



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CAMPUS IZTACALA

BO 1332/97
g.1

Organogénesis in vitro de
Begonia x Tuberhybrida, Voss

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
SILVIA TAVERA MARTINEZ



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.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE FISIOLOGIA VEGETAL,
DEL DEPARTAMENTO DE BOTANICA DE LA
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS,
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, BAJO
LA DIRECCION DEL M. EN C. JOSE FRANCO
RODRIGUEZ.**

EN COLABORACION CON:

BIOL. MA. VICTORIA HERNANDEZ PIMENTEL

¡ NO DESISTAS !

Cuando vayan mal las cosas,
como a veces suelen ir,
cuando ofrezca tu camino
sólo cuestas que subir.

Cuando haya poco haber,
pero mucho que pagar,
y precisés sonreír
aún teniendo que llorar.

Cuando ya el dolor te agobie
y no puedas más sufrir,
descansar acaso debes,
¡pero nunca desistir!

Tras las sombras de la duda,
ya plateadas, ya sombrías,
puede bien surgir el triunfo
y no el fracaso que temías.

Y no es dable a tu ignorancia,
figurarse cuán cercano
puede estar el bien que anhelas,
y que juzgas tan lejano.

Lucha, pues por más que en la brega tengas que sufrir,
¡Cuando todo esté peor, más debemos insistir!

Dedico el presente trabajo:

A mis padres, Sirenia y Luis, a quienes agradezco con todo mi corazón todo el apoyo, comprensión, generosidad y amor que me han dado y a quienes adoro con toda mi alma.

A mis queridos hermanos, Jorge Luis, María Guadalupe, Juan Manuel y Jaqueline.

A Victor Manuel, el amor de toda mi vida.

A mi tesoro más valioso y hermoso que tengo, mi linda hijita Karen, el aire que respiro.

A un sueño.....

Agradezco infinitamente:

Al M. en C. José Franco Rodríguez y a la Biól. María Victoria Hernández Pimentel del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la E.N.C.B. del I.P.N., por su apoyo y disposición en la dirección de este trabajo.

A los profesores M. en C. Ernesto Aguirre León, M. en C. Eduardo Barrera Escorcía, Biól. Juan Gerardo Ortiz Montiel y Biól. Silvia Aguilar Rodríguez de la U.N.A.M., Campus Iztacala, revisores y aportadores de valiosas sugerencias para esta tesis.

A Mario García Estrada y Sandra Olmedo Octaviano por su apoyo en la transcripción de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	3
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	5
1. El género Begonia y su importancia	5
2. Clasificación taxonómica	9
3. Descripción botánica	10
4. Cultivo de tejidos vegetales	12
a). Definición y principios básicos	12
b). Micropropagación de Begonia x tuberhybrida	14
c). Factores que influyen en la micropropagación	17
d). Etapas de la micropropagación según Torres, 1989	17
5. Morfogénesis	20
III. OBJETIVOS	23
IV. METODOLOGIA	24
1. La técnica de cultivo de tejidos vegetales.	24
a). Material Vegetal	24
b). Procedimiento	24
2. La técnica tradicional	27
3. La técnica histológica	29
a). Fijación	29
b). Lavado	30
c). Deshidratación y aclarado	30
d). Impregnación e inclusión	30
e). Obtención de cortes	31
f). Tinción de preparaciones	31
g). Observación de preparaciones y obtención de fotografías	31
V. RESULTADOS Y DISCUSION	32
1. Desarrollo del cultivo por la técnica del cultivo de tejidos vegetales	32
a). Adaptación a condiciones ambientales	36
b). Micropropagación	38
2. La técnica tradicional	39
3. Ventajas y desventajas entre la técnica de cultivo de tejidos vegetales y la técnica tradicional	43
4. Estudio histológico	44
VI. CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFIA	56
APENDICES	63

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Zonas de distribución del género <i>Begonia</i>	Pág. 5
Fig. 2. Esquema de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss.	11
Fig. 3. Proceso de morfogénesis <i>in vitro</i> (Winton, 1978)	21
Fig. 4. Cronología de la formación de una planta completa de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss, en c.t.v. a partir de explantes de hoja	33

INDICE DE LAMINAS

Lámina IA. Tubérculos de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss	27
Lámina IB. Plantas en floración de 20-30 cm de altura	27
Lámina IC y D. Flores estaminadas de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss.	28
Lámina II. Plántulas de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss. obtenidas por c.t.v.	35
Lámina III. Tejido xilemático	46
Lámina IV. Apariencia de tejido calloso surgido de explantes de hoja de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss.	48
Lámina V. Divisiones celulares en los centros meristimáticos de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss.	50

INDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Resultados obtenidos por diferentes autores en estudios similares de micropropagación con <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss.	16
Tabla 2.	Etapas del cultivo de explantes de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss.	29
Tabla 3.	Número de plantas adultas que finalmente florecieron, derivadas de los brotes que alcanzaron una altura adecuada para pasarse a suelo.	34
Tabla 4.	Lugar y forma de propagación de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss, (según entrevistas realizadas) y precio según edad de la planta.	40
Tabla 5.	Formas de propagación de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss, frecuencia con que se practica y tiempo de propagación en cada caso (según entrevistas realizadas)	41
Tabla 6.	Duración de la floración de <i>B. x tuberhybrida</i> , Voss, temporada de venta, tiempo de cultivo, tamaño de plantas adultas en floración y número de estacas de tallo que se pueden obtener de una planta adulta de 40 a 50 cm.de altura (según entrevistas realizadas)	42

RESUMEN

Begonia x tuberhybrida, Voss, es una planta de ornato de interés comercial que se propaga tradicionalmente por estacas de tallo con hojas ó por tubérculos; invirtiéndose un tiempo considerablemente largo para la obtención de plantas adultas; por lo que se consideró conveniente utilizar la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la obtención masiva de este tipo de plantas.

El proceso de desarrollo que se lleva a cabo utilizando esta técnica se denomina morfogénesis, el cual, puede seguir dos rutas diferentes: la organogénesis y la embriogénesis. Sobre la organogénesis en **Begonia x tuberhybrida**, Voss., ruta de interés en este trabajo, su conocimiento no es muy amplio, por lo que, se consideró importante realizar este estudio para ayudar a comprender dicha ruta.

Se utilizaron explantes de hoja para la obtención de plantas de **Begonia x tuberhybrida**, utilizando el medio de Murashige y Skoog (1962) modificado por Peck y Cumming (1984). Se obtuvieron plantas en floración de 10-15 cm de altura a los 400 días de iniciado el cultivo de explantes.

Las personas entrevistadas que cultivan **B. x tuberhybrida** manifestaron que tradicionalmente, ésta se propaga con mayor frecuencia mediante tubérculos y estacas de tallo con hojas cuya duración es de un año para obtener plantas adultas en floración. Los meses de febrero a julio son los más apropiados para su cultivo y de mayo a noviembre para su venta.

Se tomaron muestras de tejidos de diferentes etapas del cultivo de Begonia x tuberhybrida para la realización de las preparaciones histológicas, en las que, se observaron 2 tipos de tejido: a) formado por células de parénquima localizadas en la parte central del callo, las cuales poseen una gran vacuola, sus núcleos teñidos con gran intensidad y nucleolos no aparentes, y b) formado por células meristemáticas localizadas en el centro del tejido calloso así como en la periferia del mismo. Son células pequeñas con núcleos grandes, teñidos con poca intensidad y sus nucleolos son muy aparentes.

Las células meristemáticas se observaron formando agregados que son denominados centros meristemáticos donde frecuentemente se observaron figuras mitóticas, lo cual no sucede en células vacuoladas.

Las células parenquimatosas se observaron con abundantes gránulos de almidón, lo cual ha sido interpretado por varios autores como la fuente de energía utilizada para la realización de todos los procesos metabólicos relativos a la división y diferenciación celular.

Las observaciones realizadas mostraron que Begonia x tuberhybrida responde bien para su propagación utilizando la técnica de cultivo de tejidos vegetales, aunque es recomendable un mayor control de las condiciones de cultivo.

La respuesta morfogénica obtenida puede contribuir para realizar estudios futuros con Begonia x tuberhybrida.

Organogénesis in vitro de Begonia x tuberhybrida, Voss.

I. INTRODUCCION

La técnica de cultivo de tejidos vegetales (ctv) es una herramienta eficaz y de gran utilidad en varias áreas de la investigación científica como por ejemplo la propagación de diferentes tipos de plantas, el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma, etc.

Una de las aplicaciones prácticas que más se le ha dado es en el área de la propagación in vitro o micropropagación de plantas ornamentales, la cual se lleva a cabo mediante el cultivo de explantes de tejidos o de órganos que en condiciones ambientales adecuadas es posible inducirlos a la formación de tejido calloso o brotes para finalmente formar plantas completas en un tiempo menor que el utilizado con las técnicas tradicionales de propagación.

Este proceso de desarrollo se denomina morfogénesis el cual se lleva a cabo a partir de callos o células en cultivo siguiendo generalmente 2 rutas diferentes, la organogénesis y la embriogénesis.

Sobre la organogénesis, ruta de interés en este estudio, su conocimiento no es muy amplio, por lo que es necesario realizar estudios que permitan comprenderla, y así, poder utilizar dicho conocimiento para mejorar y optimizar la propagación de plantas ornamentales económicamente importantes.

Begonia x tuberhybrida es una planta ornamental de interés comercial. Específicamente con esta planta, la información relativa a su proceso organogénético es mínima. Se han realizado estudios en aspectos relacionados con otras especies del género como por ejemplo:

Begonia x hiemalis, Welander, (1977), Simmonds, (1984) y *Begonia rex*, Chlyah y Tran Thanh Van, (1984), o bien con especies de otras familias: *Convolvulus arvensis*, Bonnet, Jr. y Torrey, (1965), *Sinapis alba*, Bajaj y Bopp, (1971) y *Saintpaulia ionantha*, Hernández et al, (1995).

En relación con la propagación *in vitro* de *B. x tuberhybrida* no se tiene conocimiento de estudios realizados en nuestro país, sin embargo, Peck y Cumming, (1984), lida, et al, (1986) y Viseur y Lievens, (1987), realizaron estudios semejantes al presente trabajo.

