibe el crecimiento de la yema lateral, la evidencia más fuerte que la sustenta es la demostración en la cual se elimina el ápice y se elimina la dominancia apical, lo cual se puede observar morfológicamente en el crecimiento de las yemas laterales de la planta. Otra observación experimental que confirma esta hipótesis, es al aplicar un tratamiento con auxinas exógenas, se restaura la dominancia apical a pesar de la eliminación del ápice apical. Esto mismo se observa al inyectar en el tallo de la planta inhibidores de la auxina.

También parece probable que las citoquininas puedan tener un papel indirecto en interacción con las auxinas, de tal manera que al decrecer la concentración de la auxina en la yema seguida por la eliminación del ápice apical pueda inducirse un incremento en la concentración de la citoquinina, de esta forma la dominancia apical disminuye o se elimina por la reducción de la auxina. Parece que la citoquinina interviene directamente en la movilización de nutrientes, según los trabajos publicados en 1992 por Li, lo cual podría significar su influencia en el crecimiento de las yemas (Cline, 1994). También se piensa que los efectos de la auxina pueden estar influenciados por la acción interactiva con otras sustancias u hormonas (Cline, 1994), esto es importante en nuestro trabajo, pues los resultados obtenidos son diferentes con la misma concentración de auxina, 0.3 mg/l pero con distintas cantidades de citoquinina, 2 y 3 mg/l; esto es, aparentemente la citoquinina es la que rompió la dominancia apical, más sin embargo lo citado por Cline, es la auxina la responsable directa, de aquí la importancia de su acción interactiva con otras sustancias, en este caso en particular con el BA, de hecho, Stafstrom (1993 citado por Cline 1994) propone un control de gradiente de concentración para la dominancia apical, con auxinas originadas en el ápice y con citoquininas originadas en la raíz. Esta interacción podría quizá implicar reacciones fisicoquímicas, lo cual es lo más probable debido a la gran actividad metabólica de los organismos vivos y la tendencia de los enlaces químicos libres a reaccionar, todo esto disminuirá la cantidad libre original de auxina, de esta forma la

concentración inicial de BA tiene importancia en la cantidad final de AIA y al reducirse esta última se pudo romper la dominancia apical con las concentraciones en el medio a de 0.3 mg/l de AIA y 2 mg/l de BA. La cantidad restante de citoquinina se emplearía para promover la movilización de nutrientes.

La mayoría de yemas inoculadas se desarrollaron, con grados de crecimiento diferentes, debido a las diferentes posiciones que mantenían las yemas en la planta.

Es probable que las yemas que presentaron un mejor desarrollo hayan sido las aisladas de la cercanía del ápice de la planta y viceversa. Se sabe, según experiencias sobre el control de la dominancia apical que al eliminarla, las primeras yemas que germinan son las próximas al ápice, Bressan y Kim (1982) encontraron que las contiguas al ápice, efectivamente empiezan a crecer antes que las basales, pero las de mejor desarrollo fueron las aisladas de la porción media del tallo. Esto puede tener explicación con las hipótesis anteriormente citadas. Para que una yema active su crecimiento es necesario una menor concentración de auxina (con lo que se rompe la dominancia apical) y mayor de citoquininas, la síntesis de éstas últimas es en la base de la planta en la proximidad con la raíz, un hecho que facilita su transporte ascendente en forma conjunta con sustancias nutritivas. Cline (1994) señala la relación de las citoquininas con la Teoría Nutritiva y su flujo acropétalo, el cual es un movimiento en contra

de una gran fuerza de gravedad que implicaría un gasto de energía. Esto apoya el flujo acropétalo de la citoquinina y posible relación en el desplazamiento de nutrientes hacia zonas de crecimiento.

Entre las discusiones por aclarar está el mecanismo de la dominancia apical y surgen problemas sin resolución aún, el primero es que después de la eliminación de la yema apical el nivel de auxinas endógenas en la yema lateral debe de reducirse, lo cual no se ha determinado (medido) a pesar de los intentos realizados por varios investigadores como Gocal (1991) y Prasad (1993) (citados por Cline, 1994), se ha señalado que el método y el momento no han sido los más apropiados para llevar a cabo la determinación de la auxina. Para eliminar estas limitantes se están aplicando nuevos métodos de análisis y resolución basados en la Genética Molecular (Cline, 1994).

