



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Proliferación in vitro de Gladiolus sp

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE INGENIERO AGRICOLA PRESENTA, ALFREDO GUIDO MARTINEZ

ASESOR DE TESIS: M.C. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



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

MINISTERIO NACIONAL
 DE EDUCACION
 AV. PARRAL 140
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO D.
 EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

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

"Proliferación in vitro de Gladiolus sp".

que presenta el pasante: Alfredo Guido Martínez
 con número de cuenta: 8757803-0 para obtener el título de :
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Abril de 2002.

PRESIDENTE Ing. Gustavo Ramírez Ballesteros

VOCAL Ing. Hilda Carina Gómez Villar

SECRETARIO M.C. Francisco Cruz Pizarro

PRIMER SUPLENTE Ing. Edgar Ornelas Díaz

SEGUNDO SUPLENTE M.C. Juan Roberto Guerrero Agama

A mis padres:

*Gracias por su apoyo y comprensión
para la elaboración de esta tesis*

A mis hermanos

Bertha, Roberto y Angel

Gracias por su apoyo

A mis sobrinos

*Mariana, Ivan y Roberto
para que vean en mí una prueba
de superación.*

INDICE

Lista de cuadros.....	i
Lista de figuras.....	ii
	Pág.
I.- Introducción.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.2 Hipótesis.....	3
II.- Revisión de la literatura.....	4
2.- Hormonas del desarrollo vegetal.....	4
2.1 Citocininas.....	8
2.2 Giberelinas.....	12
2.3 Auxinas.....	15
2.4 Etileno.....	17
2.5 Acido abscísico.....	19
2.6 Poliaminas.....	21
2.7 Brasinoesteroides.....	22
2.8 Turgorinas.....	23
III.- Fases del cultivo de geofitas.....	25
3.1 Fases.....	25
3.2 Inducción y proliferación de geofitas.....	30
3.3 Clasificación taxonómica de <i>Gladiolus</i>	32
3.4 Algunos aspectos en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gladiolus</i>	34

	Pág.
IV.- Materiales y Métodos.....	45
4.1 Metodología.....	45
4.1.1 Ubicación del experimento.....	45
4.1.2 Medio de cultivo.....	45
4.1.3 Diseño experimental.....	46
4.2 Variables de estudio.....	48
4.2.1 Días a formación de brotes.....	48
4.2.2 Número de brotes.....	48
4.2.3 Longitud de brotes.....	48
4.2.4 Diámetro de cornillos.....	48
4.2.5 Días a formación de raíces.....	48
V.- Resultados y discusión.....	49
5.1 Días a formación de brotes.....	49
5.2 Número de brotes.....	52
5.3 Longitud de brotes.....	54
5.4 Diámetro de cornillos (brotes).....	57
5.5 Días a formación de raíces.....	59
VI.- Conclusiones.....	60
VI.- Bibliografía.....	62

Resumen

El desarrollo vegetal, tanto en el aspecto de crecimiento como en la diferenciación de órganos se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas que activan o desactivan procesos fisiológicos, interactuando entre sí, el desarrollo incluye, reacciones químicas y fisiológicas en la cual participan diversas hormonas como son: las Citocininas, Giberelinas, Auxinas, Ácido abscisico, Etileno, Poliamidas, Brasinoesteroides y Turginas.

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta esta determinado por una serie de factores complejos como, constitución genética de la planta, nutrimentos, factores físicos y por reguladores de crecimiento.

La totipotencia vegetal es considerada la base de la multiplicación *in vitro* y la organogenesis se encuentra fuertemente influenciada por las hormonas , la interacción que se establece entre ellas permite la formación de brotes (proliferación) a partir de explantes establecidos.

La aplicación de reguladores de crecimiento como las Citocininas (BA y TDZ) influyen en el desarrollo y formación de órganos dependiendo de la cantidad en concentración aplicados en el medio de cultivo en donde se ha encontrado una variación en la respuesta de los cultivos y de sus explantes utilizados, empleando un intervalo de concentración de las citocininas. Las altas concentraciones de Citocininas provocan un fenómeno denominado

vitrificación en brotes y plántulas desarrolladas *in vitro*, siendo posible eliminar este fenómeno utilizando bajas concentraciones de estos reguladores de crecimiento. Otro aspecto importante es la utilización de sacarosa y la aplicación de intervalos de calor para la proliferación de brotes y desarrollo de los mismos.

Por lo cual en este estudio se utilizó concentraciones de 0 hasta $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y TDZ para la proliferación de brotes de *Gladiolus* sp teniendo los siguientes resultados:

Los días a formación de brotes se inició en 8 días después de la siembra presentando pequeños brotes en la base del explante, con concentraciones de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ.

Para el número de brotes se encontró que a concentraciones de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA tiene un promedio de 4.2 brotes por explante y para el TDZ con una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tiene un promedio de brotes de 3.7 brotes por explante.

En la longitud de brotes se determinó que a la concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA presentó un promedio de 3.9 cm siendo el óptimo. En cuanto para el TDZ con una concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se obtuvo un promedio de longitud de brotes de 3.3 cm siendo esta la mejor concentración.

Para el diámetro de los brotes el BA con las concentraciones de 1.0 y 1.5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ fueron los mejores tratamientos teniendo un promedio de 5 mm de diámetro, el TDZ con concentraciones de 0.1 y 0.5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ resultaron ser las mejores concentraciones en el medio de cultivo presentando un promedio de 6 mm de diámetro.

Para los días a formación de raíces este se dio a partir del sexto día después del cultivo de los explantes viéndose reflejado en los testigos ya que estos están libres de las Citocininas (BA y TDZ). Para los tratamientos con los reguladores de crecimiento presentaron raíz en algunos casos, siendo estas gruesas y cortas inhibiendo su crecimiento favorablemente.

1.- INTRODUCCIÓN

El desarrollo vegetal, tanto en el aspecto de crecimiento como en la diferenciación de órganos, se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas que activan o desactivan procesos fisiológicos, interactuando entre sí; el desarrollo incluye, reacciones químicas y fisiológicas en la cual participan diversas hormonas.

Estas hormonas se clasifican en Citocininas, Giberelinas, Auxinas, Acido abscisico, Etileno, Poliamidas, Brasinoesteroides y Turginas; además de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros, al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores de crecimiento, los cuales son responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta.

Las Citocininas son derivados de la adenina con el N⁶ sustituido, caracterizado por la capacidad de estimular la división celular en el cultivo de tejidos, en concentraciones elevadas pueden inducir la formación de brotes por lo cual tienen un efecto principal en la proliferación de los brotes *in vitro*, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Las Citocininas promueven la formación de vástagos axilares, por que disminuyen la dominancia apical,

retardando el envejecimiento, siendo las más comunes: El TDZ (Thidiazuron), el BA (Benciladenina) y la Kinetina.

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos, como son: constitución genética de la planta, nutrimentos, factores físicos y por los reguladores de crecimiento.

Un explante, aislado *in vitro* que crece y se desarrolla, necesita de un medio nutritivo, el cual contiene sustancias como agua, macro y micronutrientes, azúcares como fuente de carbono y reguladores de crecimiento. Existen diversos medios de cultivo siendo los más importantes: Murashige y Skoog (MS), Schenk y Hildebrandt (SH).

La totipotencia vegetal es considerada la base de la multiplicación *in vitro* y la organogénesis se encuentra fuertemente influenciada por las hormonas, la interacción que se establece entre ellas permite la formación de brotes (número de brotes) a partir de explantes establecidos.

Por lo anteriormente expuesto se generan los siguientes objetivos e hipótesis:

1.1 Objetivos

- 1.- Evaluación de dos tipos de Citocininas en la proliferación de brotes de *Gladiolus sp*, obtenidos *in vitro*.
- 2.- Determinar el tipo y la dosis óptima para obtener la mayor tasa de proliferación.
- 3.- Evaluar el comportamiento morfológico de los explantes mediante la aplicación de reguladores de crecimiento.

1.2 Hipótesis

Las Citocininas son compuestos que permiten la proliferación de brotes a partir de explantes formados *in vitro*, por lo tanto, al aplicar Thidiazuron (TDZ) y Benciladenina (BA) al medio de cultivo, se manifestara al máximo el potencial organogénico de los explantes de gladiolo obtenidos *in vitro*.

Deberá existir una concentración óptima para la mayor tasa de proliferación debido a que concentraciones elevadas pueden conducir a la vitrificación.

II.- REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.- Hormonas del desarrollo vegetal

Existen numerosas sustancias naturales y sintéticas de gran influencia en el crecimiento y diferenciación de las células y órganos de la planta.

Una hormona vegetal es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna parte de la planta y que se moviliza a otra parte en donde a concentraciones bajas causa una respuesta fisiológica (Davies, 1970).