Tradicionalmente, la propagación de *B. x tuberhybrida*, se hace por estacas de tallo con hojas y por brotación de tubérculo, Corbertt, (1964); Del Cañizo, (1977); Samerón, (1981); Márquez, (1987) y Larson, (1988), para lo cual se requiere de un tiempo considerablemente largo obteniéndose un número reducido de plantas ya que no se pueden hacer más de 10 cortes por planta grande (40 a 50 cm. de altura) y no más de 6 a 8 divisiones por tubérculo grande (4 a 6 cm. de diámetro) Peck Cumming, (1984). Por lo anterior se considera que *B. x tuberhybrida*, Voss, puede ser un buen candidato para la aplicación de la técnica de cultivo de tejidos vegetales encaminada a llevar a cabo una propagación masiva y ampliar el conocimiento de su organogénesis *in vitro*.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1). EL género *Begonia* y su importancia.

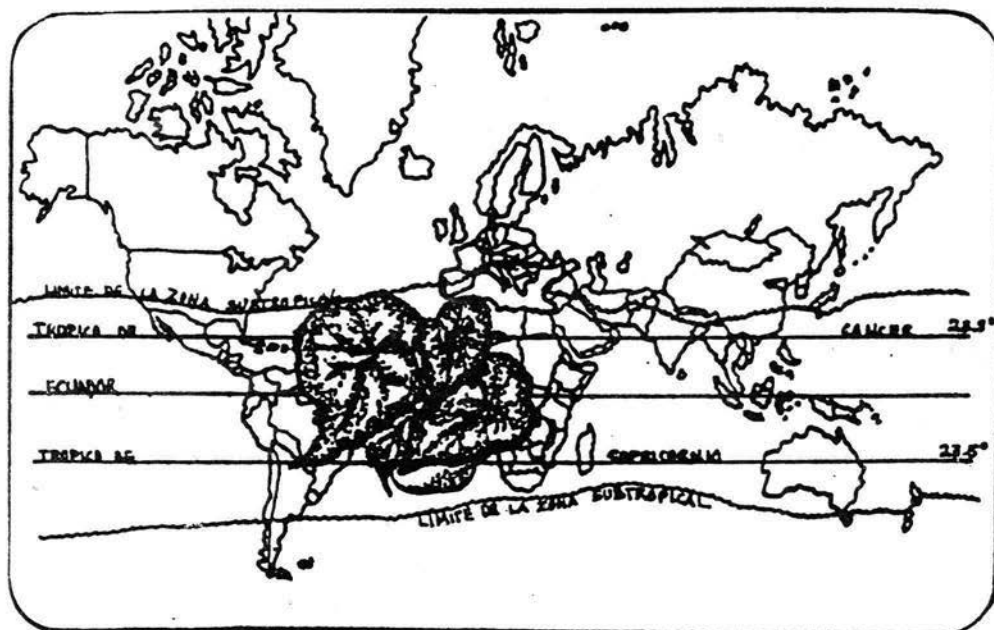


Fig. 1. Zonas de distribución del género *Begonia*.

El género *Begonia* es originario de los países tropicales como Brasil, Colombia, Ecuador, Haití, Argentina, China, Nueva Guinea, Borneo, Filipinas, México, Sumatra, Perú, etc, Barkley, (1972) (Fig. 1). Su nombre fue dado por Charles Plumier (1646-1704) en honor a Michael Begón (1638-1710), quien fuera benefactor de Plumier y promotor de la Botánica en las Islas Caribes, Barkley, (s.f.); Bailey, (1974); Thompsom y Thompsom, (1981); Jiménez, (1986) y Larson, (1988).

En relación a la historia del género la primera publicación conocida apareció en 1651 en *Nova Plantarum Animalium et Mexicanorum Historia* donde Francisco Hernández, describe una begonia con un nombre mexicano **Totoncaxoxo coyollin** la cual había sido descubierta en 1577 y que hoy en día se le conoce con el nombre de ***Begonia gracilis***, HBK.

Posteriormente, numerosos botánicos descubrieron e ilustraron muchas especies de ***Begonia*** recolectadas por todas las regiones tropicales, elaborándose con ello numerosos trabajos acerca del género, contemplando aspectos como descripción y cultivo, Thompson y Thompson, (1981). El género comenzó a figurar como un cultivo de importancia florícola a mediados del siglo XIX, pero los floricultores ingleses ya habían mejorado sus cultivos por medio de cruces desde 1777, Larson, (1988).

El género *Begonia* está compuesto por más de 1000 especies, Barkley, F.A., (1972), y por su gran variedad se divide en cuatro grupos atendiendo a la estructura externa de raíces y órganos de reserva de la planta (tubérculos), Graf, (1978); Thompson y Thompson, (1981) y Baines y Key, (1983).

GRUPO I. *Begonias* bulbosas.

Este grupo comprende sólo a una especie que florece en invierno *Begonia socotrana*.

GRUPO II. *Begonias* tuberosas.

Comprende especies sencillas e híbridos que florecen en verano e invierno, todas poseen tubérculos. El grupo se divide en seis subgrupos, uno de los cuales lo forma el híbrido de interés del presente trabajo.

GRUPO III. *Begonias* rizomatosas.

Comprenden en primer lugar a *Begonia rex* y otras especies similares que son valoradas por su follaje.

GRUPO IV. *Begonias* fibroso-rizomatosas.

Es el grupo más amplio y comprende numerosas variedades e híbridos que florecen principalmente en verano y en ocasiones en invierno.

Begonias tuberosas.

Este grupo está dividido en seis subgrupos siendo diferentes cada uno en su historia y cultivo, Thompson y Thompson, (1981).

En 1860 se descubrieron en Los Andes seis especies tuberosas: *Begonia boliviensis*, *B. clarkei*, *B. davisii*, *B. peareei*, *B. rosiflora*, *B. veichii* y tal vez *B. froebelli*, y *B. gracilis*, entre otras; que a través de su hibridización y selección dieron como resultado a *Begonia x tuberhybrida* que forma al subgrupo tuberhybrida, Thompson y Thompson, (1981), la cual causó gran éxito entre los floricultores y comerciantes de Europa quienes obtuvieron los primeros cultivos con flores dobles en Inglaterra, Francia y Alemania en el año de 1873. Hasta 1919 comenzó el cultivo en América, siendo Estados Unidos uno de los países que tienen la mayor producción en masa de tubérculos (6 - 8 millones al año), Thompson y Thompson, (1981).

El subgrupo *tuberhybrida* se considera comercialmente importante, pues las begonias que lo componen se caracterizan por tener una floración muy atractiva, grandes variaciones en color, forma, tamaño y textura. Hay flores estaminadas y pistiladas en cada planta y de las cuales las primeras son dobles y afortunadamente las más abundantes, Samerón, (1981); Vidalie, (1983); Peck y Cumming, (1984) y Larson, (1988).

2). Clasificación taxonómica.

Según Hutchinson, (1963); Porter (1967) y Cronquist (1977), la clasificación botánica de *B. x tuberhybrida* es:

REINO	VEGETAL
DIVISION	ANTHOPHYTA
CLASE	ANGIOSPERMAE
SUBCLASE	DICOTILEDONAE
ORDEN	CUCURBITALES
FAMILIA	BEGONIACEAE
GENERO	<u><i>Begonia</i></u>
ESPECIE HIBRIDO	<u><i>x tuberhybrida</i></u> , Voss.

Se revisaron y checaron las características de *Begonia x tuberhybrida*, Voss, mediante las claves de Bailey, (1974) y Sánchez, (1979).

3). Descripción botánica.

B. x tuberhybrida es una planta herbácea de tallo y hojas suculentas, hojas asimétricas, enteras con estípulas, flores unisexuales monóicas, las estaminadas con pétalos abundantes (dobles), estambres numerosos agrupados en el centro de la flor con los filamentos muy cortos, libres o soldados basalmente, anteras biloculares de dehiscencia longitudinal, extrorsas; y las pistiladas con juego sencillo de pétalos; gineceo tricarpelar, trilocular, el dorso de los carpelos extendidos en forma de costilla o ala membranosa de las que una es mayor, óvulos numerosos sobre placentas axilares bipartidas; estilos tres cortos, gruesos, bífidos, contorneados. Fruto capsular membranoso, provisto de 3 alas; semillas pequeñas y numerosas.

Flores varias en una planta con una amplia gama de colores, blanco, rosa, rojo, amarillo o naranja, también matizados con 2 ó 3 colores de los anteriores en una sola flor. Normalmente florecen en exteriores durante el verano y sus tubérculos entran en letargo en invierno, ocasionalmente florecen bajo luz artificial o en otras estaciones, Bailey, (1974) y Sánchez, (1979). Fig. 2.

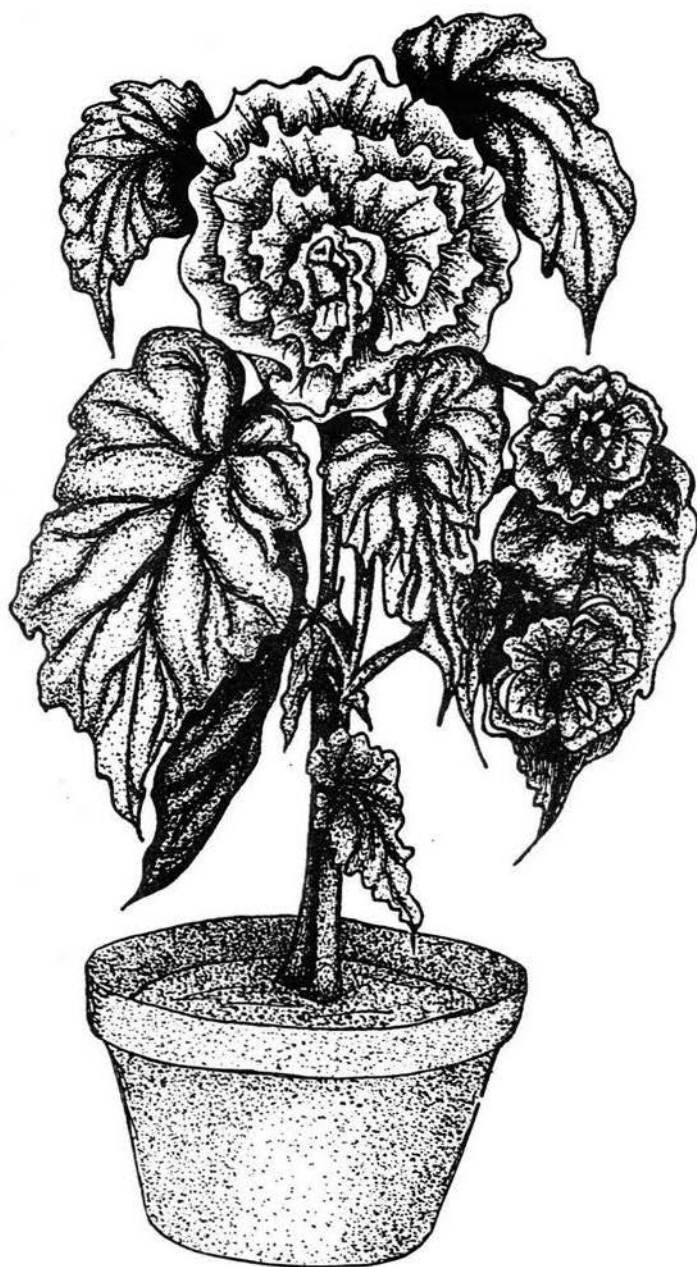


Fig.2. Esquema de *Begonia x tuberhybrida*, Voss.