Por otro lado, en nuestros resultados se logró un mejor crecimiento de los inóculos, a una concentración de BA 2 mg/l (Foto 4), en comparación con los desarrollados en los medios con BA 3 mg/l (Foto 5), a diferencia de lo encontrado por Bressan y Kim (1982) y Hasegawa (1979, 1980) cuyos resultados óptimos ocurrieron en presencia de BA 3 mg/l. De esta información se desprendieron inicialmente nuestros experimentos y además sirvió como testigo. Scotti y Pais (1990) emplearon una concentración más baja, BA 1 mg/l. Las diferencias encontradas probablemente están asociadas a las distintas concentraciones y tipos de componentes nutritivos

empleados (medios basales, reguladores del crecimiento). Está ampliamente comprobado que la formación de brotes se promueve por el balance adecuado de citoquininas en relación a las auxinas (Hussey, 1978), nosotros utilizamos 0.3 mg/l de AIA (la cual es inactivada pronto en los tejidos).

En términos de concentración, utilizamos una concentración tres veces mayor de auxina que la aplicada por Skirvin y Chu (1979), quienes utilizaron 0.1 mg/l de ANA, auxina considerada con una actividad más potente (Hussey, 1978).

Después de 4 semanas de cultivo los resultados de las yemas cultivadas en medio a con o sin AG, presentaron diferencias asociadas a los tratamientos. Se formaron hojas a las 3 semanas en las yemas de los tratamientos con AG, y en el testigo.

En ausencia de AG, las yemas alcanzaron una longitud promedio de 0.66 cm con un intervalo de 0-2 cm de longitud.

Con AG, 0.1 mg/l crecieron cuatro veces más, el promedio logrado fue de 2.7 cm con un intervalo de 0-5 cm de longitud.

Con AG, 0.15 mg/l las yemas se desarrollaron en promedio 4.6 cm con un intervalo de 0-11.5 cm. Finalmente, algunos brotes lograron 9.5 cm, 11.0 cm y 11.5 cm después de tres meses. Esto es, crecieron casi el doble de lo logrado con el tratamiento de 0.1 mg/l de AG.

AG ₃ (mg/l)	\bar{X} (cm)	Intervalo (cm)
0	0.66	0-2
0.1	2.7	0-5
0.15	4.6	0-11.5

Los brotes más elongados desarrollaron el mayor número de hojas con un aspecto normal (Foto 6).

Scotti y Pais (1990) y Jacobs *et al.* (1970) enfatizan la importancia entre las concentraciones de las sustancias de crecimiento presentes en una mezcla nutritiva, más que el efecto de una sola, lo cual parece comprobarse cuando Khosh-Khui y Sink (1982) aplicaron el AG₃ en forma de rocío, evitando así, su integración a la mezcla nutritiva con resultados negativos en cuanto a la formación de brotes.

En nuestro estudio la combinación más adecuada fue 0.15 mg/l de AG₃, 0.3 mg/l de AIA y 3.0 mg/l de BA. Para Scotti y Pais (1990) la cantidad óptima de AG₃ fue de 0.1 mg/l para explantes de *Rosa chinensis*, quizá la diferencia se deba a que utilizó una tercera parte (1 mg/l de BA) de la concentración empleada por nosotros.

Davies (1980) señala que al aplicar diversas concentraciones de AG₃ (0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l) no encontró diferencias de crecimiento en distintas variedades de rosas.

Las diferencias en el crecimiento de nuestras yemas quizá pueden basarse en que:

a) para la siembra de todas las yemas se emplearon distintos individuos y éstas se tomaron al azar a lo largo de los tallos, pudo ocurrir que un mayor número de yemas apicales y/o axilares próximas a desarrollarse fueron sembradas en los medios con AG.

b) La segunda posible explicación, es que aún cuando se esterilizó en autoclave el AG, a 110^o C algunas moléculas de éste o sus fracciones hayan permanecido activas (Sigma, 1990).

En los 3 tratamientos, a los dos meses, las yemas desarrollaron brotes: se alongó el tallo y se formaron hojas, éstas fueron de color verde, no hubo diferencias en cuanto a este carácter, pero sí en cuanto al número de nudos desarrollados. Sin AG, se formaron 1-2 nudos, en tanto que con AG, 0.1 mg/l se formaron de 2-4 nudos, y a 0.15 mg/l se formaron de 4-7 nudos

El número de brotes desarrollados, por explante fue de 3-4, en los medios a con 0.1 y 0.15 mg/l de AG, por lo que se aumentó la propagación de plántulas de 3-4 veces.