Un regulador de crecimiento es un compuesto sintético capaz de intervenir en el metabolismo, que actúa en muy pequeñas concentraciones para activar o desactivar algún proceso de desarrollo (Jacobs, 1977).

A principios de la década de los 80's, Anthony J. Trewas insistió mucho en el concepto de que la sensibilidad diferencial es mucho más importante para determinar los efectos de una hormona en el interior de las células vegetales.

Sabemos que para las hormonas vegetales presentes en concentraciones micromolares o submicromolares son activas y específicas, deben estar también presentes tres grandes partes de un sistema de respuesta. En primer lugar, la hormona debe encontrarse en cantidad suficiente en las células adecuadas. En segundo lugar, la hormona debe ser reconocida y capturada con fuerza por cada uno de los grupos de células que responden a ellas (*las células blanco*). Las

moléculas de proteína poseen las estructuras complejas necesarias para reconocer y seleccionar entre moléculas mucho más pequeñas y, con base en lo que se sabe acerca de la acción hormonal en animales, se están identificando las proteínas de la hormona. Tales proteínas se conocen como proteínas receptoras. En tercer lugar, la proteína receptora (cuya configuración es de suponerse que cambia durante la captura de la hormona) debe causar algún otro cambio metabólico que conduzca a la amplificación de la señal o el mensajero hormonal. De hecho, pueden presentarse varios procesos de amplificación en secuencia, antes de que finalmente se dé la respuesta a la hormona.

El proceso comienza con la unión de la hormona primaria a una proteína receptora en la membrana plasmática (superficie externa) de una célula blanco. Enseguida, el complejo hormona-receptor activa una enzima de la membrana cercana denominada Fosfolipasa C (PLC). Esta fosfolipasa hidroliza entonces uno de un grupo de fosfolípidos. Los Fosfoinosítidos son fosfolípidos que contienen inositol (por ejemplo, fosfatil inositol PI), o lípidos similares en los que grupos hidroxilo del inositol se encuentran esterificados a uno o dos grupos fosfato (en el carbono 4 o en los carbonos 4 y 5). La Fosfolipasa C hidroliza al último, 4,5-Bifosfato de fosfatilinositol (PIP_2), entre el glicerol y el fosfato unido al carbono 1 de la porción fosfatada del inositol, de tal forma que se libera 1,4,5-Trisfosfato de inositol (IP_3) y Diacilglicerol (DAG); el DAG presenta el glicerol, ahora esterificado sólo a dos ácidos grasos.

Tanto el IP_3 como el DAG son activos y pueden provocar una serie de respuestas. El IP_3 es muy soluble en agua y en células animales se desplaza

hacia el retículo endoplásmico, donde causa la liberación en el citosol de Ca^{2+} almacenado. En células vegetales de parénquima que poseen vacuolas centrales grandes, la mayor parte del calcio celular se almacena no en el retículo endoplásmico, sino en la vacuola, donde la concentración muchas veces es del orden de μM (al menos 1000 veces la del citosol). Existe evidencia de que el IP_3 estimula la liberación de Ca^{2+} vacuolar al citosol (Memon *et al*, 1989); así el sitio donde se libera el Ca^{2+} puede diferir entre células animales y vegetales, debido a sus estructuras y funciones diferentes.

El DAG no es soluble en agua (por los dos ácidos grasos que aún contiene), por lo que realiza su función dentro de la membrana plasmática, donde probablemente tiene gran movilidad. El DAG activa una enzima situada en la membrana que se conoce como proteína Cinasas C (PKC). Esta enzima utiliza ATP para fosforilar ciertas enzimas que regulan diversas fases del metabolismo; la fosforilación causa desactivación en algunas enzimas y activación en otras (Edwads *et al*, 1985).

El incremento en el nivel de Ca^{2+} en el citosol provocado por el IP_3 también activa ciertas enzimas, incluyendo varias proteínas cinasas (Budde y Randall, 1990).

Algunas de estas cinasas requieren Ca^{2+} libre para su activación; otras son activadas por Ca-calmodulina (Marmé, 1989). Cuando la concentración de Ca^{2+} empieza a aumentar en el citosol, cuando el Ca^{2+} se combinan para formar un quelato o complejo con calmodulina inactiva, generando un complejo activo Ca-

calmodulina. Este complejo en sí después activa ciertas enzimas, cinasas, NAD^+ cinasa (una enzima que utiliza ATP para fosforilar NAD^+ a NADP^+) y una ATPasa de las membranas plasmáticas que transfiere el exceso de Ca^+ hacia fuera de la célula. Por lo tanto, un estímulo hormonal primario finalmente da por resultado modificación de la actividad enzimática, cambios en los procesos metabólicos, y con el tiempo una clase de célula con metabolismo y morfología diferentes. Muchos de estos cambios mediados por hormonas y estímulos ambientales interactúan para ayudar a conformar un tejido, órgano o vegetal distintos.

El control sobre la actividad de ciertas enzimas después de la recepción inicial de la hormona parece ser una clave importante, y con frecuencia participan mensajeros secundarios como IP_3 , DAG y Ca^+ .

2.1 Citocininas

Las citocininas, son derivados de la adenina con el N⁶ sustituido. Es sintetizado por la condensación de un grupo isopentil con el grupo amino del monofosfato adenosina (AMP).

El sitio de mayor biosíntesis de las citocininas en las plantas, es en la raíz. Los niveles altos de citocininas en las raíces se presenta en la actividad mitótica de la región sub-apical de la raíz.

Las citocininas juegan un papel importante en la regulación de síntesis de proteínas. En el cultivo de células de semillas, por ejemplo, las citocininas causan un incremento general en la síntesis de proteínas y cambios en la estructura de las proteínas incorporando ³⁵S-metionina, esta actividad se refleja en un incremento en el contenido de poliribosoma (Tepfer y Fosket, 1978). Un incremento en los poliribosomas podría resultar, un incremento en la velocidad de la transcripción de mRNA o en un incremento en su estabilidad. En otros reportes inducen mRNAs, pero no es evidente un incremento en los niveles generales de la transcripción. Se reportan la evidencia de una estabilización post-transcripción del mRNA en la planta acuática del género *Lemna* (Flores y Tobin, 1987).

La mayoría de las diferentes formas químicas de las citocininas son rápidamente transformada por tejidos de la planta (Letham y Palni, 1983). Cuando se fijan las

citocininas en los tejidos de las plantas son convertidos en nucleotidos; Zeatina por Zeatina-Ribonucleotida, i⁶Ade por i⁶Ade ribonucleotida.

En general, los niveles de citocininas son máximos en órganos jóvenes (semillas, frutos y hojas) y en las puntas de las raíces, parece lógico que se sinteticen en esos órganos, pero en la mayoría de los casos no podemos desechar la posibilidad de su transporte desde otro lugar. Para las puntas de las raíces, casi con seguridad interviene la síntesis, porque si las raíces se cortan en forma horizontal, exudan citocininas (debido a la presión de la raíz) desde el xilema de las partes inferiores restantes por periodos hasta de cuatro días (Torrey, 1976).

El transporte de varios tipos de citocininas ciertamente se realiza en el xilema (Jameson *et al.*, 1987), pero los tubos cribosos también tienen citocininas, como la demuestra la presencia de éstas en la mielecilla de áfidos. Los experimentos con hojas desprendidas de dicotiledóneas dan más evidencia del transporte en el floema. Cuando se corta una hoja madura de plantas de determinada especie y se mantiene húmeda, las citocininas se mueven a la base del peciolo y se acumulan ahí.

Cuando se corta una hoja madura pero activa todavía, comienza a perder Clorofila, DNA, Proteínas y Lípidos de las membranas de cloroplastos con más rapidez que si estuviera unida todavía a la planta, aun cuando se le suministren sales minerales y agua por el extremo cortado. Este envejecimiento prematuro o senescencia, evidente por el amarillamiento de la hoja, ocurre con especial rapidez si las hojas se mantienen en la oscuridad. En las hojas de dicotiledóneas,

a menudo se forman raíces adventicias en la base del pecíolo y a consecuencia de esto se demora la senescencia de la hoja. Al parecer las raíces dan algo a las hojas que las mantienen fisiológicamente jóvenes. Ese algo con seguridad son citocininas transportadas a través del xilema.

Hay dos evidencias principales que sugieren que está implicada una citocinina. Las citocininas reemplazan parcialmente la necesidad de las raíces para demorar la senescencia, y el contenido de citocinina de la lámina foliar aumenta sustancialmente cuando se forman las raíces adventicias (Van Staden y Nooden, 1988).

La capacidad de las citocininas de retardar la senescencia, se aplica también a ciertas flores y hortalizas verdes cortadas. La concentración de citocininas en los pétalos de rosa y clavel disminuye con el envejecimiento, y si se le aplican citocininas se desaparece este proceso. Los claveles son los que más se han estudiado y para esa especie son más eficaces las soluciones que contienen citocininas (Van Staden *et al*, 1990).