4). Cultivo de Tejidos Vegetales.

a). Definición y principios básicos.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que utiliza cualquier tipo de célula aislada, tejido u órgano vegetal para su cultivo in vitro en condiciones de asepsia adecuadas basada en la totipotencialidad de las células vegetales, que es la capacidad de reproducir en su totalidad las características de la planta de la cual provienen, Hartmann, (1984); Balderas, (1989) y Robert y Loyola, (1990).

Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales:

- 1). Aislar fragmentos de tejidos u órganos de una planta completa,
- 2). Desinfestar los fragmentos de tejidos u órganos para eliminar superficialmente los microorganismos que pudieran causar problemas de contaminación y,
- 3). Proporcionarles un ambiente apropiado a través de un medio de cultivo en el cual pueda expresar su capacidad intrínseca o inducida, así como condiciones de incubación óptimas.

En nuestro país, los estudios en el área de cultivo de tejidos vegetales se iniciaron hace 25 años en investigaciones básicas y aplicadas, Robert y Loyola, (1990).

Primordialmente, los aspectos en los que el empleo de esta técnica es importante, son los siguientes:

- a). La micropropagación de cultivares económicamente importantes libres de patógenos como por ejemplo las plantas ornamentales.
- b). La preservación de germoplasma agronómico y silvestre, ya que la destrucción de los ecosistemas por sobreexplotación y contaminación, y la introducción de variedades de alta productividad han provocado la disminución de la variabilidad genética de las especies cultivadas y silvestres.
- c). El mejoramiento genético, pues mediante el cultivo de células in vitro se pueden obtener nuevas variedades tolerantes a la sequía o a la salinidad, resistentes a los hongos patógenos, plaguicidas, etc.
- d). Aplicaciones en la industria farmacéutica para la biosíntesis o biotransformación de metabolitos secundarios como aceites esenciales, glucósidos, alcaloides y enzimas.

Es importante hacer notar que la mitad de los proyectos que se llevan a cabo en México con cultivo de tejidos vegetales se dirigen a la micropropagación Whithers, (1981); citado en Robert y Loyola, (1990), y que en nuestro país es el área en que se pueden obtener aplicaciones a corto plazo y tener empleo inmediato tanto para la solución de problemas a nivel agrícola nacional como en la explotación comercial de plantas ornamentales, Balderas, (1989) y Robert y Loyola, (1990).

b). Micropropagación de *B. x tuberhybrida*.

En el aspecto de micropropagación son numerosas las plantas con las que se ha trabajado, entre ellas se puede citar a *Saintpaulia-ionantha*, Start y Cumming, (1976) y Cooke, (1977); *Gerbera jamesonii*, Murashige, (1974); especies de cactáceas como por ejemplo *Mammillaria san-angelensis*, Martínez-Vázquez y Rubluo, (1989), así como especies del género *Begonia*, sin embargo, los estudios realizados con *B. x tuberhybrida* han sido pocos, Debergh y Maene, (1981) dan una metodología a seguir en el laboratorio para la propagación de plantas ornamentales por cultivo de tejidos. En este trabajo mencionan a *B. x tuberhybrida* como una de las plantas apropiadas para propagarse por este método ya que presenta varias ventajas sobre la técnica tradicional tales como la reducción del tiempo de propagación, la multiplicación masiva de plantas en un espacio físico reducido y los bajos costos, logrando así un mayor control sobre la sanidad del material durante la micropropagación, Debergh y Maene, (1981) y Balderas, (1989).

Peck y Cumming, (1984), establecieron un método de micropropagación por cultivo de tejidos de *B. x tuberhybrida* en el cual emplearon secciones de hoja de 2 x 2 cm, obteniéndose cinco explantes por hoja que a su vez subcultivados produjeron en promedio 125 brotes y una vez separados alcanzaron un crecimiento vigoroso bien desarrollados llegando a plantas adultas, todas similares a la planta madre en un tiempo de 6 a 7 meses después de iniciado el cultivo de explantes. (Tabla 1)

lida, et al, (1986) realizaron un estudio de propagación en masa de B. x tuberhybrida, Voss, con la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Utilizaron explantes de 7 x 7 mm y obtuvieron brotes a los 70 días de iniciado el cultivo, concluyendo que podrían obtener de un segmento de este tamaño 105 plántulas en un año. (Tabla 1)

Viseur y Lievens, (1987), realizaron la propagación in vitro de B. x tuberhybrida a partir del cultivo de callos y obtuvieron que el tiempo de un ciclo completo desde iniciado el cultivo in vitro hasta la obtención de las primeras plantas floreciendo, fue de 270 días, obtuvieron 297 plantas, en las cuales, después de la floración se observaron tubérculos de 4 cm. de diámetro aproximadamente. (Tabla 1)

En Estados Unidos se realiza la producción de B. x tuberhybrida mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, no siendo así en México, Grower y Talks, (1989), citado en Gómez-Flores, (1990), ya que hasta ahora B. x tuberhybrida se propaga mediante la técnica tradicional como es el estacado de tallo y por cultivo de tubérculo (Sra. Teresita Hernández y Sra. Paula Ramírez, (1996), comunicación personal). (apéndice 1).

	CANADA Peck y Cumming, 1984	JAPON Iida, et al, 1986	BELGICA Viseur y Lievens, 1987	MEXICO Tavera Mtz., 1997
SUPERFICIE DEL EXPLANTE	2 x 2 cm	7 x 7 mm	callo de peciolo	2 x 2 cm
FORMACION DE CALLO	28 días	-----	-----	25-30 días
PRODUCCION DE BROTES	56 días	70 días	-----	50 días
TRANSFERENCIA A SUELO	150 días (propágulos)	100 días (plántulas)	210 días	160 días
FORMACION DE RAICES	No son viables (se invierte más tiempo)	100 días	-----	305 días
FORMACION DE TUBERCULO	-----	-----	270 días (tubérculo de 4 cm. de diámetro)	357 días (tubérculo de 1.5 cm. de diámetro)
FLORACION	210 días	-----	270 días	400 días
NO. DE PLANTAS OBTENIDAS	125 (5 exp)	105 (1 exp)	297 (---)	51 (22 exp)

Tabla 1. Resultados obtenidos por diferentes autores en estudios de micropropagación similares con *B. x tuberhybrida*, Voss.

c). Factores que influyen en la micropropagación.

Un factor importante es el estado fisiológico en que se encuentra la planta donadora de explantes, ya que hace que éste responda de manera diferente bajo condiciones in vitro, Altman y Goren, (1977).

También es importante la interacción de factores químicos y físicos que proporcionan al explante las condiciones favorables para el estímulo de su desarrollo. Entre los factores químicos están las sales minerales, complementos orgánicos, fuentes de carbono, vitaminas y reguladores del crecimiento que constituyen el medio de cultivo. Entre los factores físicos se considera el pH y la consistencia del medio, la luz y la temperatura, Tran Thanh Van, (1981); Christianson y Warnick, (1988).

d). Etapas de la micropropagación. Torres, (1989).

1). Etapa 0. Selección o preparación de la planta donadora.

En esta etapa se seleccionan las plantas que sirven como plantas donadoras las cuales deben estar libres de enfermedades y ser mantenidas bajo condiciones adecuadas de temperatura, fotoperíodo, intensidad de luz y agua. Las variaciones sin control de estos factores pueden afectar los niveles de carbohidratos, proteínas y otras sustancias que subsecuentemente afectan la respuesta del explante in vitro.

Las plantas que sirven como donadoras deben estar en su fase activa de crecimiento, pues es cuando se obtienen los mejores resultados.

2). Etapa I. Establecimiento de un cultivo aséptico.

La primera meta de esta etapa es obtener un alto porcentaje de explantes con una superficie libre de patógenos. Esto se logra, lavando el tejido y esterilizando con uno o más desinfectantes.

3). Etapa II. Multiplicación del tejido.

En esta etapa el material vegetal de la etapa I es repetidamente subcultivado cuando ya ha formado tejido caloso y cuando hay formación de brotes.

4). Etapa III. Enraizamiento y acondicionamiento in vitro.

En esta etapa, que generalmente es larga las plántulas enraizan y se condicionan hasta cierto grado, aunque se ha reportado que los sistemas de raíces originados in vitro son raramente funcionales cuando son transferidos a suelo debido a que las raíces son generalmente frágiles y se dañan en la transferencia.

Entre los factores que influyen para el enraizamiento de plántulas están: los reguladores del crecimiento, los macronutrientes los micronutrientes, los complementos orgánicos, el medio de soporte, la luz y la temperatura.

5). Etapa IV. Enraizamiento in vivo y aclimatación.

En ésta se dá el enraizamiento de las plántulas fuera de las condiciones in vitro. Las mezclas utilizadas para el enraizamiento in vivo generalmente incluyen materiales como perlita, vermiculita, arena y suelo y pueden ser complementadas con una pequeña cantidad de fertilizante.

La aclimatación que es el proceso mediante el cual un organismo se adapta a los cambios medioambientales, es necesaria, porque las plántulas obtenidas in vitro no están adaptadas a condiciones in vivo.

5). **Morfogénesis.**

La morfogénesis (origen de la forma) implica el estudio de los resultados del desarrollo controlado experimentalmente y el análisis de los efectos de varios factores externos e internos que determinan y explican como ocurre el desarrollo de la forma, Sinnot, (1960); citado por Vargas, (1982).

Dicho proceso de desarrollo a partir de callos o células en cultivo, generalmente sigue dos rutas diferentes,

Raghavan, (1978); Winton, (1978) y Redway, (1991).:(Fig. 3).

1). Organogénesis.

En esta ruta se da la formación de primordios de tallo, seguida del desarrollo de la parte aérea de la plántula y su enraizamiento.

2). Embriogénesis.

En esta se lleva a cabo la formación de embriones somáticos que siguen cambios estructurales u organizacionales semejantes a los que ocurren en el cigoto durante la embriogénesis sexual.