Estos brotes comúnmente no generaron raíces en el medio a con BA, sin embargo en forma eventual se presentaron casos de enraizamiento en un 25% en el medio a, 24% en los medios b, Hia y 20% en el medio

c (Tabla 4). Chu et al. (1993), Scotti y Pais (1990), Hasegawa (1979) señalan que en cultivo in vitro de Rosa chinensis solamente los brotes cultivados en un medio sin BA desarrollan raíz, además se ha observado que el medio MS 100% reduce el porcentaje de su formación, de ahí que se recomienda el uso de dos medios de cultivo, uno para el desarrollo de brotes y otro para la formación de raíces (Scotti y Pais, 1990; Bressan y Kim, 1982), por lo que consideramos que los porcentajes obtenidos, aunque relativamente bajos, éstos son significativos.

El tiempo que se requirió para su formación fue de 3 semanas, que es lo reportado por Dubois et al. (1988), Scotti y Pais (1990) lograron reducir este tiempo a 2 semanas, la diferencia puede radicar en la diferencia de concentración de sales MS y tipo de auxinas (IBA) empleadas. Davies (1980) y Hasegawa (1979) encontraron 55% de enraizamiento al aplicar 0.3 mg/l de AIA sin BA. Scotti y Pais (1990) utilizan una cantidad mayor de auxina, 1 mg/l de IBA. Jacobs et al. (1969) al utilizar diferente citoquinina (kinetina) y auxina (ANA) en rosa, también encontraron que la diferenciación de la raíz únicamente ocurrió en ausencia total de la kinetina. La eliminación de las citoquininas también es recomendada por Burger y Liu (1990), además de disminuir a la mitad la concentración de sales MS (Scotti y Pais, 1990). Skirvin y Chu (1979) recomiendan reducir hasta una cuarta parte las sales MS. Para Bressan y Kim (1982) la disminución de sales MS afecta la iniciación de la raíz además del vigor de los brotes.

En nuestro trabajo el medio que dio mejores resultados, en un 64% (32/50), fue a al cual se le eliminó sólo BA y se le agregó 0.3 mg/l de AIA, en el último subcultivo de los brotes. Para Khosh-Khui y Sink (1982) el AIA es más efectivo si se combina con ANA.

Sin embargo de acuerdo con el número de raíces obtenidas por Scotti y Pais (1990), Chu et al. (1993), Khosh-Khui y Sink (1982) y Davies (1980) la concentración de sales MS tiene poca influencia, pero estas resultaron sin ramificaciones y con pocos pelos absorbentes; en cambio se encuentra importante la influencia de la concentración de agar para la aereación adecuada lo cual influye en: (1) buen desarrollo de la raíz y (2) buena transferencia de nutrientes. Para Signha (1982), von Arnold y Eriksson (1984) y Pasqualetto (1986) (citados por Ghashghaie et al., 1991) es importante, además, el tipo de agar. Para Bressan y Kim (1982) la concentración de agar, en un rango de 3-18 g/l, no afecta la iniciación de la raíz.

En nuestros resultados la concentración de agar y la formación de burbujas de aire, parecen influir en el desarrollo y la forma de la raíz. A menor concentración de agar, 6 g/l, las raíces presentaron múltiples ramificaciones con diámetros tres veces más pequeños en comparación al diámetro de la raíz, sin ramificaciones obtenida con una concentración de 8 g/l de agar. El color que presentó fue claro con pequeños tonos oscuros. La raíz típica de las rosas es de color claro, con múltiples ramificaciones cuyo diámetro se va reduciendo al aumentar sus bifurcaciones, la raíz principal nunca

es tan gruesa como la obtenida con agar 8 g/l. estas variaciones morfológicas son atribuidas a la concentración de agar (Kevers, 1984; Gaspar, 1987, Paques y Boxu, 1987a, citados por Ghashghaie et al., 1991) que modifica drásticamente la disponibilidad de la citoquinina (Deuptake, 1983; Bornman y Vogelmann, 1984, citados por Ghashghaie et al., 1991), relacionada con la disponibilidad y potencial del agua en el medio nutritivo, según Ghashghaie et al. (1991). Estos últimos autores reportan como la mejor concentración de agar 5.5 g/l, el cual difiere tan solo en 500 mg/l de la concentración aplicada en nuestro trabajo.