Existen otros mecanismos de acción de las citocininas como por ejemplo, la promoción del crecimiento, implican efectos sobre el transporte, lo cual se evidencia por mayores niveles de polisomas, incorporación más rápida de aminoácidos en las proteínas e inhibición de la respuesta fisiológica por inhibidores de la síntesis de proteínas.

Murthy *et al*, (1995) demostraron que el Thidiazuron induce a la embriogénesis somática por nódulos de cotiledones de *Arachis hypogaea* L; en el cultivo *in vitro*.

Chen, (1987) comprobó que la Benciladenina cambia los tipos de RNAm formados por cotiledones de calabaza cortados, en los que las citocininas promueven la expansión celular y la síntesis de clorofila.

2.2 Giberelinas

Las giberelinas constituyen una familia larga de ácidos diterpenos y sintetizados por la derivación de terpenoides.

Los terpenoides pueden normalmente reorganizarse básicamente en su estructura química, que puede estar detenidamente en un apropiado número de cinco carbonos isopreno unidos.

Se consideran tres fases en las síntesis de giberelinas. es el mismo camino que presenta el ácido mevalónico, que conduce a otros terpenoides. En este camino, el 5-Carbono (C_5) de unidades isopentilpírofosfato (IPP) es sintetizada por Acetil coenzima A (Acetil- C_0A) y aumentando el C_{20} geranylgeranyl-pírofosfato (GGPP).

La segunda fase en la síntesis de giberelinas es la biosíntesis de ent-Kaurene por GGPP y su conversión a GA_{12-7} -Aldehído; siendo el primer componente en el camino en la formación de giberelina y se cree que es el precursor de las giberelinas.

La tercer fase es la biosíntesis de todas las giberelinas de GA_{12-7} -Aldehído. La oxidación del grupo aldehído en Carbono-7 a un grupo carboxilo da GA_{12} . Este grupo carboxilo representa todas las giberelinas y es requerido por su actividad biológica.

Los muchos efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de acción primario.

La división celular es estimulada en el ápice del tallo, en especial en las células, meristemáticas basales a partir de las cuales se desarrollan las largas filas de células corticales y de la médula (Sachs, 1965). Liu y Log (1976) observaron que las giberelinas promueven la división celular porque estimulan células que se encuentran en la fase G₁ a entrar en la fase S, y debido a que también acortan la fase S. El incremento en el número de células da lugar a un incremento más rápido del tallo, debido a que cada una de las células puede crecer.

En ocasiones las giberelinas promueven el crecimiento celular debido a que incrementan la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa, con lo que se originan moléculas de fructosa y glucosa. Estas hexosas proporcionan energía vía respiración, contribuyen a la formación de pared celular y también hacen momentáneamente más negativo el potencial hídrico de la célula. Como resultado de la disminución del potencial hídrico, el agua penetra entonces con mayor rapidez, provocando expansión celular y diluyendo los azúcares. En el tallo de la caña de azúcar, el crecimiento promovido por las giberelinas resulta en parte del incremento en la síntesis de invertasas que hidrolizan la sacarosa que llega y forman glucosa y fructosa (Glasziou, 1969). En chícharos enanos, la actividad tanto de invertasas aumenta con el incremento en el crecimiento (Broughton y McComb, 1971). Los resultados obtenidos con tallos de trigo de invierno indican que las giberelinas promueven la hidrólisis de fructanos por fructanos hidrolasas (Zhang, 1989), lo que indica que estas enzimas representan otro tipo de hidrolasas inducidas por giberelinas.

Con frecuencia las giberelinas incrementan la plasticidad de la pared celular. Un ejemplo de esto ocurre en los internodos de la avena, en los que la promoción de crecimiento de células jóvenes derivadas del meristemo intercalar es muy notable. Hay un incremento significativo en la plasticidad de la pared y un fenómeno similar explica la promoción de crecimiento por giberelinas en secciones de hipocótilo de la lechuga y en hipocótilos de plántula de pepino (Taylor y Cosgrove, 1989).

Tanto para plántulas de maíz enano (sistemas péreos completos), como para tallos de plántula de chícharo, se demostró que la giberelina induce cambios específicos en los tipos de proteínas que se sintetizan (Chory *et al*, 1987).

Estos y otros efectos potenciales de las giberelinas han sido revisados por Martín (1983) y por Carlson y Cronetti (1990).

2.3 Auxinas

La biosíntesis de auxinas (IAA) ocurre en tres fases; por el principio es la conversión del triptofano a indol-3-ácido piruvico (IPA), esta reacción es catalizada por la distribución de triptofanamino, una enzima multiespecifica seguida por una eliminación de grupos aminos por una estructura análogo de triptifanos tal como fenilalanina y tirosina. La segunda fase, es la descarboxilación de IPA a Indol-3-Acetaldehído (IAAld). La enzima que se cataliza en esta fase, es indol-3-piruvato descarboxilasa, como se describe en varios tejidos de plantas y extractos de células libres. Finalmente, el IAAld es oxidado para dar IAA por NAD dependiendo del indol-3-acetaldehído dehidrogenasa. La presencia de esta enzima es demostrada en un aumento en un número de tejidos incluyendo coleóptilos. El IAAld puede también ser reducido a indol-3-etanol. Este indol-3-etanol activa las auxinas en bioensayos usando secciones de tallos, brotes, esto es probablemente en donde existe la conversión a IAA en el tejido.

El IAA no suele translocarse a través de los tubos cribosos del floema o por el xilema, sino principalmente a través de celular parenquimatosas que se encuentran en contacto con haces vasculares (Alón, 1987).

Como se demostró en la década de los 30's, la aplicación de auxinas promueve el alargamiento de secciones escindidas de raíces o aún de raíces intactas de muchas especies, pero a solo a concentraciones extremadamente bajas (1 a 10

M, dependiendo de la especie y edad de las raíces). A concentraciones mayores (pero de aún de apenas de 1 a 10 μM), casi siempre se inhiben el alargamiento.

Sin embargo en resultados informados indican fuertemente que el IAA puede inhibir el alargamiento de raíces de plántulas de chicharo pero que no afectan la producción de etileno por las mismas raíces poco después de que se cortan. Estos y otros resultados indican que las auxias inhiben el crecimiento de cuando menos las raíces de chicharos, por medio de un mecanismo que se desconoce y que es independiente del etileno (Eliasson *et al*, 1989).

Las auxinas generalmente producen, elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callos), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión.

En ocasiones la adición de auxinas estimula el crecimiento de plántulas. Se demostró que el IAA promueve la formación de raíces en plántulas de algunas Bromeliáceas, lo que se traduce en estimulación del crecimiento de las plantas recién germinadas (Pierik, 1984).

La regulación del crecimiento en las plantas depende en parte por la cantidad de auxina presente en las células, tejidos y órganos.

El IAA es principalmente sintetizado en los brotes apicales y es transportado polarmente por la raíz. El transporte polar ocurre directamente en células parenquimatosas asociadas con los tejidos vasculares (Morris y Johnson, 1985).

2.4 Etileno

El etileno es derivado de los carbonos 3 y 4 del aminoácido metionina. Un segundo avance importante ocurrió cuando se encontró que interviene un compuesto raro semejante a un aminoácido, el ácido 1-amino-cíclopropano-1 carboxilo (ACC) como precursor del etileno.

Se puede detectar la producción de etileno por diversos organismos mediante la cromatografía de gases, debido a que la molécula puede extraerse de los tejidos por vacío.

Hay referencias según las cuales el etileno no ejerce ninguna influencia en la organogénesis, y otras en las que se indica un efecto positivo. Se ha demostrado, cultivando callo de tabaco a la luz (Huxtier, 1981), que la producción de etileno es mayor cuando se forman vástagos adventicios. Estos autores han demostrado que la formación de etileno depende del tiempo transcurrido después del repicado (se produce más etileno en los primeros 5 días, que en el período subsiguiente de 6-10 días), también depende del régimen día/noche (se produce más etileno en la oscuridad que en la luz.

Van Aartrijk *et al*, (1986) demostraron con explantos de bráctea de azucena, que la producción de etileno y etano depende tanto de la fase en la que se lleva a cabo la regeneración, como de las condiciones de crecimiento. El número de bulbos adventicios que se forman es mayor para las producciones de etileno más altas, durante las dos primeras semanas de cultivo.

La biosíntesis de etileno, por consiguiente, parece jugar un importante papel en la formación de bulbos adventicios. Si se bloquea la síntesis de etileno en la azucena por AVG (amino-etoxivinil-glicina), la formación de bulbos adventicios se para también; la condición de etileno (1-10 ppm) durante los días 3-7 del periodo de crecimiento, promueve la formación adventicia de bulbos, como también lo hace el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carbónico).