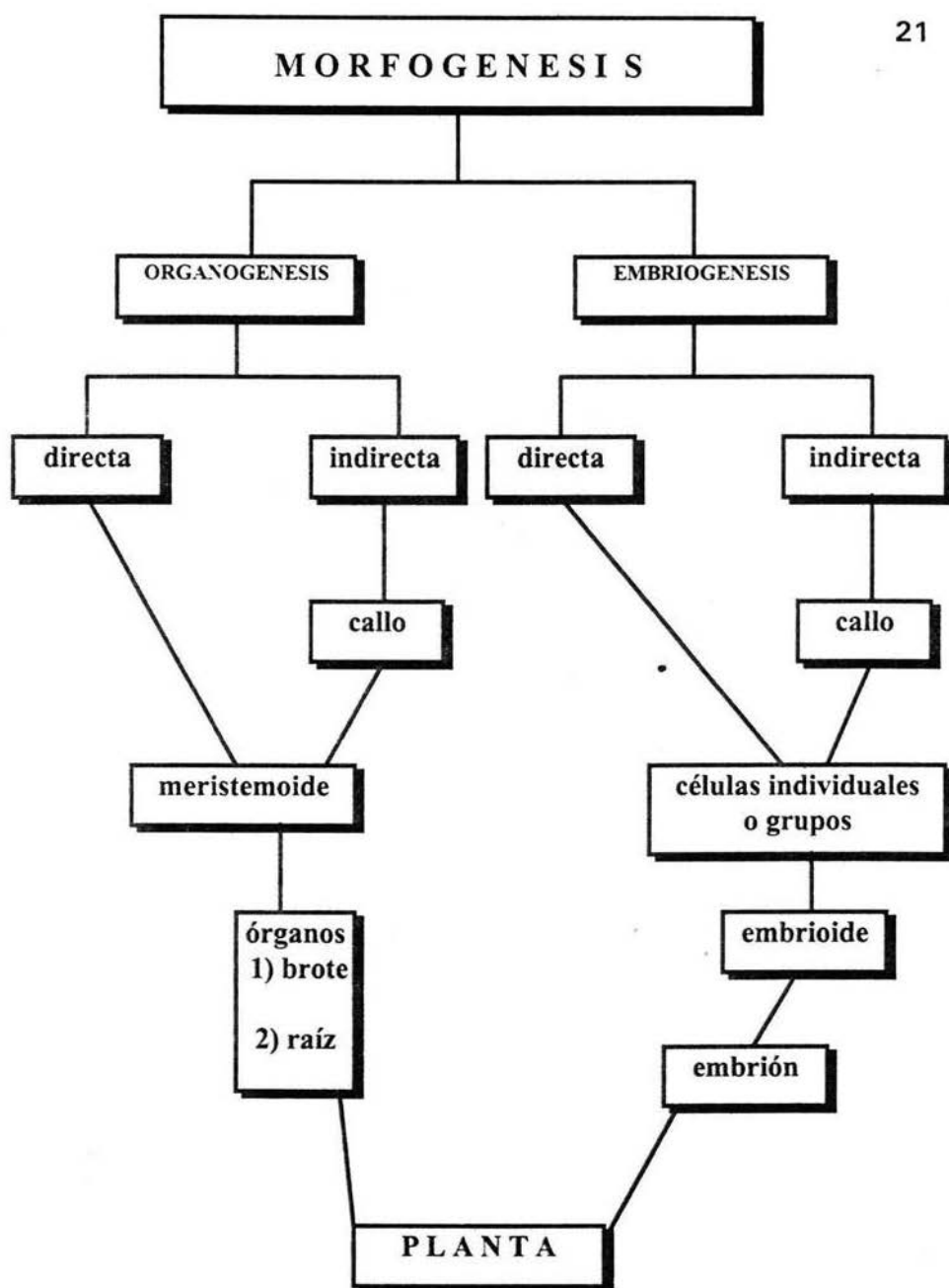


Fig. 3. Proceso de Morfogénesis *in vitro* Winton, (1978).

En el mecanismo de ambas rutas se siguen dos patrones generales de diferenciación:

1). Diferenciación directa.

En ésta, la formación de órganos o embriones se origina de los tejidos cultivados sin pasar por la etapa de formación de callo.

2). Diferenciación indirecta.

En la que la formación de callo es un prerequisite para el desarrollo de órganos. En la organogénesis el proceso de diferenciación celular está controlado por diversos elementos nutricionales, hormonales y ambientales.

La información de que se dispone de como se induce y controla el proceso en general, es empírico. Aún no se explica el mecanismo a través del cual se producen las alteraciones metabólicas que finalmente conducen a la organogénesis, sin embargo, se ha atribuido que el cambio en la concentración de hormonas en el medio de cultivo es el factor más relacionado con este proceso, Thorpe, (1978) y (1982); Robert y Loyola, (1990); y el cual ha sido estudiado en varias plantas como por ejemplo el tabaco, Skoog, (1944); Ross, *et al*, (1973); *Convolvulus*, Howard y Torrey, (1965); *Sinapis alba*, Bajaj y Bopp, (1971); *Torenia*, Chlyah, (1974); almendro, Mehra y Mehra, (1974), diferentes cultivares de *B. x hiemalis*, Welander, (1977).

III. OBJETIVOS

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Obtención masiva de plantas de *B. x tuberhybrida*, Voss, a partir de explantes foliares.
2. Analizar algunos aspectos anatómicos del proceso organogenético que se lleva a cabo con explantes foliares de *B. x tuberhybrida*, Voss.
3. Analizar las ventajas y desventajas entre la técnica de cultivo de tejidos vegetales y la técnica tradicional en la obtención de plantas de *B. x tuberhybrida*, Voss.

IV. METODOLOGIA

1. La técnica de cultivo de tejidos vegetales.

a). Material vegetal.

Se compraron plantas de *B. x tuberhybrida* para ser utilizadas como plantas madre y las cuales se identificaron mediante las claves de Bailey, 1974 y Sánchez, (1979).

b). Procedimiento.

Se eligieron las hojas más vigorosas y sanas, las cuales se lavaron tres veces con agua de la llave y detergente; a partir de este momento se trabajó en una campana de flujo laminar con el fin de mantener el material en condiciones de asepsia. Posteriormente, se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 6 %, v/v durante 4 min. después se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril, posteriormente con la ayuda de un bisturí y de pinzas estériles se eliminaron los bordes, los pecíolos y se cortaron en fracciones de 4 cm² dentro de una caja de petri estéril y se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril, dentro de un vaso de precipitados. Para sembrar los explantes obtenidos se preparó un medio semisólido inductor de yemas, Peck y Cumming, (1984), utilizando las sales de Murashige y Skoog, (1962) (apéndice 2) y el complemento de Peck y Cumming, (1984), (apéndice 3), se adicionaron también 30 g/l de sacarosa.

Este medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.8; se agregaron 6.5 g/l de agar bacteriológico, se calentó para disolverlo y se distribuyó a frascos de 135 ml. los cuales se taparon con papel aluminio y se esterizaron en una olla express a 15 libras de presión y a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

Los cultivos se mantuvieron a la temperatura ambiente del laboratorio (22 a 25 °C) con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad y una intensidad de iluminación de 2500 a 3000 lx aproximadamente.

Las plántulas obtenidas se transplantaron dentro de palanganas sobre una mezcla de suelo poroso de 4 cm de espesor previamente esterilizado con calor a una temperatura de 150 °C en una estufa durante 1 hora. Posteriormente, las palanganas se cubrieron con plástico con el fin de mantener una humedad relativamente alta, fijando éste alrededor de las mismas mediante ligas. Al plástico así colocado se le hicieron pequeñas perforaciones para permitir la circulación de aire.

Cuando las plántulas alcanzaron un promedio de 5 - 7 cm de altura se retiró la cubierta plástica. La formación de raíces se pudo verificar en plántulas de 5 - 10 cm de altura a los 305 días. La formación de tubérculo de 1.5 cm de diámetro se observó en plantas de 10 - 15 cm de altura a los 357 días. Lámina I A.

Posteriormente las plantas se transfirieron individualmente a macetas, a los 400 días se observó la floración de éstas cuando alcanzaron un tamaño de 20 a 30 cm de altura. Lámina I, B, C y D. Posteriormente se colocaron en invernadero manteniéndose a 25 ± 2 ° C con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 de oscuridad.

2. La técnica tradicional.



Lámina I.A. Tubérculos de *Begonia x tuberhybrida*, Voss. B. Plantas en floración de 20-30 cm de altura.

Con el fin de conocer las formas de propagación que se utilizan para obtener plantas de *Begonia x tuberhybrida*, se realizaron encuestas a personas dedicadas a la venta de *Begonia x tuberhybrida* en los siguientes lugares: Exposición Permanente de Floricultores y Viveristas de Xochimilco, D.F., Mercado Benito Juárez, Mercado Reforma e Invernadero de San Juan del Río, Qro. y en casas particulares del pueblo El Sitio, Qro. en el que la mayoría de las casas tienen esta planta (apéndice 1).