Un hecho notable es el citado por Scotti y Pais (1990) quienes reportan que cuando mantuvieron sus explantes en el medio de cultivo para inducción de brotes, por más de 6 semanas lograron 10% de floración in vitro, además si el medio para desarrollo de raíz contenía la mitad de sales MS no se producía la floración.

En nuestro trabajo se consiguió el 56% (28/50) de floración in vitro entre las semanas 8-10, y ocurrió en el medio que contenía las sales MS completas (Foto 7).

En general, las plántulas después de 3-4 semanas de pasarse a suelo florecieron o si ya existía la inflorescencia, esta presentaba antes.

Aclimatación en Invernadero.

Las plántulas se aclimataron en tierra después de 30 días.

La adaptación a suelo de las plántulas obtenidas in vitro fue difícil, principalmente por los ataques de hongos, debido a que los sustratos utilizados no se desinfectaron en autoclave, ni se empleó ningún fungicida. Quizá por este motivo la sobrevivencia fue 30% (15/50 plántulas), a pesar de que la sobrevivencia de explantes in vitro había sido alta, hasta un 98% (49/50).

Tabla 4. Cultivo *in vitro* de yemas de *Rosa chinensis*.

Medio MS	Oxidación	Sobrevivencia	Tallo+hojas	Raíces	Plántulas
8% rr	≤ 1%	2%	2%, microfilia, clorosis		
24% ala ala ₁ ala ₂ ala ₃	≤ 1% ≤ 1% ≤ 1% ≤ 1%	2% 2% 2% 2%	2%, microfilia, clorosis. 2%, microfilia, clorosis. 2%, microfilia, clorosis. 2%, microfilia, clorosis.		
50% b	38%	98%	98%, normales, verdes.	24%	24%
100% aa a c	2% 75% 75%	2% 98% 98%	98%, normales, verdes. 98%, normales, verdes. 98%, normales, verdes.	3% 25% 20%	3% 25% 20%
120% Hia Rb ₁ Rb ₂ Rb ₃ Rb ₄ i ii Ara	98% 98% 98% 98% 98% 98% 98%	46% 20% 20% 20% 0% 0% 0%	46%, normales verde claro, callo en la base del tallo. 20%, callo en la base del tallo.RB1-4 0% 0% 0%	24%	24%

Resultados después de tres meses de iniciados los cultivos, 100 yemas/tratamiento.

CONCLUSIONES.

En términos generales los medios con más bajas (8% y 24%) y las más altas (120%) concentraciones de sales, provocaron la muerte de la mayoría de los explantes, básicamente por dos causas: a) alteración de los niveles de los nutrientes minerales y b) una fuerte necrosis provocada por oxidación de compuestos fenólicos.

Nuestros mejores resultados ocurrieron en dos concentraciones de MS, la primera con la original y la segunda al reducirla a la mitad, en ambas se promovió el desarrollo de brotes, sin embargo éstos fueron más vigorosos con MS 100%.

La adición de carbón activado, 400 mg/l, al medio a, permitió disminuir la oxidación de los explantes en un 47%-80% (45-76/95).

Existe un efecto estacional en la respuesta de los explantes cultivados provocado por la condición fisiológica de la planta madre.

Sólo los medios con (8% y 24%) baja concentración de sales evitaron o minimizaron la oxidación de los explantes. Sin embargo sólo 2% (2/95) de éstos sobrevivieron, la posible explicación a ello es que los medios no brindaron el suficiente soporte nutricional para mantenerlos vivos a cambio de tener una condición no oxidada. Con todo esto surge la posibilidad de que se aplique por unos días una baja concentración de sales para que los explantes escapen de

Conclusiones.

la oxidación, y posteriormente se pasen a un medio MS 50% ó 100% para lograr una nutrición adecuada y con ello su sobrevivencia, además de aumentar la posibilidad de floración in vitro.

No se observaron diferencias en el desarrollo atribuibles a los compuestos orgánicos (vitaminas, glicina inositol), fueron más determinantes las concentraciones de sales.

En cuanto a la regeneración de plántulas los mejores tratamientos hormonales fueron BA 2 mg/l, con cuatro brotes/yema (medio a) o con 3 mg/l, con dos brotes/yema (medios c y b) en combinación con AIA 0.3 mg/l.