El etileno también influye en la embriogénesis y formación de órganos de las gimnospermas. Se indicó que el callo no-embriogénico de *Picea abies* producía 10 veces más etileno que un callo formado a partir de un embrión (Verhagen *et al*, 1986). El incremento en la concentración de etileno y CO₂, durante la primera semana de cultivo, en matraz Erlenmeyer, de cotiledones excisos de *Pinus radiata*, induce la formación de vástagos adventicios. Si el etileno y el CO₂ son retirados de los matraces, la regeneración de vástagos y el crecimiento quedan inhibidos (Kumar *et al*, 1986).

En suma instancia. Las auxinas y el etileno causan similares respuestas en la planta, tal como la inducción en la floración de la piña y en la inhibición de elongación del tallo (Abeles *et al*, 1992). Estas respuestas indican la habilidad de las auxinas de promover la síntesis de etileno por el aumento en el cambio de S-Adenosilmetionina (AdoMet) a 1-aminociclopropano-1-carbónico.

2.5 Acido Abscisico

El ácido abscisico es un sesquiterpeno de 15-carbono, este número y la colocación de los átomos de carbono sugiere que el ácido abscisico (ABA) es derivado por el ácido mevalonico. Sin embargo, además de esa demostración, el ^{14}C de ácido mevalonico es incorporado en el ABA.

Existen dos caminos para la biosíntesis del ABA: El primero es la síntesis directa del precursor 15-carbono y el segundo, es la división del 40-carbono xantofila (un carotenoide oxigenado). Probablemente la mayoría de intermediarios por la síntesis directa de ABA es el 15-carbono-farnesilpifosfato, siendo la principal evidencia en la síntesis de ABA.

El contenido de ABA en hojas de mono y dicotiledóneas aumenta en grado sustancial cuando dichas hojas son sometidas a estrés hídrico, cuando se desprenden de las raíces y también se dejan intactas. Incluso ha sido posiblemente medir las concentraciones de ABA, en células oclusivas aisladas empleando células separadas y procedimientos de inmunoensayo ligado a enzimas (Harris y Outlaw, 1990).

Hoy existe evidencia de que este ABA suministrado por las raíces proviene principalmente de las puntas de las raíces someras sometidas a estrés hídrico, y que actúa como señal a las hojas de que se esta agotando el agua del suelo (Davies y Mansfield, 1988). Los estomas se cierran como respuesta al ABA que proviene ya sea de las raíces o de las hojas, y con ello queda protegido contra la sequía.

Se ha investigado como el estrés causa realmente la producción de ABA en las hojas. Parece que la señal primaria es la pérdida de turgencia, y no un potencial osmótico más negativo (Zeevaat y Creetman, 1988). Esta pérdida de turgencia probablemente produce una señal desconocida de la membrana plasmática que activa determinados genes nucleares que conducen a un aumento en la síntesis de ABA. Algunos resultados sugieren que es la membrana plasmática la que responde a la menor turgencia y que lo hace transportando iones hacia dentro de la célula a mayor velocidad (Lynch, 1989).

Las revisiones de (Owen y Mundy, 1990) sugieren que los iones de calcio y los fosfoinositoles actúan luego en la cadena de transducción de la señal para activar los genes en la síntesis de ABA.

En muchos casos el ABA aplicado puede reducir en parte la reacción de la planta al factor de estrés. Por ejemplo, el ABA, "endurece" a las plantas contra el daño de las heladas (Guy, 1990) y contra el exceso de sal (Mundy, 1984).

El ABA se reduce por división de un carotenoide 40-carbono precursor que es sintetizado por vía pirofosfato isopentil, el cual es sintetizado en las células y transportado vía xilema y floema.

2.6 Poliaminas

Las poliaminas generalmente se refiere a un grupo de componentes polivalentes que contienen dos grupos aminos. Las poliaminas son derivados biosintéticamente por ácidos aminos argenina y lisina, en adición en la biosíntesis de espermidina y espermina involucrando S-adenosilmetionina, un intermediario en la biosíntesis de etileno.

En las células de las plantas, las poliaminas ocurren frecuentemente conjugadas por componentes fenolicos como el ácido hidroxicinamico, ácido coumarico o ácido aferco. Estas son algunas formas en que se encuentran las poliaminas libres.

Las poliaminas son reguladores de crecimiento en las plantas (Galston y Kaur-Sawhney, 1987) con un pH intercelular normal, las poliaminas son policationicas esto es, que presentan cargas positivas múltiples, así de esta manera se unen con ácidos nucleicos y fosfolipidos de la membrana plasmática.

La bacteria termofílica aparentemente produce poliaminas como un agente protector térmico inactivando las enzimas y esperminas, estabilizando el DNA, es un agente térmico que se origina en el cultivo *in vitro*. Las poliaminas presentan factores de crecimiento en microorganismos procariontes y eucariontes y en cultivo de células en mamíferos, esta también estabiliza los protoplastos, influyen en la división celular y en la embriogénesis en el cultivo de tejidos de zanahoria y retrasa la senescencia en algunos tejidos.

2.7 **Brasinoesteroides**

La reacción catalizadora por las enzimas DET2 y CPD marcan el camino para la biosíntesis de brasinoesteroides.

Cuando el locus de DET2 esta clonado presenta una secuencia de ácido amino el cual es similar, al esteroide de mamíferos (5 α reductasa) (Li *et al*, 1996). Los esteroides de los mamíferos 5 α reductasa cataliza un NADPH dependiendo de la conversión de la testosterona a dihidritesterona a una etapa en el metabolismo del esteroide esto es esencial en el desarrollo embrionario normal de machos.

La clonación de CPD también sugiere que tiene un papel importante en la síntesis de esteroides.

El DET2 y CPD involucran la síntesis de un esteroide considerado hormona en las plantas.

Muchos esteroides se han identificado en plantas y brotes, los brasinoesteroides tienen efectos fisiológicos en el crecimiento de las plantas en diferentes concentraciones y pueden estar distribuidas en todo el reino vegetal. La primer brasinoesteroide fue aislada del polen de la colza (*Brassica napus*) en 1979. Estudios fisiológicos han establecido que la aplicación de brasinoesteroides exógenos causa elongación celular y división celular en exceso en secciones de tallo. Los brasinoesteroides también inhiben el crecimiento de la raíz, incrementa el gravitropismo, promueve la diferenciación del xilema y retrasa la abscisión de la hoja.

2.8 Turgorinas

Schildknecht (1983 y 1984) químico orgánico de la Universidad de Heidelberg, en Alemania, y su grupo han realizado un trabajo amplio aislando e identificando compuestos (como el factor de Rica) que activan pulvinulos en las hojas de las plantas como *Mimosa* y *Acacia karoo*, la cual no es sensible al contacto pero muestra nictinastia. Para un bioensayo, se usa una hoja de *Mimosa* en una solución con la sustancia activa supuesta, la cual es transportada entonces por la corriente de transpiración a los pulvinos, donde responden sus membranas, pues hace que los foliolulos de las hojas se plieguen hacia arriba si el sustrato es activo. Dos de los denominados factores de movimiento periódico foliar (PLMFs) de *Acacia* resultaron ser β -glucósidos ácido gálico, con el glucósido uniéndose a su grupo para-hidroxilo. También fueron identificados otros compuestos con estructuras estrechamente relacionadas a partir de extractos de otras plantas, y los más activos fueron el 6-sulfato de β -D-glucósido y el 3,6-disulfato de β -D-glucósido o ácido gálico; se les denominó PLMF 1 y PLMF 2. Extractos provenientes de *Mimosa* contenían PLMF 1 más otro compuesto, PLMF 7. Los extractos de *Robina* contuvieron PLMF 1.

Algunas especies de *Oxalis* reaccionan al contacto o agitación de manera muy parecida a como lo hace mimosa púdica. Schidknecht y colaboradores aislaron del *Oxalis* PLMF 1 y otro compuesto, PLMF 3, el cual es un derivado del ácido protocatechuico en vez del ácido gálico. El 6-fosfato de glucosa una vez más resultó ser parte de la molécula.

Schildknecht (1983 y 1984) sugirió que estos compuestos forman una nueva clase de hormonas vegetales, a las cuales denominó turgorinas debido a que actúan sobre las células de turgencia o pulvinulos. Al igual que con otras hormonas, las turgorinas son activas a bajas concentraciones (10^{-5} a 10^{-7} M) y, por lo menos en algunos casos cumplen con el criterio de translocación. En fecha reciente, Peter Kallas, Wolfram Meier-Augenstein y Schildknecht (1990) demostraron la presencia de un receptor específico a PLMF 1 (presumiblemente una proteína) en la cara externa de la membrana plasmática de *Mimosa*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III.- FASES DEL CULTIVO *IN VITRO* DE GEOFITAS.

Muchas geofitas ornamentales presentan un periodo inactivo. Su micropropagación es de esta manera complicada y generalmente requiere una fase más que con las técnicas de cultivo de tejidos convencional.