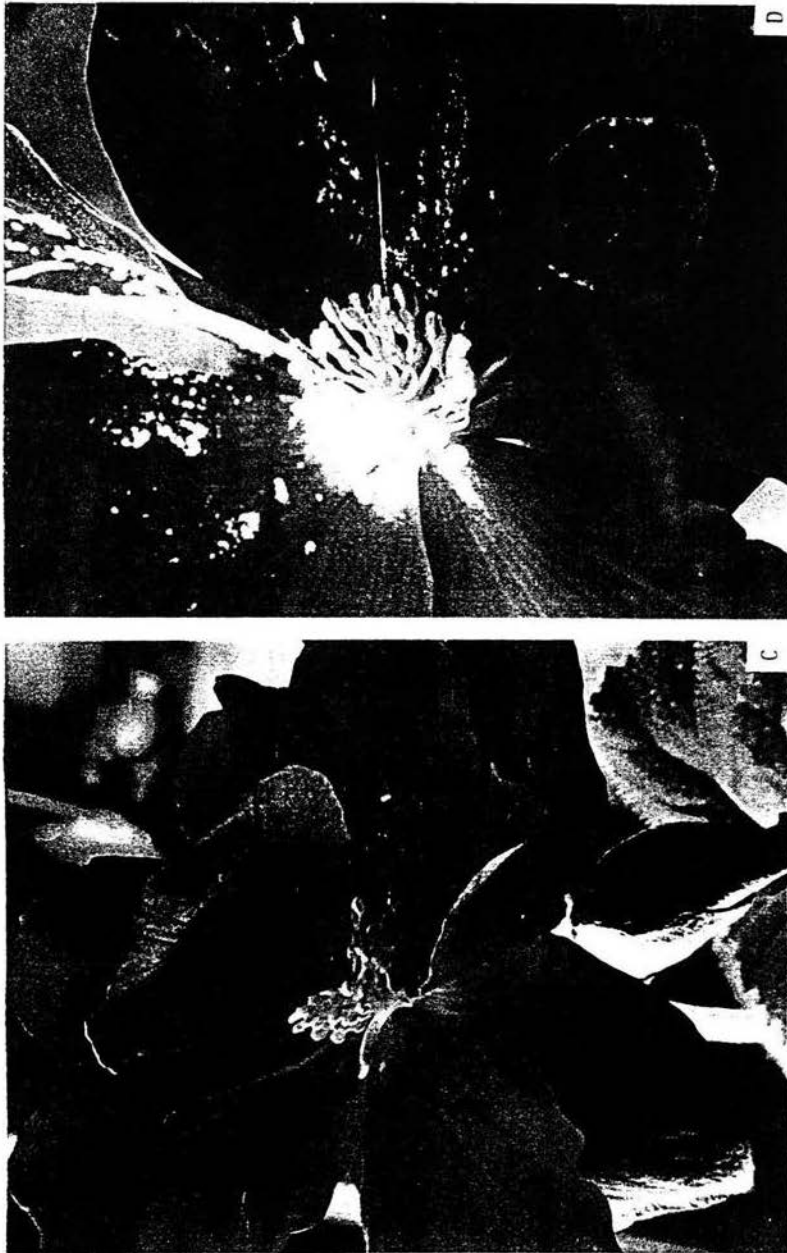


Lámina I. C y D. Flores estaminadas de *B. x tuberhybrida*, Voss.

3). La técnica histológica.

Se establecieron diferentes etapas del cultivo de explantes de *B. x tuberhybrida*. (Tabla 2).

Tejido original día 0	Formación de callo (inicio). 13 a 16 días	Callo bien formado 25 a 30 días	Brote 40 a 50 días
--------------------------	---	---------------------------------------	-----------------------

Tabla 2. Etapas del cultivo de explantes.

De cada etapa se tomaron muestras de tejido las cuales fueron procesadas con el fin de obtener preparaciones histológicas para un sistema óptico de campo claro, Jensen, (1962) y Jensen y Salisbury, (1984).

A continuación se describe la técnica utilizada:

a). Fijación.

Los tejidos callosos tomados de las diferentes etapas de cultivo se fijaron por 24 horas con el fin de conservar sus características morfológicas y químicas. La solución fijadora fue Formol-Acético-Alcohol (FAA):

Formaldehído _____ 50 ml
 Ac. acético glaciado _____ 25 ml
 Etanol absoluto _____ 250 ml
 Agua destilada _____ 175 ml

b). Lavado.

Los tejidos fijados se lavaron 5 veces con agua destilada durante 2 a 3 minutos cada vez para eliminar del tejido la solución fijadora.

c). Deshidratación y aclarado.

La deshidratación y aclarado de los tejidos se realizó mediante su paso por una serie gradual de etanol y xilol, como sigue:

Etanol	Tiempo
30%	1 hora
50%	1 hora
70%	1 hora
80%	1 hora
96%	15 min. (2 veces)
100%	15 min. (2 veces)
etanol abs-xilol 1:1	7 min.
xilol	2 min.

d). Impregnación e inclusión.

La impregnación de la parafina en los tejidos para darles consistencia se realizó de manera gradual utilizando la siguiente serie de parafinas:

Parafina	(49-51 ° C)	xilol 1:1	___	40 min.
Parafina pura	(49-51 ° C)	_____		40 min.
Parafina pura	(56-58 ° C)	_____		40 min.

e). Obtención de cortes.

Se obtuvieron cortes de 8 micras utilizando un microtomo mecánico marca American Optical Modelo 820. Posteriormente los cortes se montaron sobre un portaobjetos con la ayuda de un baño de flotación con una solución de gelatina (0.2 g/l) a una temperatura de 45 a 50 ° C, después de lo cual se colocaron dentro de una estufa a 60 ° C para derretir la parafina y fijar el tejido al portaobjetos, rotulando posteriormente cada uno de ellos.

f). Tinción de preparaciones.

En la tinción de los cortes se utilizó la técnica de Ac. Peryódico - Reactivo de Schiff (PAS) para oxidar a los carbohidratos, combinada con hematoxolina para observar núcleos y estructuras mitóticas, Sheehan y Hrapchak, (1980).

g). Observación de preparaciones y obtención de fotografías .

Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico marca Zeiss, en un sistema de campo claro.

Las fotografías se obtuvieron utilizando un microscopio marca Nikon con película Kodak-Gold-100 de 35 mm.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Desarrollo del cultivo por la técnica de c.t.v.

Se realizaron 6 siembras con un total de 200 explantes los cuales se obtuvieron de 20 hojas de 8 plantas de *Begonia x tuberhybrida*.

En los cultivos iniciales hubo necrosis de los explantes y contaminación por hongos. Torres (1989), menciona que la necrosis u oxidación del tejido se puede prevenir de varias formas:

1. Removiendo los compuestos fenólicos producidos.
2. Modificando el potencial Redox.
3. Inactivando la enzima fenólica.
4. Reduciendo la actividad de la fenolasa o inhibiendo el sustrato.

Estos compuestos fenólicos también pueden ser removidos transfiriendo frecuentemente el tejido durante la segunda a cuarta semana en cultivo con un intervalo de tranferencia de 1 a 5 días.

También este problema se resuelve poniendo una solución estéril anti-oxidante inmediatamente después de la excisión como ácido ascórbico o ácido nítrico, Torres, (1989). En este caso se realizaron 5 resiembras en la primera etapa de cultivo (inicio de formación de callo) con intervalo de 10 días entre cada una. También se modificó el tiempo de exposición en hipoclorito de sodio de 5 min. a 4 min., encontrando con ello menos daño al tejido y una mejor condición de asepsia. Asimismo, para evitar la contaminación por hongos se sumergieron las hojas para la obtención de explantes en una solución de manzate (fungicida) a una concentración de 1 g/lt. Sin embargo, no se observó disminución de esta contaminación.

Dos semanas después de la siembra se observó en la parte central de la superficie de los explantes el inicio de la formación de callo, principalmente en la parte del tejido en contacto con el medio de cultivo.

Después de cuatro semanas de cultivo hubo formación de tejido calloso abundante de un color verde limón y apariencia nodular del cual se obtuvieron a los 50 días un total de 1708 brotes de los cuales 388 una vez que alcanzaron un tamaño de 3 a 5 cm de altura se plantaron en una mezcla de suelo poroso después de 160 días de cultivo. Lámina II A, Lámina II B y C. Alcanzando 51 de éstos la edad adulta (etapa de floración). (Fig. 4) Tabla 3.

1 Cultivo del explante. día 0	2 Inicio de formación de callo: 13-16 días. Callo bien formado: 25-30 días.	3 Formación de brotes: 40-50 días.	4 Transferencia a suelo de plántulas de 3-5 cm. de altura: 160 días.
5 Formación de raíces en plántulas de 5 a 10 cm. de altura: 305 días.	6 Formación de tubérculo (1.5 cm. de diam.) en plantas de 10-15 cm. de altura: 357 días.	7 Plantas floreciendo: 400 días.	

Fig. 4. Cronología de la formación de una planta completa de *B. x tuberhybrida*, Voss, en c.t.v. a partir de explantes de hoja.

No. de siembra	No. de explantes	No. brotes en explantes sobrevivientes	No. de brotes de 3-5 cm. de altura transferidos a suelo	No. de plantas adultas que florecieron
1	24	572 (8 expl.)	46	6
2	28	73 (3 expl.)	25	12
3	34	82 (4 expl.)	17	-
4	42	231 (3 expl.)	110	3
5	30	321 (3 expl.)	74	7
6	42	429 (1 expl.)	116	23

Tabla 3. No. de plantas adultas que finalmente florecieron, derivadas de los brotes que alcanzaron una altura adecuada para transferirse a suelo.



Lámina II. Plántulas de *B. x tuberhybrida* obtenida por c.t.v., listas para transplantarse. A. Plántulas en medio de cultivo (agar) que alcanzaron un tamaño de 1.5 a 3 cm. para ser transferidas a suelo. B. Plántulas transferidas a suelo. C. Plántulas a las cuales se les retiró la cubierta plástica.

a). Adaptación a condiciones ambientales.

Sin duda, uno de los mayores obstáculos para la micropropagación de plantas in vitro es la aclimatación o adaptación de las plantas a las condiciones ambientales.

Torres, (1989) menciona que la aclimatación es necesaria porque las plantas que se obtienen in vitro no están adaptadas a condiciones in vivo. El primer problema en este caso fue la deshidratación, a esto, siguió la contaminación por hongos de la plántula completa. Esta contaminación también se observó como manchas blancas polvosas en las hojas de las plantas jóvenes y de las adultas en floración.

Se trató de crear un ambiente apropiado cubriendo las plántulas con plástico el cual se fue perforando poco a poco para reducir gradualmente la humedad en su ambiente; ya que éstas al encontrarse in vitro en los frascos cerrados se adaptaron a un ambiente muy húmedo.

Torres, (1989) indica que varios factores como la fotosíntesis en cierta proporción, y la cera cuticular en las hojas pueden estar asociadas con la baja supervivencia de las plántulas que se obtienen in vitro, ya que éstas crecen sobre un medio enriquecido de carbohidratos y generalmente sólo producen una pequeña parte de carbohidratos a través de la fijación de CO_2 fotosintético, lo cual, al transferirse a condiciones in vivo no resulta ventajoso pues entonces las plántulas deben convertirse en autótrofas, esto es, en independientes y fabricar todas las sustancias necesarias para su crecimiento lo cual en ocasiones no se logra pues las plántulas transferidas utilizan una gran cantidad de energía en la adaptación a su nuevo ambiente.

Sutter y Langhans, (1978), mencionan que las plántulas que se obtienen in vitro tienen una reducida cera cuticular o carecen de la misma en la superficie de las hojas. Esta reducción en la cera cuticular causa que las plántulas pierdan agua más rápidamente que las plántulas normales y puede contribuir a la poca supervivencia de las plántulas. La alta humedad presente en los cultivos en frascos puede ser responsable de la reducción en la cera de la superficie de las hojas. Otra causa de la pérdida de agua en la superficie de las hojas es el funcionamiento anormal de los estomas. Wardle, et al., (1983), demuestra que rociando las plántulas con un antitranspirante también es beneficioso para las mismas. Torres, (1989), indica que el tratamiento con fungicidas puede contribuir a la supervivencia de las plántulas ya que los tejidos vegetales pueden tener contaminantes internos, los cuales las técnicas tradicionales no eliminan.