Al aplicar altas concentraciones de BA se promovió la estimulación metabólica, y con ello aumentó la necrosis de los tejidos, quizá por hacer más sensible a las células ante la oxidación.

Las irregularidades en cuanto a la longitud alcanzada por las yemas pueden atribuirse a que los explantes se disectaron a lo largo de los tallos de distintas plantas y lo que se observa en los resultados, es la manifestación de la influencia de la dominancia apical. En nuestro trabajo se promovió la ruptura de ésta al aplicar una concentración de BA 2 mg/l, 0.3 mg/l de AIA.

La concentración óptima, en éstas condiciones, de AG, fue de 0.15 mg/l, con la cual se elongaron más los brotes, y desarrollaron el

mayor número de hojas con un aspecto normal.

El medio que dio mejores resultados para el desarrollo de raíz fue **a**, al cual se le eliminó sólo **BA** y se le agregó 0.3 mg/l de **AIA**, en el último subcultivo de los brotes.

La concentración de 6 g/l de agar y la formación de burbujas de aire, parecen influir en el desarrollo y la forma de la raíz.

Las mejores características morfológicas se dieron en el medio con 2.0 mg/l de **BA**, 0.3 mg/l de **AIA** y 0.15 mg/l de **AG**.

En nuestro trabajo se consiguió el 56% (28/50) de floración in vitro entre las semanas 8-10, y ocurrió en el medio (**a**), que contenía las sales **MS** completas.



Foto 1 Rosa chinensis Plantas Donadoras 6
Plantas Madres, adquiridas de un vivero
comercial.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

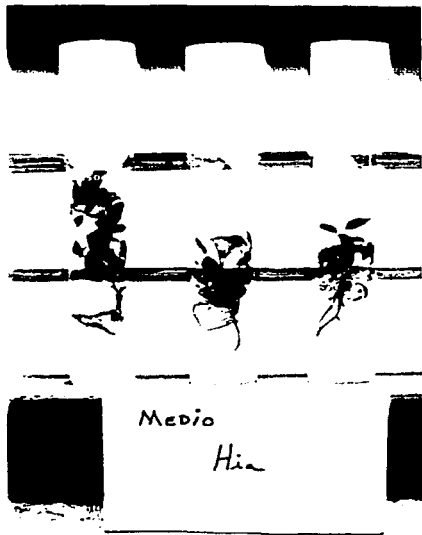


Foto 2 Raíces oxidadas desarrolladas en el medio Hia. Diferencias en crecimiento y desarrollo de los explantes disectados a lo largo de los tallos de distintas plantas.



Foto 3 Formación de callo a una concentración de 120% de sales MS.



Foto 4 Crecimiento de los inóculos a una concentración de BA 2 mg/l, después de tres meses de iniciados los cultivos.

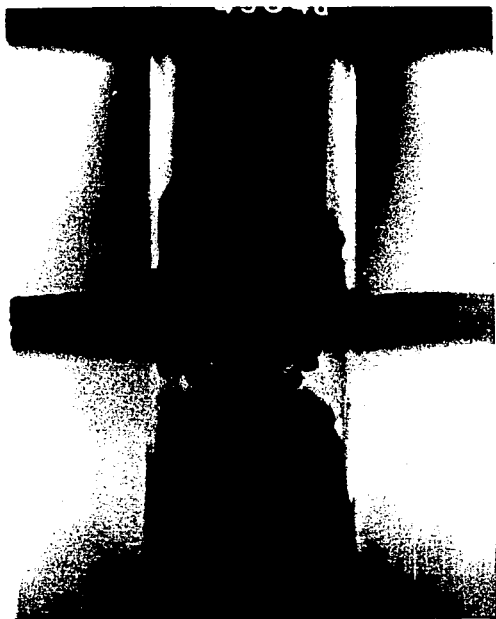


Foto 5 Crecimiento de los inóculos a una concentración de BA 3 mg/l, después de tres meses de iniciados los cultivos.



Foto 6 (A)(B) Crecimiento de los inóculos con AG_3 0.15 mg/l.
(C)(D) Crecimiento con AG_3 0.1 mg/l, después de tres meses.