3.1 Fases

Fase 0: Selección y preparación de las plantas madre.

El primer objetivo de la "fase 0" es la de selección y cultivo de las plantas madre que sean sanas y que sean los tipos verdaderos. La mayoría de geofitas que crecen en el suelo deben de ser cuidadosamente escogidas las cuales deben de tener un mínimo de bacterias , hongos y virus, para tener una importante respuesta de los explantes de dicha planta madre (Niimi y Watanabe, 1982).

La contaminación se reduce usando baja humedad (75%), no utilizar riego aéreos y tener brotes previamente formados (Debergh y Read, 1991). Al exponer a una temperatura específica (Lilium, Stimart y Ascher, 1981); (Tulipan, Backer *et al*, 1990), o tratamientos de luz (Dalia, Gavinlerlvatana *et al*, 1979) reducen las infecciones. La aplicación de citocininas durante la fase uno puede producir una importante respuesta de los explantes (Debergh, 1987). Amaki *et al*.(1984) señalaron que a largo plazo de esta fase y la desecación en gel silico de bulbos de Jacinto *in vivo* incrementa efectivamente el número de bulbillos por parte de los explantes.

Fase 1: Establecimiento aséptico del cultivo.

Muchos órganos de plantas de geofitas ornamentales pueden ser usados como explantes, solo brotes juveniles usualmente la mayoría responden. Como se indico previamente, la contaminación es un problema mayor en la "fase 1" y puede significar en una perdida del cultivo (Leifert y Waites, 1992). Al eliminar los contaminantes de los explantes de órganos de las geofitas, se requiere de una esterilización (Niimi y Watanabe, 1982), algunos fenoles pueden causar oxidación lo cual se puede prevenir con el empleo de un antioxidante como el ácido ascórbico (Debergh y Read, 1991). Las condiciones ambientales que pueden incrementar el éxito en los niveles de composición nutrimental, los reguladores de crecimiento en la planta, la luz, temperatura, composición de la atmósfera y métodos de cultivo.

Fase 2: Multiplicación de propágulos.

La multiplicación de los brotes (bulbos y bulbillos) obtenidos por explantes pueden obtenerse por (1) aumento en el crecimiento de los brotes axilares, (2) la proliferación de brotes adventicios, (3) inducción de brotes adventicios por callos y (4) regeneración de plantas por embriogenesis somática. La estabilidad genética y la velocidad de la multiplicación, la mayoría es considerada cuando se selecciona el sistema de multiplicación. Generalmente la suplementación en el medio de cultivo con citocininas (Hussey 1976; Kremer, 1985) o retardo en el crecimiento de la planta (Ziv, 1990) y el uso de cultivos líquidos agitados (Ziv, 1989) y bioreactores maximizan la proliferación de brotes. Las Citocininas pueden producir efectos negativos en la micropropagación (Maesato *et al*, 1991),

algunos ejemplos como son: (1) decrecimiento de raíces en la fase tres, (2) hay desordenes fisiológicos y malformaciones como la vitrificación (Debergh *et al*, 1992) y (3) decrece la supervivencia de las plantas obtenidas *in vitro* en condiciones ambientales.

Generalmente, un ciclo de subcultivo requiere de 4 a 18 semanas. En la "fase 2" se pueden mantener algunas especies por periodos de uno a tres años dependiendo de la especie y su habilidad de producir brotes, la cual generalmente decrece por el periodo de cultivo largo (Jehan *et al*, 1994).

Fase 3: Obtención, endurecimiento y bulbos de plantas.

El objetivo de esta fase es la obtención de plantas y bulbillos por brotes transferidos del suelo, esto reduce bulbillos pequeños y previene la dormancia, esto se obtiene de plantas transplantadas (Ziv, 1979; Lilien-Klpris y Kochba, 1987). Las raíces pueden aumentar con el siguiente procedimiento: (1) adicionando auxinas y/o carbon activado en el medio de cultivo (Cumming y Peck, 1984), (2) una creciente relación de auxinas y citocininas y (3) usando sacarosa y niveles nutrimentales (Cumming y Peck, 1984). El endurecimiento incrementa la tolerancia al estrés por humedad y previene la vitrificación, es requerida por la aclimatación por el estado heterotrófico a autotrófico. También, la concentración de agar y la intensidad de la luz incrementa (Ziv, 1979), para algunos genotipos, es deseable ya que induce a la formación de bulbillos (Kim y Han, 1993). Los beneficios que producen son: (1) la eliminación *in vitro* de raíces, (2) la prevención de vitrificación, (3) la eliminación de endurecimiento, (4)

incremento en la velocidad de supervivencia y (5) cortos periodos de producción de bulbos. Las condiciones seguidas pueden poder aumentar la formación de bulbos: (1) una alta concentración de sacarosa (Kim y Han, 1993), (2) el uso de retardantes en el crecimiento (Steinitz *et al*, 1991), (3) la aplicación de temperaturas bajas (Backer *et al*, 1990) y (4) el uso de viejos bulbos. La dormancia *in vitro* forma bulbillos, puede ocurrir espontáneamente (Kim, 1991).

Fase 4: Rompimiento de la latencia en bulbos.

La mayoría de los bulbos obtenidos en la fase tres presentan latencia y sus niveles son afectados por la concentración de sacarosa, la edad de los bulbos y las temperaturas en el cultivo (Stimart y Ascher, 1981).

Altas concentraciones de giberelinas, bajas concentraciones de sacarosa y bajas temperaturas reducen los niveles de dormancia de bulbos de *Lilium* (Djilianov *et al*, 1994).

La adición de floruro al medio de cultivo también previene la dormancia en *Lilium* (Kim *et al*, 1994). En la fase dos en 5°C por 30 a 100 días rompe la dormancia, los bulbos de *Iris* acuática (Anderson *et al*, 1990), bulbos de *Lilium* (De Klerk *et al*, 1992), cormos de *Ixia* y *Gladiolus* (Sutter, 1986) y bulbos de *Narciso* (Hussey, 1982).

El uso de giberelinas en combinación con bajas temperaturas rompe la latencia en *Lilium rubellum* (Niimi *et al*, 1988).

Fase 5: Transferencia o trasplante al suelo.

Dependiendo de la especie, cada brote de raíz (Lilien-Kipnis y Kochba, 1987) desarrollan brotes (Read y Fellman, 1985) o bulbillos (Kim y Han, 1993), la transferencia es susceptible de las raíces en un medio estéril específicamente, por la transferencia de plantas *in vitro* a un invernadero, con las condiciones del medio ambiente (Lilien-Kipnis y Kochba, 1987).

En el invernadero, la humedad relativa también puede ser importante y la baja intensidad de la luz por días puede ser severo utilizando plantas autotróficas (Debergh y Read, 1991). Subsecuentemente las plantas pueden estar creciendo con humedad baja y una intensidad superior lumínica. Algunos bulbos, como el *Lilium* no requiere de esos tratamientos ya que contienen hojas y tallos (Novak y Petru, 1981).

3.2 Inducción y proliferación de geofitas

Algunas geofitas producen pocos o ningún brote axilares (Hussey, 1980) y la proliferación de brotes adventicios es inducida directamente por los explantes sin brotes por ejemplo; hojas, pecíolo, escapo floral, sépalos, pétalos, pedúnculos, ovarios, anteras, cormos, rizomas y secciones de tubérculo, siendo posible cuando se seleccionan tejidos y órganos jóvenes y en pequeños tamaños porque ellos tienen una alta habilidad morfogénica. Con más especies los brotes adventicios son inducidos fácilmente por una alta relación de citocininas y auxinas en el medio de cultivo (Seabrook *et al*, 1976; Hussey 1982; Maesato *et al*, 1994). Los brotes adventicios estos pueden multiplicarse por tres métodos: (1) los brotes agrupados pueden ser disociados en varios segmentos; (2) los meristemos apicales pueden ser seccionados de la dominancia apical; y (3) los brotes agrupados pueden seccionarse de 3 a 5 mm. Después de haber usado una de esas técnicas, los brotes pueden estar enraizados o pueden estar induciendo a la formación de bulbos *in vitro*. La mayor desventaja de este sistema, es la alta probabilidad de variación epigénica y génica (Broertjes *et al*, 1968). Esto ocurre porque la regeneración original puede ser en una célula o en un grupo de células (Van Aartrijk y Van der Line, 1986) o por los altos niveles de reguladores de crecimiento usados. El nivel de variación genética obtenida es usualmente en el sistema de la rama axilar y el sistema de callos (Hussey, 1978).

Los callos son una masa de células no organizada la cual es inducida por explantes de varios tejidos u órganos en la mayoría de las geofitas. La efectiva

concentración de reguladores de crecimiento exógenos en las especies y brotes, típicamente forman callos siendo favorable la aplicación de reguladores de crecimiento en concentraciones adecuadas.