Thorpe y Biondi, (1981), mencionan que la selección del explante es un parámetro importante en los sucesos de la organogénesis.

Murashige, (1974), discute varios factores que deben ser considerados en la elección del explante y entre los cuales se encuentran:

1. El tejido u órgano que sirve como explante.
2. La edad del órgano.
3. La estación en la cual se obtiene el explante.
4. El tamaño del explante.
5. La calidad de la planta madre.

b). Micropropagación.

Se obtuvieron 51 plantas que corresponden al 15.5% del total de brotes que alcanzaron un tamaño de 3.5 cm de altura. Los brotes se produjeron en 200 explantes de 20 hojas de 8 plantas de *Begonia x tuberhybrida*. Es decir, utilizamos 8 plantas para obtener 51 de éstas. (Tabla 3)

El período para llegar a este resultado fué de alrededor de un año, (Fig. 4) sin embargo, mediante la propagación por la técnica tradicional nos ocuparía un tiempo semejante y de esas 8 plantas sólo obtendríamos 16, (información de entrevistas), pues por lo regular solo se obtienen 2 estacas por planta adulta y en ocasiones no todas tienen éxito.

Mediante la técnica tradicional *B. x tuberhybrida* tiene requerimientos ambientales estrictos que limitan su propagación, Larson, (1988), además que el tiempo para la obtención de plantas es considerablemente largo y el número de ellas muy reducido, ya que no se pueden hacer más de 10 cortes por planta grande (40 a 50 cm de altura), Peck y Cumming, (1984).

2. La Técnica tradicional.

Considerando la información obtenida en las encuestas realizadas a personas dedicadas a la venta de plantas de ornato y entre ellas de *B. x tuberhybrida*, se obtuvieron los siguientes datos:

Se encontró que la forma de propagación más usual es mediante el cultivo de tubérculos, en segundo término es por el estacado de hoja ya que el tallo con hojas o sólo con hojas presentan mayor dificultad por el fenómeno de deshidratación y cuando llegan a "prender" tardan hasta un año para considerarse como una planta adulta (Tabla 4).

Su cultivo por medio de tubérculos es el proceso más utilizado hasta el momento pero mediante este órgano por lo general se obtiene una sola planta adulta. Cuando las plantas terminan su ciclo de floración, se corta el tallo y se deja el tubérculo en el suelo, el cual ya no se riega hasta la siguiente temporada de crecimiento, o bien se saca del suelo y se mantiene en un lugar seco hasta el siguiente ciclo. Empleando los tubérculos se facilita su cultivo y se obtiene una planta adulta a los 5 meses aproximadamente y por estacas de tallo con hoja, tarda 11 meses en promedio. (Tabla 5).

En México la temporada de cultivo son los meses de febrero a julio y de mayo a noviembre, los meses para la venta, pues es cuando ya se tienen plantas adultas hasta de 50 cm. de altura en floración llegando a durar ésta hasta 45 días en promedio. (Tabla 6).

Lugar donde se propaga y forma de propagación usada			Precio según edad de la planta		
Laboratorio	Invernadero	Casa	Edo.vegetativo	Floración	Tubérculo
x	Tubérculo 7	Estaca tallo: 6 Estaca hoja: 1 Tubérculo: 8	x	\$ 20.00	\$ 12.00

Tabla 4. Lugar y forma de propagación usada con mayor frecuencia (según entrevistas realizadas) y precio según edad de la planta.

Forma de propagación	CTV	Estaca de tallo con hoja	Estaca de hoja	Tubérculo
Frecuencia	X	5	1	15
Tiempo de cultivo en cada caso	X	11 meses en promedio	X	5 meses en promedio

Tabla 5. Diferentes formas de propagación, así como frecuencia con que cada una se practica (según las entrevistas realizadas), y tiempo de propagación en cada caso.

1 No. de estacas de tallo que se pueden obtener de una planta adulta de 50 cm. de altura.	2 Meses de cultivo	3 Tamaño de la planta adulta en floración.	4 Duración de la floración.	5 Meses de venta.
2	febrero a julio	40 - 50 cm. de altura.	45 días en promedio	mayo a noviembre

Tabla 6. Duración de la floración, temporada de venta, tiempo de cultivo, tamaño de una planta adulta en floración y estacas de tallo que se pueden obtener de una planta adulta de 40 a 50 cm de altura (según entrevistas realizadas).

3. Ventajas y desventajas entre la técnica de cultivo de tejidos vegetales y la técnica tradicional.

TECNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

Ventajas:

1. Se obtiene un gran número de plantas a partir de una pequeña fracción de hoja.
2. Puede redituar a corto plazo la inversión realizada para el proyecto de propagación masiva.
3. Reduce el costo de la planta.
4. Permite el mejoramiento genético de la especie utilizada.
5. Permite la conservación de la especie.

Desventajas:

1. Puede ser costoso el inicio de un proyecto de propagación masiva.
2. No la puede utilizar cualquier persona.

TECNICA TRADICIONAL

Ventajas:

1. Es más económica.
2. La puede poner en práctica cualquier persona.

Desventajas:

1. Por estacas de tallo con hojas se obtiene un reducido número de plantas en un tiempo considerablemente largo. Por estacas de hoja en México la propagación no se practica.
2. Aumenta el costo de la planta.

4. Estudio histológico.

Los cortes histológicos realizados permitieron observar la proliferación (células en mitosis) de callo a partir de células cercanas a los haces vasculares, lo cual puede ser indicio de que existe una relación estrecha entre éstos y el origen de este callo a partir de explantes de *Begonia x tuberhybrida*, Voss. Lámina III A y B.

Así mismo, los cortes histológicos de callo de *Begonia x tuberhybrida*, mostraron la presencia de 2 tipos de tejido que fueron característicos en todos los cortes subsecuentes a diferentes edades.

- a) Formado por células parenquimáticas localizadas en la parte central del callo, éstas poseen una gran vacuola que ocupa casi todo el espacio celular. Sus núcleos son teñidos con intensidad y sus nucleolos no son aparentes. Lámina No. IV A.

- b) Formado por células meristemáticas localizadas tanto en el centro del tejido calloso, así como en la periferia del mismo y las cuales son pequeñas y muestran tinción positiva a PAS, con núcleos grandes en proporción al tamaño de la célula, teñidos con poca intensidad con la hematoxilina: los nucleolos son muy aparentes. Lámina No. IV B.

Las células meristemáticas se observaron formando agregados que han sido denominados centros meristemáticos donde frecuentemente se observaron figuras mitóticas, lo cual no sucede en las células vacuoladas. Lámina V. A y B.

Lámina III.

Tejido xilemático (espirales).

A. Vasos de xilema y células acompañantes; hacia el exterior se observa el callo parenquimatoso. (500x)

B. Acercamiento de un haz vascular (xilema) y células acompañantes. (1200x)

vx = Vasos de xilema

ca = células acompañantes

cp = callo parenquimatoso

hv = haz vascular

L A M I N A III

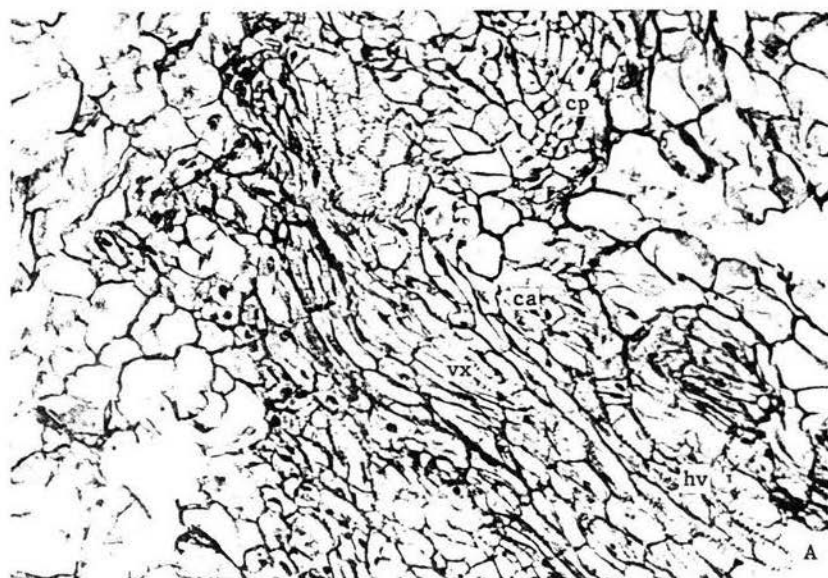


Lámina IV.

Apariencia de tejido calloso surgido de explantes de hoja de *Begonia x tuberhybrida*, Voss.

A. Tejido calloso constituido de células parenquimatosas y pequeños grupos de células meristemáticas hacia la periferia. (450x)

B. Detalle de A. (Amplificación). Células parenquimatosas hacia el interior del callo (4000x).

cm = célula meristemática.

cp = células parenquimáticas.

LAMINA IV

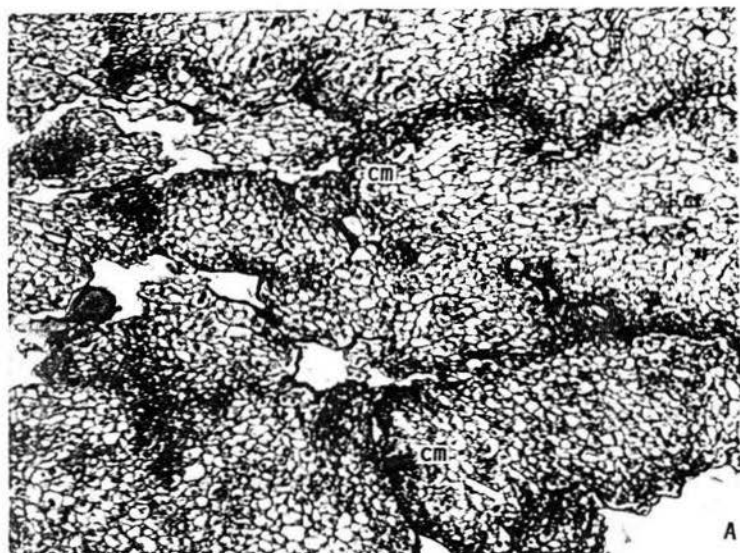


Lámina V.