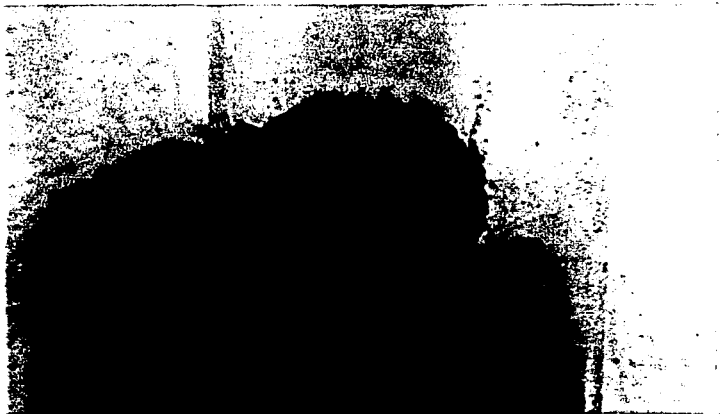


Foto 7 Floración in vitro entre las semanas 8-10, en el medio "a" con sales MS completas.

Apéndice.

Medio de Cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).

Solución	Macro-nutrientes	mg/l	10X solución en 400 ml g/10 litros	Alicuotas para preparar 1 litro de medio.
A	NH ₄ NO ₃ KNO ₃ MgSO ₄ ·7H ₂ O KH ₂ PO ₄	1650 1900 370 170	16.5 19.0 3.7 1.7	40 ml
B	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4.4	40 ml
	Micro-nutrientes	mg/l	mg/10 litros	
C	KI H ₃ BO ₃ MnSO ₄ ·H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.83 6.2 16.89 8.6 0.25 0.025 0.025	8.3 62 168.96 86 2.5 0.25 0.25	40 ml
D*	Na ₂ EDTA FeSO ₄ ·7H ₂ O	37.3 27.8	373 278	40 ml
* Estos compuestos se diluyen por separado; la solución de Na ₂ EDTA se calienta y luego se mezclan ambas soluciones.				
Compuestos orgánicos				
E	Inositol	mg/l 100	1.0 g/l	40 ml
F	Acido Nicotínico Piridoxina Tiamina	0.5 0.5 0.1	5 mg 5 mg 1 mg	40 ml
G	Glicina	2.0	20 mg	40 ml
Sacarosa 30 g/l				
pH 5.7				

FITOHORMONAS

(a) Bencil-amino-purina (BA) 20 mg/100 ml de H₂O destilada. Al reactivo se adicionan 2-3 ml de HCl 0.5 - 1N, se calienta y después se agrega el H₂O hasta aforar al volumen final. En todo momento se observa la solución para detectar si ocurre recristalización.

(b) Acido indol-3-acético (AIA)..... 20 mg/100 ml de H₂O destilada. Al reactivo se adicionan 2-3 ml de etanol absoluto, se calienta y después se agrega el agua hasta aforar al volumen final. En todo momento se observa la solución para detectar si ocurre recristalización.

Acido Giberélico

(c) Acido Giberélico (AG₁) 20 mg/100 ml de H₂O destilada. Para su disolución se procede como en el caso del AIA.

BIBLIOGRAFIA.

Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S. (Eds). 1990. Handbook of Plant Cell Culture. Ornamental Species. (Ed) Mc. Graw-Hill Publishing Company. New York. Vol. 5 pp. 716-743.

Attree, S.M., and Fowke, L.C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: Advances in synthetic seed Technology of conifers. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 35: 1-35.

Aubuiron, E. Carron M.P. and Michaux-Ferrere, N. 1990. Influence of atmospheric gases, particularly Ethylene, on somatic Embryogenesis of Hevea brasiliensis. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 21:31-37.

Bressan, P.H. and Kim, Y.J. 1982. Factors affecting in vitro propagation of Rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107 (6):970-990.

Broertjes, C. 1963. Mutation breeding in vegetatively propagated crops. Meded. Dir. Tuinb 26: 736-743.

Burger, D.W. and Liu, L. 1990. Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of Rose hybrida L. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 21: 147-152.

Capellades, M., Fontarnau, M.R., Carulla, C. and Debergh, P. 1990.

Bibliografia.

Environment influence anatomy of stomata and epidermal cell in tissue cultured Rosa multiflora. J. Amer. Soc. Hort. Sci.: 115 (1): 141-145.

Cline, M.G. 1994. The role hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiologia Plantarum*. 90: 230-237.

Conger, B.V. 1987. Cloning Agricultural plants in vitro techniques (Ed) CRC. PRES. Inc. Boca Raton, Florida. pp. 1-107.

Chu, C.Y., Knight, Y. and Smith, M.A.L. 1993. Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (Rosa chinensis Jacq. "Minima"). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32:329-334.