La organogénesis ocurre cuando el callo es transferido a un medio que contiene bajas concentraciones de reguladores de crecimiento (Kim *et al*, 1991). En algunos casos, el cultivo de callos usados por la micropropagación pueden tener algunas desventajas, como puede ser la tendencia de células aberrantes y la pérdida de la habilidad de regenerarse en un cierto tiempo (Hussey, 1975; Chakravarty y Sen, 1987; Jha y Sen, 1987), también en los brotes no se realiza la totipotencia de los callos y minimiza la variación génica.

La embriogénesis somática es el proceso de regeneración en que los embriones surgen de células somáticas, ellos pueden formarse directamente por los explantes o indirectamente. La embriogénesis somática tiene un efectivo potencial en la mayoría y es de un avance rápido en la micropropagación. Prácticamente, millones de plantas se producen con un volumen pequeño de células. El origen de los embriones pueden estar en una célula o puede ser multicelular (Konar *et al*, 1972).

3.3 Clasificación taxonómica del *Gladiolus*

El género *Gladiolus* pertenece a la familia *iridaceae*, es una planta herbácea considerada como geophyta (Ziv y Lilien-Kipnis, 1990). Lewis *et al*, (1972) menciona que este genero esta representado por 180 especies. Existen más de 10000 cultivares de los cuales 20 son comerciales para producción de flor (Ziv y Lilien-Kipnis, 1990). Dos especies son endémicas de Madagascar y 15 se encuentran en países alrededor del Mediterráneo. Uno de los híbridos más modernos es *G. grandiflorus*, con cuando menos 11 especies, representados por diferentes colores o variedades botánicas (Wifret, 1980).

El gladiolo es una planta que se desarrolla de botones axilares en un cormo con un tallo suculento que actúa como soporte (Wifret, 1980; Ziv y Lilien-Kipnis, 1990). Sus hojas se sobreponen en la base pudiendo ser de 1 a 12, su inflorescencia es una espiga originada como eje terminal, llegando a formar hasta 30 florecillas o más, con partes florales de tres en tres. Cada florecilla esta encerrada en dos valvas verdes con espatas y su pistilo consiste en un estigma de tres lóbulos, con un estilo simple no ramificado con ovario ífero. En la cápsula se albergan de 50 a 100 óvulos, los cuales maduran 30 días después de la fertilización. Florecillas bilaterales o radiales (Wifret, 1980)

Las flores pueden ser de cualquier color, exceptuando el azul, sin embargo, algunos tonos violetas se asemejan casi azules. Las florecillas pueden ser redondas, triangulares, aplanadas, con capuchón o como orquídeas, con pétalos

sencillos, rizados, filamentosos, recurvados, puntiagudos o profundamente arrugados, florecillas que varían de 2 cm. De ancho y muy espaciadas, en tallos delgados, sencillos o con muchas ramas, hasta gigantes de 2 metros con florecillas de 18 cm de diámetro (Wilfret, 1980).

Los cormillos nuevos se forman anualmente por la protuberancia de la base de los internudos de la inflorescencia, antes o durante la floración, esto es encerrado por las hojas, que en la maduración comienzan a secarse en forma de escamas de papel, convirtiéndose a su vez en corno. Se desarrollan dos tipos de hoja de los brotes activos localizados en los nudos superiores del corno: hojas encapsuladas y hojas verdaderas, frecuentemente amontonadas de 10 a 12 hojas, respectivamente. La raíz primaria localizada en la base del corno forma el primer sistema de raíces adventicias. Las raíces secundarias se desarrollan durante la floración, en el corno que se esta desarrollando nuevamente (Ziv y Lilien-Kipnis, 1990)

Numerosos estolones son ramificados, orientando los cormillos hacia las puntas, desarrollados del nódulo basal del corno hija durante la floración. Un solo corno es capaz de producir de 50-200 cormillos dependiendo del cultivar y condiciones del cultivo (Griesbach, 1972).

3.4 Algunos aspectos en el cultivo *in vitro* de *Gladiolus* sp.

En el cultivo *in vitro* de *Gladiolus* sp se han desarrollado diversos aspectos entre los que sobresalen:

- Medios de cultivo.
- Tipos de explante.
- Establecimiento y método aséptico del explante.
- Reguladores de crecimiento en la proliferación.
- Condiciones de incubación.
- Enraizamiento y aclimatación.

- Medios de cultivo.

Para el establecimiento y proliferación de brotes *in vitro* se utilizan diferentes medios de cultivo ya sea en forma líquida o sólida. Estos medios de cultivo están conformados de agua, macro y micro-nutrientes, sacarosa, reguladores de crecimiento, con o sin agar y con un pH óptimo, a una cierta concentración dependiendo del tipo de desarrollo al que se quiere llegar, por ejemplo, como es la proliferación de brotes, formación de callos, enraizamiento, formación de plántulas, cormos, cornillos, etc.

Existen varios tipos de medios de cultivo de los que sobresalen Murashige y Skoog (MS), Scheky y Hildebrent (SH), Gamborg *et al* (B5), Nitsch, Séller, Knudson (C) y Knop, esto es dependiendo mucho del explante que se va a utilizar (Ziv *et al*, 1970).

Hussey (1977), empleo el medio de cultivo MS con una concentración normal y suplementado con sulfato ferroso de etilendiamina a 25 mg/l, 50 mg/l de myo-inositol, 0.5 mg/l de tiamina-HCl y 2% de sacarosa (P/v) solidificado con 0.7% de agar y un pH de 5.6, para la formación de brotes axilares de *Gladiolus*. Sin embargo Ziv (1979) utilizó el medio de cultivo MS suplementado con 100 mg.l⁻¹ de myo-inositol, 0.4 mg.l⁻¹ de tiamina, 1.0 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 1.0 mg.l⁻¹ de piridoxina, 0.1 mg.l⁻¹ de NAA, 30 g/l de sacarosa y solidificado con 0.8% de agar y un pH de 5.8, para determinar los factores que afectan la propagación *in vitro* del *Gladiolus*. Por otro lado, Ziv (1990) empleo el medio de cultivo MS suplementado con minerales, vitaminas y aditivos orgánicos con 0.25 μM de NAA, 3% de sacarosa para la morfogénesis de brotes de *Gladiolus*.

Remotti (1995) emplea el medio de cultivo MS el cual contiene 60 g.l⁻¹ de sacarosa, 10 mg.l⁻¹ de paclobutrazol (bonzi) al 4% y solidificado con 0.25% de Gilrite y un pH de 5.8, para la inducción de callos y regeneración de plantas de *Gladiolus*.

Para la propagación *in vitro* de 3 orquídeas induciendo una alta frecuencia en la proliferación de brotes Nihar (1997) emplea el medio de cultivo MS el cual contiene 100 mg.l⁻¹ de myo-inositol y 3% (P/v) de sacarosa suplementado con BA y TDZ individualmente y combinado, con 5.4-27.0 μM de NAA y con 0.8% de agar bacteriológico y con un pH ajustado en 5.8.

Karam (2000) el utiliza el medio de cultivo MS solidificado con 0.8% de agar, con un pH de 5.8 y con 20 g/l¹ de sacarosa, para la regeneración directa de brotes en *Cyclamen persicum* Mill. Tonon (2001) utiliza el medio de cultivo MS el cual contiene sacarosa a 20 g/l¹ y un pH ajustado a 5.8 con KOH o HCl y con un agente gelificante para la inducción e iniciación de brotes de *Fraxinus angustifolia*.

En investigaciones realizadas con otras plantas ornamentales, también ha sido posible inducir raíces usando diferentes concentraciones de sacarosa. Así, Roest y Bokelmann (1975) trabajando con *Chrysanthemum monifolium* lograron un buen medio de inducción a formación de raíces agregando 20 mg.l⁻¹ de sacarosa. En Begonia (Pierik y Teteroo, 1987), tuvieron un medio óptimo de enraizamiento sin sustancias de crecimiento y con una concentración mínima de sacarosa de 5 mg.l⁻¹.

Otro punto importante en la utilización de los medios de cultivo es la de realizar primero la formación de callos en un medio de cultivo sólido siendo separados estos callos y cultivados en otro medio de cultivo siendo este líquido para la proliferación de brotes. Sen y Sen (1995) aplicaron la técnica de *doble fase* para una alta frecuencia en la regeneración de cormos en *Gladiolus* aplicando formación de brotes en un medio de cultivo sólido suplementado con reguladores de crecimiento seguido de un subcultivo de brotes y cormelos en un medio de cultivo líquido suplementado con reguladores de crecimiento presentando una alta frecuencia de regeneración de brotes.

- Tipos de explante.