Divisiones celulares en los centros meristemáticos *Begonia x tuberhybrida*,

Voss:

A. y B. Agregados de células meristemáticas dividiéndose anticlinicamente.(1600x c/u)

C. Agregado de células meristemáticas rodeado de células parenquimáticas las cuales acumulan abundantes cantidades de carbohidratos en forma de almidón (440x).

D. Callo parenquimatoso donde se encuentran embebidas agrupaciones de células pequeñas (centros meristemáticos) cuyo citoplasma muestra tinción positiva a PAS. (460x).

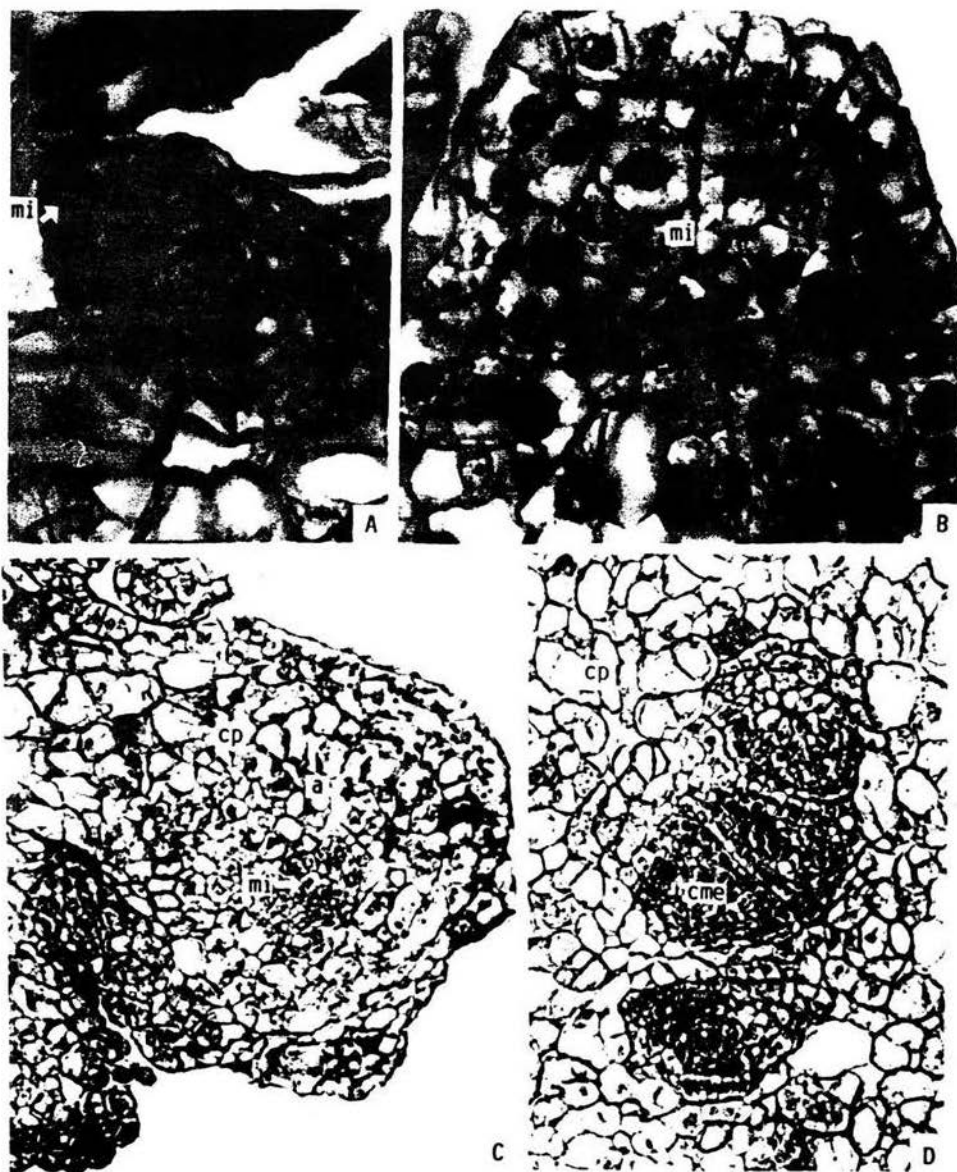
mi = mitosis.

cp = célula parenquimática.

cme = centro meristemático.

a = almidón.

LAMINA V



En algunas zonas se observaron células parenquimatosas con abundantes gránulos de almidón. Lámina V C.

Hernández, (1989), observó este mismo tipo de células en callos de Medicago sativa L. Var. A-70-34, clasificándolas en base a su morfología como:

Tipo 1. Células grandes ocupadas por una gran vacuola, núcleo excéntrico y citoplasma poco denso con pared celular engrosada (células parenquimatosas); localizándose generalmente en las zonas internas de los cortes de callo, pero ocasionalmente pueden ser observadas rodeando al siguiente tipo de células.

Tipo 2. Células pequeñas con citoplasma denso y poco vacuoladas, con núcleo central grande y difuso con un nucleolo o dos intensamente teñidos, presentando pared celular delgada (células meristemáticas). Células generalmente en la periferia del callo, aunque también pueden encontrarse formando agregados inmersos en las células del tipo 1.

Thorpe y Meir, (1972), describen en callos de tabaco a las células meristemáticas producidas por células de parénquima altamente vacuoladas, como células de tamaño pequeño, isodiamétricas de pared delgada con el núcleo y el citoplasma densamente teñidos y al microscopio de luz no están vacuoladas.

Con la técnica de PAS, se manifestó la presencia de gránulos de almidón (carbohidratos) dentro de las células del tipo parenquimático.

Thorpe, (1982), observó que la formación de agregados de células meristemáticas embebidas en un callo parenquimatoso sugiere una intervención de las células parenquimatosas en el origen de las primeras; ocupándose con ello el almidón presente en las células de parénquima, como la fuente de energía.

Hernández et al, (1995), en un estudio de la anatomía del desarrollo de brotes en hojas de Saintpaulia ionantha utilizando la técnica de PAS encontraron que en las células que forman parte de los centros meristemáticos se lleva a cabo una elevada actividad metabólica pues el citoplasma de éstas contiene carbohidratos en abundancia los cuales son continuamente utilizados como fuente de energía para la realización de todos los procesos metabólicos relativos a la división y diferenciación celular.

Thorpe, (1978), con estudios de la oxidación de la glucosa encontró que el tejido que forma brotes metaboliza niveles de glucosa a una velocidad mayor que el tejido de callos proliferado durante la formación de meristemoides. Estos estudios revelan la importancia del metabolismo de los carbohidratos durante la formación de brotes in vitro.

Redway, (1991), informó que, de igual manera que en tabaco el almidón sirve como una fuente de energía para la iniciación y subsecuente desarrollo de órganos en Saintpaulia ionantha, puede suceder lo mismo, pues los eventos histológicos observados en ésta fueron asociados con un decremento progresivo en el contenido de almidón de los cultivos durante el período de crecimiento.

Ross et al., (1973) en un estudio ultraestructural de la iniciación de brotes en tabaco Nicotiana tabacum L. Var. W-38, observó que durante la formación de meristemoides, los depósitos de almidón y el contenido vacuolar disminuyeron progresivamente hasta que al final el almidón y las inclusiones paracrystalinas desaparecían completamente de las células.

Thorpe y Meier, (1972), observaron que en los tejidos con formación de brotes el pico de acumulación de almidón se presenta justamente antes de la formación de meristemoides.

En este caso, las células meristemáticas originaron la formación de centros meristemáticos o meristemoides, localizados en la superficie o embebidos en el tejido. La división continua de la superficie de los meristemoides frecuentemente encabezó pequeñas protuberancias dando al tejido una apariencia nodular.

Las células meristemáticas generalmente forman agregados que en este caso se observaron con frecuencia, así como la aparición de figuras mitóticas.

CONCLUSIONES

1. Con la técnica de cultivo de tejidos vegetales, *Begonia x tuberhybrida*, responde satisfactoriamente para el método de propagación masiva.
2. Por la revisión bibliográfica realizada se recomienda trabajar con plantas madre que hayan crecido bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad.
3. Es recomendable la aplicación de sustancias antioxidantes o remover los compuestos fenólicos con el fin de disminuir la oxidación o necrosis del tejido utilizado como explante.
4. Al separarse los brotes que alcanzan un tamaño apropiado para su trasplante a suelo, es recomendable sembrar el tejido calloso sobrante con los brotes pequeños con el fin de que éstos alcancen un tamaño apropiado para su manipulación.
5. Debe tenerse especial cuidado en la transferencia de las plántulas del medio de cultivo a suelo pues en esta etapa éstas se deshidratan rápidamente. Una investigación exclusiva sobre este aspecto proporcionaría gran ayuda al proceso global de micropropagación.
6. En ocasiones las plantas que están adaptándose están expuestas a contaminarse con hongos los cuales terminan matando a la planta completa. Es recomendable por lo tanto, realizar algunas pulverizaciones (rociados) de algún fungicida sobre el follaje de la misma.

7. Es recomendable proporcionar una intensidad de luz adecuada pues de lo contrario, los tallos crecen alargados; al florecer, es importante ayudar a los tallos con estacas pues el peso de las grandes flores que producen provoca que éstos se doblen.
8. La respuesta morfogénica favorable obtenida en este caso puede utilizarse en trabajos futuros relacionados con *B. x tuberhybrida*
9. La técnica de cultivo de tejidos vegetales nos permite obtener un gran número de plantas a partir de fracciones de hoja de esta especie, comparada con la técnica tradicional; sin embargo, aún hace falta trabajar más al respecto, con la finalidad de lograr que todos los brotes que se producen lleguen a la madurez, en otras palabras, optimizar la producción.
10. En cuanto al análisis anatómico puede concluirse lo siguiente:
 - a) Las células cercanas al xilema (probablemente células acompañantes o parénquima del xilema) son las que más se relacionan con la proliferación celular y el origen del callo.
 - b) El callo que a simple vista parece una masa desorganizada de células, presenta en realidad una estructura anatómica muy particular y con características celulares bien definidas.
 - c) La formación de centros meristemáticos es uno de los primeros eventos (observables al microscopio óptico) que conducen a la diferenciación de brotes a partir del callo de *B. x tuberhybrida*.
 - d) A este respecto hace falta investigar más sobre la morfogénesis de los centros meristemáticos hasta convertirse en un meristemo apical de brote, propiamente dicho.