Davies, D.R. and Hopewood, M. 1980. Rapid propagation of roses in vitro. *Scientia Horticulturae*. 13: 385-389.

Dodds, J.H. and Roberts, L.W. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. (Ed) Cambridge University Press. Cambridge. 178 p.

Dommergues, P. 1962. Mutagenese experimentale *Ann. Amel. Pl.* 12: 67-73.

Douglas, C.G., Rutledge, B.C., Casey, D.A. and Richardson, H.S.D.

1989. Micropropagation of Floribunda, ground cover and miniature roses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 19: 55-64.

Dowden, A.O. and Thomson, R. 1965. Las Rosas. (Ed) Novaro Odyssey Press. Inc. Madrid. pp. 7-44.

Dubois, L.A.M., Roggemans, J., Soyeurt, G. and Vries, D.P. 1988. Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivares propagated in vitro and in vivo by softwood cuttings. Scientia Hortic. 35: 293-299.

Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V and Yamada, Y. (Eds). 1983. Handbook of plant cell culture. Vol. 1 Techniques for propagation and breeding. (Ed) Macmillan Publishing Co. New York. pp. 1 - 227.

Fjeld, T., Gislerod, H.R., Revhaug, V. and Mortensen, L.M. 1994. Keeping quality of cut roses as affected by high supplementary irradiation. Scientia Horticulturae. 57: 157-164.

Galil, T., Hillel, J., Lavic, A. and Haberfeld, A. 1991. DNA fingerprint analysys of ornamental plants. Plant Science. 76: 91-97.

Gamborg, O.L. and Wetter, L.R. 1968. Plant Tissue Culture. (Ed) CRC. PRES. Inc. Boca Raton, Florida. pp. 1-23.

Bibliografía.

George, E.F. and Sherrington, P.D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and directory of commercial laboratories. (Ed) Exegetic Limited. England.

Ghashghaie, J., Brenckmann, F. and Saugier, B. 1991. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 82: 73-78.

Gupta, M.N. and Shukla, R. 1971. Mutation Breeding of garden roses. *Japan J. Breed.* 21(3): 129-136.

Hasegawa, P.M. 1979. In vitro propagation of rose. *Hort. Science.* 14(5): 610-612.

Hasegawa, P.M. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 210-220.

Helgeson, J.P., Upper, C.D. and Haberlach, G.T. 1972. Plant Growth Substances. (Ed) Springer-Verlag. New York. pp. 484-492.

Helost, H. 1966. Induction expérimentale de mutations chez les plantes florales. *C.R. Acad. Séances Agric. Fr.* 1281-1308.

Hoyos de M.V. 1991. Escena Internacional. Colombia: gigante de la floricultura de América II. *Floricultura Intensiva.* No.7: 14, 24,

25.

Huguette, S., Laffray, D. and Coudret, A. 1991. Ultrastructure and functioning of guard cell of in vitro cultured rose plant. Plant Physiol. Biochem. 29(4): 333-339.

Hussey, G. 1978. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plant. Science Progress. Oxf. 65: 185-208.

Hyndman, S.E.P. and Bressan, R.A. 1982. Simulation of root initiation from cultured rose shoot through the use of reduced concentrations of mineral salt. Hort. Science. 17: 82-86.

Ishioka, N. and Tanimoto, S. 1990. Plant regeneration from Bulgarian rose callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 22: 197-199.

Jacobs, G., Allen, P. and Bornman, C.H. 1969. Tissue culture studies on rose: use of shoot tip explants. I Auxin: cytokinin effects. Agroplanta. 1: 179-188.

Jacobs, G., Allen, P. and Bornman, C.H. 1970. Tissue culture studies on rose: III Auxin: gibberellin effects. Agroplanta. 2: 45-509.

Bibliografía.

- Khosh-Khui, M. and Sink, K.C. 1981. Rooting enhancement of Rosa hybrida for tissue culture propagation. *Scientia Hortic.* 17: 371-376.
- Khosh-Khui, M. and Sink, K.C. 1982. Callus induction and culture of Rosa. *Scientia Hortic.* 17: 361- 370.
- Larson, R.A., 1988. Introducci6n a la Floricultura. Rosas. Ed. Agt Editor S.A. M6xico D.F. 73-93.
- Letham, D.S. 1968. Biochemistry & physiology of plant growth substances. (Ed) Runge Press. Ottawa. 19 p.
- Misson, G.H. 1983. Micropropagation of Floribunda. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.* 48: 1151-1157.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum.* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on Agriculture. En:T.A. Thorpe (Ed) *Frontiers of Plant Tissue Culture.* 1978 IAPTC, Calgary. pp. 15-26.
- Nakajima, K. 1965. Induction of soports in roses by gamma-ray irradiation. *Jour. Cellular Comp. Physiol.* 7: 227-270.