Los explantes utilizados para la proliferación *in vitro* son obtenidos de diversas partes de la planta siendo estos: inflorescencia de tallo, brotes, yemas, estolones, flores, bases de hoja, embriones meristematicos, meristemos, callos, subcultivo de callos, cormos, brotes de corno, secciones de corno, células en suspensión, ápices de cormillos, entre otros (Ziv, 1970).

Las plantas sucesivamente se regeneran por medio de organogenesis directa o indirecta de callos por meristemos, brotes o inflorescencia de tallo. En la formación de callos de diferentes variedades de *Gladiolus cvs.* Son capaces de realizar rizogenesis con relación a la proliferación de callos (Bajaj *et al*, 1983).

La velocidad de regeneración depende de la combinación de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. El uso de brotes para su desarrollo se basa en la proliferación de brotes axilares en presencia de BA o TDZ.

Se han utilizado diversos tipos de explante en diferentes trabajos para su proliferación; Hussey (1977) utilizo brotes axilares para la formación de cormos en tres diferentes cultivos híbridos de *Gladiolus*. La utilización de brotes axilares para la proliferación se utilizaron tejidos de callo previamente obtenidos para la producción de plantas y formación de raíces (Ziv, 1979). Por otro lado Bajaj *et al*, (1983) utilizaron tejidos de callos obtenidos de segmentos de iflorescencia, pecíolos, flores desnudas, bracteas y segmentos de hoja, para determinar los factores que afectan la propagación *in vitro*, determinando diferenciación y rizogenesis.

Ziv (1990) utilizó brotes apicales y cormos teniendo una proliferación de 4-5 brotes por explante. Sin embargo la utilización de brotes laterales y de cormos de varios cultivos de *Gladiolus* para su regeneración *in vitro* presentan de 10-15 brotes por cada explante utilizados (Sen y Sen , 1995).

En 1999 Kumar *et al* emplearon cormelos completos, segmentos de cormo y ejes de inflorescencia, presentando una formación vigorosa de callos siendo posteriormente transferidos presentando diferenciación de brotes a los 15 días y con un crecimiento y proliferación de brotes. La utilización de explantes de tejidos de hojas son obtenidos de embriones germinados, presentando formación de brotes por parte del primordio formados por los segmentos de hojas y presentando una alta regeneración de brotes y elongación en 2 meses (Yoko *et al*, 2000).

- Establecimiento y método aséptico del explante.

Se refiere básicamente a la asepsia de la planta en cuestión teniendo como resultado la formación y desarrollo de brotes o bien la formación de callo, debiéndose encontrar el medio de cultivo y el material vegetativo libres de partículas extrañas para garantizar el establecimiento, supervivencia y desarrollo de los tejidos vegetales.

La utilización en el métodos de asepsia y establecimiento del explante varía de acuerdo a cada autor; Ziv (1979), separa brotes axilares formados de cormos de *Gladiolus* y los esteriliza en 5% de CaClO_4 por 10 min y enjuagándolos en 3 tiempos posteriormente con agua destilada esterilizada en completa asepsia. En

otro estudio se utilizan brotes laterales (0.4-0.6 cm) de *Gladiolus* rompiendo la dormancia del corno sumergiéndolo en una solución teepol en 5% por 5 min y es esterilizado con 0.1% de HgCl₂ po 7-10 min, para que posteriormente se laven con agua destilada esterilizada y sean sembrados al medio de cultivo (Sen y Sen, 1995).

Por otro lado Remotti y Löffler (1995) utilizarón para el establecimiento de cormos obtenidos de *Gladiolus* en el suelo. Estos cormos son seleccionados removiéndoles la cáscara y lavándolos con agua que contiene Tween 80, los cormos son desinfectados con etanol al 80% (v/v) por 1-2 min y lavados con agua esterilizada, posteriormente son agitados durante 20 min en la solución NaOCl al 10% (1.5 (v/v) comercial), con 4 gotas de Tween 80 en 100 ml de solución y lavados en tres tiempos en agua esterilizada. Si embargo Kumar *et al*, (1999) utilizaron cormos completos, segmentos de corno y ejes de inflorescencia de *Gladiolus hybridus* los cuales fueron tratados con Tween 80 (0.2% v/v) y lavados con agua en flujo abierto por 1 hr, seguido de esto, los explantes fueron tratados en una solución acuosa de calcio hipoclorito (1%, p/v, por 15 min), los cormos completos son tratados por un largo periodo (14 hr) en un agitador, estos explantes son desinfectados en una solución acuosa de cloruro de mercurio (0.04% p/v) el cual contiene 0.2% (v/v) Tween 80 por 6 min y son lavados con agua destilada esterilizada.

En otro estudio se utilizaron segmentos de hoja de embriones germinados, estos segmentos son esterilizados por 10 min en una solución de sodio hipoclorito (1%)

conteniendo una gota de Tween 20 y son enjuagados tres veces con agua esterilizada deionizada (Yoko *et al*, 2000)

- Reguladores de crecimiento en la proliferación.

Otro aspecto a considerar en la proliferación de explantes es a lo relativo a la utilización de reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo, en donde se han encontrado una variación en la respuesta de los cultivos y sus explantes empleando un intervalo de concentraciones para los reguladores. Para los diferentes tipos de citocininas se utilizan rangos diferentes de concentraciones; la Kinetina (0.14-9.3 μM), el BA (0.5-0.9 μM), el TDZ (0.22-7.5 μM) y auxinas (5.7-45.7 μM) y también se ha reportado el uso de sulfato de adenina a concentraciones de 0.7 μM , siendo estos utilizados para el proceso de organogénesis (Bajaj *et al*, 1983).

La influencia de los reguladores de crecimiento a sido a lo largo demostrado su papel en diferentes procesos, sin embargo, cada regulador de crecimiento tiene una respuesta diferente en diferentes partes de la planta y en diferentes plantas (Wareing y Phillips, 1981).

Estas respuestas varían de acuerdo al tipo y el grado de concentración de los reguladores de crecimiento empleados en los medios de cultivo, estas respuestas son formación de brotes, obtención de plántulas, morfogénesis, regeneración de cormos, inducción de callos, diferenciación, entre otros. Ziv Meira (1990) utilizó en el medio de cultivo 0.25 μM de NAA y 10 μM de BA teniendo brotes por parte del explante de 4-5 brotes a los 28 días después del

cultivo. Sin embargo, Remotti y Löffler (1995) utilizaron concentraciones de 0.5 μM de BA y 0.25 μM de zeatina presentando formación de callo al 100%. Por otro lado Nihar *et al* (1998) aplicaron TDZ (2.2-4.5 μM) incrementando la formación de brotes y presentando elongación a los 12-15 días.

Yoko *et al* (2000) utilizaron en el medio de cultivo concentraciones de TDZ (0.1, 1.0 o 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y con 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NAA, obtuvieron una alta frecuencia de regeneración de brotes en 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ, pero al incrementar las concentraciones hasta 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ no presentaron regeneración a pesar de la alta frecuencia en la formación de brotes.

Las concentraciones altas de citocininas (10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) provocan vitrificación en los brotes establecidos en un medio de cultivo. Esto se puede eliminar manejando concentraciones bajas de citocininas (Ziv, 1991), presentando un mejor resultado en la formación de brotes.

- Condiciones de incubación.

Resulta necesario, tanto para la investigación como la aplicación práctica del cultivo *in vitro*, el disponer de una cámara de cultivo, en la que se pueda controlar, la luz y la temperatura.

La temperatura óptima para el cultivo *in vitro* en la formación de brotes tiene un rango de 20-27°C. Hughes (1981) propuso intervalos de temperaturas para varias especies. Para especies de origen tropical, presenta un intervalo de temperatura de 32-35°C en el cultivo *in vitro*, en contraste con temperaturas de

12°C para plantas ornamentales presentan preformación sin embargo la producción de brotes se mantiene por encima del intervalo de temperatura, como la temperatura se incrementa a 30°C, la producción de brotes decrece dramáticamente (Appel y Haide, 1972). Temperaturas bajas o muy bajas pueden utilizarse para detener el crecimiento de los cultivos *in vitro*.

La luz también juega un papel muy importante en el cultivo *in vitro*, generalmente se eligen días de 14-16 hr, aunque también se usa luz continua. En casos muy especiales el cultivo se realiza en completa oscuridad (por ejemplo, las semillas de orquídea que requieren oscuridad).

En general la temperatura y la luz son importantes en el cultivo *in vitro*, Hussey en 1977 utilizó una temperatura de 20°C y una luz de 8000 lx provenientes de tubos fluorescentes por 16 días para la formación de brotes, sin embargo, Sen y Sen (1995), sus cultivos los incubaron a 23-25°C y con 2000 lx de tubos fluorescentes por 16 hr de fotoperiodo para la frecuencia en la regeneración de cormos de *Gladiolus*. Por otro lado Remotti y Löffler (1995), su cultivo lo mantuvieron a 25°C a 16 hr de fotoperiodo (60 $\mu\text{mol m}^{-2}$ con luz fluorescente induciendo a la formación de callos). Soumendra *et al* (1999) su cultivo lo mantuvieron a 25 +/- 1°C, con una humedad relativa del 60% y con una densidad de 35 $\mu\text{M m}^{-1}$ proveniente de tubos fluorescentes para la proliferación de brotes axilares, Karma *et al* (2000) sus cultivos las mantiene a 15°C para la germinación y posteriormente son transferidos para su crecimiento de raíz y mantenidos a 22

+/- 1°C y 16 hr de luz (PPFD=50-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para la regeneración directa de brotes.