BIBLIOGRAFIA

- ALTMAN, A. y R. GOREN. 1977. Horticultural and Physiological Aspects of Citrus bud Culture. Acta Horticulturae. 78:51-60.
- BAILEY, L. H. 1974. Manual of cultivated plants. MacMillan Publishing Co., Inc. New York.
- BINES, J. y KEY. 1983. El ABC de las plantas de interior. Ediciones Herman Blume. Madrid España.
- BAJAJ, S. P. y M. BOPP. 1971. Growth and organ formation in Sinapis alba Tissue Cultures. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 66. S. 378-381.
- BALDERAS, A. L. 1989. Propaguemos una semilla. Medicina y cultura. 3(9):32.
- BARKLEY, F. A. s.f. Begoniaceae to 1763. Hopkins Press, Providence.
- BARKLEY, F. A. 1972. Begoniaceae: The Genera, Sections and Known Species of Each. The Buxtonian. Vol. 1, Supplement 4. Boston, U.S.A.
- BONNETT, H.T. Jr. y TORREY, J.G. 1965. Chemical Control of Organ Formation in Koot Segments of Convolvulus Cultured in Vitro. Plant Physiol. 40:1228-36
- CHLYAH, H. 1974. Inter-Tissue Correlations in Organ Fragments. Plant Physiol. 54:34-348.

- CHLYAH A. y TRAN THANH VAN M. 1984. Histological changes in epidermal and subepidermal cell layers of Begonia rex induced to form de novo unicellular hairs, buds and roots. Bot Gaz. 145(1):55-59
- CHRISTIANSON, L. M. y D.A. WARNICK. 1988. Organogenesis in vitro as a Developmental Process. HortScience. 23(3):515-519.
- COOKE, C.R. 1977. Tissue culture propagation of African Violets. HortScience. 12(6):549.
- CORBERTT, W. 1964. Cultivo de plantas ornamentales en maceta. Ed. ACRIBIA, Zaragoza, España.
- CRONQUIST, A. 1977. Introducción a la Botánica. 2da. ed. Ed. Continental, México.
- DEBERGH, C.P. y J.L. MAENE. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae. 14. 335-345.
- DEL CAÑIZO, J.A. 1977. Plantas en el hogar. 2da. ed. Madrid, España.
- GRAF. B.A. 1978 Exotic Plant Manual. 5th ed. Roehrs Company. New Jersey, U.S.A.
- GOMEZ, V.H.C. y FLORES, V.J.A. 1990. La Biotecnología en Floricultura Mexicana su Comercialización. Hortalizas, Frutas y Flores. No. 7:72-78.
- HARTMANN, H.T. y D.E. KESTER, 1984. Propagación de Plantas. C.E.C.S.A. Méx.

- HERNANDEZ, P.M.V. 1989. Morfología y citoquímica de la ontogenia de los embriones somáticos de *Medicago sativa* L. Var.A-70-34. ENEP-Z UNAM. Tesis de Licenciatura.
- HERNANDEZ, P.M.V., FRANCO, R.J. y GARCIA C. M.T. 1995. Anatomía del desarrollo de brotes en hojas de *Saintpaulia ionantha* Wendl. cultivadas in vitro. An. Esc. Nac. México; 40: 95-105.
- HOWARD, T. JR. y G.J. TORREY, 1965. Chemical Control of Organ Formation in Root Segemnts of *Convolvulus* Cultured in vitro. Plant Physiol. 40:1228-1236.
- HUTCHINSON, 1963. The Families of flowering Plants in: Radford, E. A. 1974. Vascular Plants Systematics. Harper & Row, Publishers, N.Y.
- IIDA, et al. 1986. Mass programation of *Begonia x tuberhybrida*, Voss. plantlets using tissue culture. Research - Bulletin of - the Aichi Ken Agricultural Research Center. Noil 8: 186-190.
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical Histochemistry, principles and practice. W. H. Freeman and Co. Sn. Fco. and London.
- JENSEN, W.A. y F.B. SALISBURY, 1984. Botany. 2da. ed. Wads-Worth Publishing Co. U.S.A.
- JIMENEZ, A.R. 1986. Las Begonias silvestres del Jardín Botánico Francisco J. Clavijero de Xalapa, Veracruz. Cuadernos de divulgación INIREB. No. 23 INIREB, Jalapa, Ver.
- LARSON, A.R. 1988. Introducción a la floricultura. AGT editor, S.A. Méx. D.F.

- MARQUEZ, B.J.L. 1987. Producción de flores. CESUES. Esc. Sup. Hort. Son., Mex.
- MARTINEZ-VAZQUEZ, O. y RUBLUO, A. 1989. In vitro mass propagation of the near-extinct Mammillaria san-angelensis, Sánchez Mejorada. Journal of Horticultural Science. 64(1).
- MEHRA, A. y N.P. MEHRA, 1974. Organogenesis and Plantlet Formation in vitro in Almond. Botanical Gazette. 135(1):61-73.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through Tissue Culture. Annual Review of Plant Physiology.25:135-166.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- PECK, E.D. y G.B. CUMMING, 1984. In vitro propagation of Begonia x tuberhybrida from leaf sections. HortScience. 19(3).
- PORTER, C. L. 1967. Taxonomy of Flowering Plants. W.H. Freeman and Company San Francisco.
- RAGHAVAN, V. 1978. Experimental embryogenesis in vascular plants. New York Academic Press.
- REDWAY, A.F. 1991. Histology and stereological analysis of shoot formation in leaf callus of Saintpaulia ionantha, Wendl. (African Violet). Plant Science. 73:243-251.
- ROBERT, L.M. y LOYOLA, V.M. 1990. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT, Méx.

- ROSS, et al. 1973. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. Amer. J. Bot. 60(8): 788-795.
- SAMERON, D.J. 1981. Las Flores y su Cultivo. 2da, ed. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- SANCHEZ, S.O. 1979. La Flora del Valle de México. 5ta. ed. Ed. Herrero, Méx., D.F.
- SHEEHAN, D.C. y B.B. HRAPCHAK, 1980. Theory and Practice of Histotechnology. 2da. ed. Ed. Mosby Co. U.S.A. St. Louis Missouri.
- SIMMONDS, J. 1984. Induction, growth and direct rooting of adventitious shoots of Begonia x hiemalis. Plant cell Tissue Organ culture. 3:283-289.
- SKOOG. F. 1944. Growth and Organ Formation in Tobacco Tissue Cultures. Am. J. Bot. Vol. 31:19-24
- START, D.N. y G.B. CUMMING, 1976. In vitro propagation of Saintpaulia ionantha, Wendl. HortScience. 11(3).
- SUTTER E. y R.W. LANGHANS. 1978, Epicutular wax and cuticle formation in meristem. regenerated plantlets of carnation. HortScience. 13(3): 348.
- THOMPSON, L.M. y J.E. THOMPSON, 1981. Begonias. TIME-BOOKS, New York.
- THORPE, A.T. 1978. Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In Frontiers of Plant Tissue Culture. 1978. (T.A. Thorpe, Ed.). University of Calgary Press, Calgary, Canada.

- THORPE, A.T. 1982. Aspectos básicos y aplicados de la organogénesis de las plantas in vitro. En V.M. Villalobos, A. (Ed.). Contribuciones del Cultivo de Tejidos al Mejoramiento y conservación de las Plantas. C.P. Chapingo.
- THORPE, A.T. y S. BIONDI, 1981. Regulation of Plant Organogenesis. Advances of Culture. Vol. 1:213-239.
- THORPE, A. T. y D.D. MEIER, D.D. 1972. Starch Metabolism, Respiration and Shoot Formation in Tobacco Callus Cultures. Physiol. Plant. 27:365-369.
- TORRES, K.C. 1989 Stages of micropropagation. In Tissue culture techniques for horticultural crops. An Avi Book published by Van Nostrand Reinhol. New York. pp 52 - 65.
- TRAN THANH VAN, K.M. 1981. Control of morphogenesis in vitro cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32:291-311.
- VARGAS, H.J.J. 1982. Morfogénesis in vitro de Pinus patula. Tesis de Lic. Chapingo, Mex.
- VIDALIE, H. 1983. Producción de Flores y Plantas Ornamentales. Ed. Mundi/Prensa. Madrid.
- WISEUR, J. y LIEVENS, C. 1987. In vitro propagation and regeneration of plants from calluses of Begonia x tuberhybrida, Acta Horticulturae. No:212, Vol. II. 705-709.
- WARDLE, K.V.; DASOU, I. SIMPKINS y K.C. SHORT. 1983. Redistribución of rubidium in plants of Chrysanthemum morifolium. Ram. cv. Snowdown derived from tissue cultures and transferred to soil. Ann Bot. 51, 261.264.

WELANDER, T. 1977. In Vitro organogenesis in Explants from Different Cultivars of **Begonia x hiemalis**. Physiol Plant. Plant. 41: 142-145.

WINTON L.L. 1978. Morphogenesis in woody plants. In Frontiers of plant Tissue Culture. 1978. (A.T. Thorpe, Ed.). University of Calgary, Canada.

NOMBRE _____

FECHA _____

LUGAR _____

MODO DE PROPAGACION :

C.T.V.

Estaca
(Tallo s/hojas)

Estacas
de
hoja

Tubérculo
(camote)

TIEMPO DE CULTIVO EN CADA CASO :

C.T.V.

Estaca
(Tallo c/hojas)

Estacas
de
hoja

Tubérculo
(camote)

LUGAR DONDE SE PROPAGA :

Laboratorio

Invernadero

casa

otro

FORMA DE RIEGO : _____

PRECIO SEGÚN LA EDAD DE LA PLANTA :

Edo. Vegetativo

Tamaño aprox. : _____

Floración

Tamaño aprox. : _____

Tubérculo

MODO DE CULTIVO :

E F M A M J J A S O N D

DURACION DE FLORACION : _____

MESES DE VENTA :

E F M A M J J A S O N D

APENDICE 2

NH_4NO_3	1,650.00 mg/lt
KNO_3	1,900.00 mg/lt
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00 mg/lt
KH_2PO_4	170.00 mg/lt
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00 mg/lt
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80 mg/lt
$\text{N}_3\text{-EDTA}$	37.30 mg/lt
H_3BO_3	6.20 mg/lt
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30 mg/lt
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.60 mg/lt
K	0.83 mg/lt
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/lt
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/lt
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/lt

Sales para preparar medio inductor de yemas. Murashige y Skoog, 1962.

APENDICE 3

Sacarosa	30.00 g
Ac. nicotínico	1.00 mg
HCL tiamina	1.00 mg
Myoinositol	200.00 mg
HCL piridoxina	2.00 mg
Adenina	125.00 mg
L-tirosina	100.00 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	85.00 mg
NAA	1.00 mg
BAP	5.00 mg
Agar	6.50 g

Suplemento para preparar medio inductor de yemas, Peck y Cumming, 1984.