Navarro, S.V. y Vera E.R. 1987. Historia del Cultivo de Tejidos Vegetales (Eds) En: D.V. Hurtado y M.E. Merino Cultivo de Tejidos Vegetales. (Ed) Trillas. México. pp. 15-34.

Ortiz, M.F., 1991. Rosas. Floricultura Intensiva. Junio 1991. Editorial La Fuente. México. 9 p.

Pierik, R.L.M. 1987. In vitro culture higher plants. Ed. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. pp. 21.

Robert, M.L. 1985. El Potencial del Cultivo in vitro de células vegetales en el mejoramiento genético de las plantas. 89-110. En: L.M. Robert y V.M. Loyola (Comp.). El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT, CICY, México.

Robert, M.L. y V.M. Loyola. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. 21-26. En: M.L. Robert y V.M. Loyola (Comp.) El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT, CICY, México.

Sánchez, S.O. 1978. La Flora del Valle de México. (Ed) Herrero. México. pp. 191-194.

Sarma, R.N. and Talukdar, P. 1991. Induced genetic diversity in Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). J. Nuclear Agric. Biol. 20(3): 164-168.

Bibliografía.

Scotti, C.P. and Pais, M.S.S. 1990. Mass propagation of the dwarf rose cultivar "Rosamini". *Scientia Hortic.* 43: 321-330.

Sigma. 1990. Sigma Cell Culture Reagents. 1990. Catalog. Sigma Chemical Company. St. Louis.

Skirvin, R.M., Chu, M.C. and Young, H.J. 1990. Rose. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR & Bajaj Y.P.S. (Eds) *Handbook of Plant Cell Culture*, (Ed) McGraw-Hill Publishing Inc., New York. Vol 5. pp. 716-743.

Skirvin, R.M. and Chu, M.C. 1979. *In vitro* propagation of "Forever Yours" Rose. *Hort. Science.* 14(5): 608-610.

Streitberg, H. 1966. Neue Rosen und Azaleen Sorten mit Hilfe der Röntgenbestrahlung. *Dtsch. Gartenbau.* 13(10): 267-268.

Sundqvist, C., Bjorn, L.O. and Virgin, H.I. 1980. Results and problems in cell differentiation. (Ed) In: J. Reinert (Ed) *New York.* pp. 201-224.

Tayama, K.H. 1991. Escena Internacional. Producción, comercialización y demanda mundial de flores de corte ll. *Perspectivas para el Siglo XXI. Floricultura Intensiva.* No.7. Octubre 1991. Editorial La Fuente. México. 15-18.

Torres, C.K. 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. (Ed) An. Avi. booc. Florida. 53-65.

Tsujita, M.J. and Dutton, R.G. 1983. Root zone temperature effects on greenhouse rose in relation to supplementary lighting at reduced air temperature. Hort. Science. 18(6): 874-876.

Van-Acker, M.C.A.M. 1994. Ontogeny of axillary buds and shoot in roses: leaf initiation and pith development. Scientia Horticulturae. 57: 111-122.

Vasil, I.K. 1984. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants. Vol. 1 Laborator y Procedures and their applications. (Ed) Academic Press. Inc. Orlando. 43 p.

Walther, F. and Sauer, A. 1986. Analysis of radiosensitivity. A basic requirement for in vitro somatic mutagenesis. 3 Rose cultivars. Gartenbauwissenschaft. 51(1): 40-43.

Wann, S.R., Johnson, M.A., Noland, T.L. and Carlson, J.A. 1987. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of Picea abies (L) Karst. Plant Cell Rep. 6:39-42.

Yamaguchi, H. 1969. Utilization of chronic irradiation in mutation breeding. Japan J. Genetics. 44(1): 425-430.

Bibliografia.

Yasuhira, S., Mitani, H., Lavic, U. and Haberfeld, W. 1991. DNA fingerprint analysis of ornamental plants. *Plant. Science.* 76:91-97.