- Enraizamiento y aclimatación.

En esta etapa comprende el enraizamiento y su desarrollo a fin de que la planta pase de un estado heterótrofo a un estado autótrofo al desarrollar sus raíces, todo método de propagación vegetativa *in vitro* deberá mantener buenos porcentajes de brotes enraizados a fin de lograr buenos porcentajes de brotes enraizados a fin de lograr buenos resultados, implicando el desarrollo y eventualmente un cierto endurecimiento de la planta a fin de condicionarla gradualmente para la independencia de las condiciones *in vitro* (humedad, temperatura, nutrientes) teniendo especial interés el recipiente y sus características (naturaleza y propiedades del mismo), así como las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas.

Las raíces jóvenes formadas en el medio de cultivo contenido en los tubos tienen una epidermis no suberizada, las hojas no presentan una gruesa epicuticular, así como una alta densidad estómatos en la lámina foliar debiendo existir una adaptación-aclimatación, en donde deberá existir la formación de nuevas raíces para que la planta absorba nutrientes y agua normalmente, así como una estabilización de la cubierta epicuticular y la densidad estómatos debiéndose evitar el desecamiento y marchites de la planta con humedad relativa alta y el control del desarrollo de enfermedades eventuales (hongos y bacterias).

El tejido obtenido *in vitro* progresivamente alcanza tasas similares de crecimiento a las de una multiplicación tradicional.

IV.- MATERIALES Y METODOS

4.1 Metodología.

4.1.1 Ubicación del experimento

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan C-4.

4.1.2 Medio de cultivo.

Se empleó el medio de cultivo propuesto por Cruz-Pizarro (2000).

Compuesto Químico	Peso Molecular	Concentración (mM o μ M)	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ = ppm)
NH_4NO_3	80	2.5 mM	200
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236	1.25 mM	295
KH_2PO_4	136	1.25 mM	170
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246	1.50 mM	369
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278	0.09 mM	25
Na-Edta	380	0.10 mM	38
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169	5 μ M	0.84
H_3BO_4	62	100 μ M	6.1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	242	1 μ M	0.24
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287	30 μ M	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249	0.1 μ M	0.0000249
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238	0.1 μ M	0.0000238
Mio-inositol	180	0.55 mM	100
Tiamina-HCl	337	0.29 μ M	0.1
Piridoxina-HCl	205	2.44 μ M	0.5
Ac. Nicotínico	123	4.07 μ M	0.5
BA	225	-	0.1, 0.5, 1.0 y 1.5
TDZ	220	-	0.1, 0.5, 1.0 y 1.5
AIB	203	0.49 μ M	0.1
Sacarosa	342	0.0878 M	30000
Agar	-	-	6000
KNO_3	101	10 mM	1010

pH ajustado a 5.7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Después de haber realizado esto, se procedió a calcular las concentraciones de los tratamientos de Bencialadenina (BA) y del Thidiazuron (TDZ), quedando de la forma siguiente:

Tratamientos	BA/AIB	TDZ/AIB
1	0.0/0.0 mg.l ⁻¹	0.0/0.0 mg.l ⁻¹
2	0.1/0.5 mg.l ⁻¹	0.1/0.5 mg.l ⁻¹
3	0.5/0.5 mg.l ⁻¹	0.5/0.5 mg.l ⁻¹
4	1.0/0.5 mg.l ⁻¹	1.0/0.5 mg.l ⁻¹
5	1.5/0.5 mg.l ⁻¹	1.5/0.5 mg.l ⁻¹

4.1.3 Diseño experimental

Para la elaboración del experimento se utilizaron 200 cormelos como explante con un diámetro de 3-4 mm de *Gladiolus sp.*, los cuales se cultivaron *in vitro* en el laboratorio de tejidos vegetales.

El diseño experimental es completamente al azar con arreglo factorial 2 x 5 con 20 repeticiones, con un unidad experimental, 1 tubo con un explante (cormelo) y medio de cultivo solidificado los cuales son incubados en el cuarto de cultivo de tejidos vegetales, el número de tratamientos son 10, quedando de la siguiente forma:

$$2 \times 5 = 10 \times 20 = 200 \text{ unidades experimentales}$$

2 = Citocininas empleadas (BA y TDZ).

5 = Número de tratamientos.

10 = Número total de tratamientos.

20 = Total de repeticiones.

200 = Total de la unidad experimental (UE).

Factor A = Citocininas

Nivel: A₁ = BA

A₂ = TDZ

Factor B = Tratamientos

Nivel: B₁ = T₁ (TESTIGO)

B₂ = T₂ (0.1 mg/l)

B₃ = T₃ (0.5 mg/l)

B₄ = T₄ (1.0 mg/l)

B₅ = T₅ (1.5 mg/l)

N = 1 unidad experimental (UE)

T = Tratamientos

R = 20 Repeticiones

UE = Total de 200 explantes (cormos)

X_{ijk} = Número de brotes promedio en el tiempo x, con las citocininas i-ésima, con la concentración j-ésima, en la repetición k-ésima.

4.2 Variables de estudio

4.2.1 Días a formación de brotes.

Se estiman al momento en que empiece a formarse los brotes.

4.2.2 Número de brotes.

Este parámetro se toma en cuenta desde el inicio del experimento hasta la fase de terminación del mismo.

4.2.3 Longitud de brotes.

Medir en el momento en que los brotes empiezan a desarrollarse hasta su formación completa de cormillos.

4.2.4 Diámetro de brotes.

Se determinaran en la fase terminal del experimento.

4.2.5 Días a formación de raíces.

Se da a partir del establecimiento del experimento hasta la formación de raíces.

V Resultados y discusión.

5.1 Días a formación de brotes

Para este parámetro el inicio de formación de brotes fue a los 8 días después de la siembra, presentando pequeños brotes en la base del explante y teniendo su máximo desarrollo a los 45 días después de la siembra.

Se presentó una alta inducción en la formación de brotes en los tratamientos que contienen BA y TDZ en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg·l⁻¹ respectivamente, teniendo un promedio general de 3 brotes en ambos tratamientos determinando que las bajas concentraciones de BA y altas concentraciones de TDZ son las dosis óptimas para la inducción de formación de brotes.

Estas variaciones en las concentraciones puede ser atribuido a la diferente composición química de cada regulador de crecimiento por lo que la respuesta es diferente en cada tratamiento.

De acuerdo a Hussey (1977) las concentraciones menores de 0.5 mg·l⁻¹ de BA no manifiestan diferencias en la formación de brotes de *Gladiolus in vitro* a diferencia de este trabajo donde a menores concentraciones de BA se induce a la formación de brotes, asó mismo el obtuvo un máximo desarrollo en 22 días después de la siembra, lo cual manifiesta a que fue debido a la variación en la concentración de nutrimentos en el medio de cultivo y no a la concentración de citocininas en el mismo, por otra parte la luz puede ser un factor importante en el

desarrollo de formación de brotes como lo menciona Dantu y Bhojwani (1995) en el que el mayor desarrollo de inducción de formación de brotes fue obtenido al aplicar 90% de luz, Mientras que Kumar *et al* (1999) consideraron que la formación de brotes esta regulada por la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y a la temperatura de incubación.

En otras investigaciones realizadas con plantas ornamentales también a sido posible inducir a la formación de brotes usando concentraciones altas de TDZ a $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, Nihar *et al* (1997) indicaron que el porcentaje en la diferenciación y formación de brotes se incrementa al utilizar una concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ con la formación de brotes a los 12-15 días después de la siembra siendo atribuido esto al utilizar un factor diferente como explante orquídeas. Por otro lado la aplicación de sacarosa al 2%, 1N de NaOH y suplementado con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ al medio de cultivo se induce a la formación de brotes Manoharan *et al* (1998), mientras que Yoko *et al* (2000) determinaron que la formación de brotes en el explante de *Arachis hypogaea* L. al suplementar en el medio de cultivo $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ y vitaminas se obtiene una inducción de formación de brotes a los 21 días regenerándose con una alta frecuencia. Sin embargo puede corroborarse que las citocininas si influyen en la inducción y formación de brotes *in vitro* puesto que menores concentraciones de BA a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y a concentraciones altas de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ favorecen ambas a la inducción y formación de brotes, lo que nos lleva a ubicar que la importancia de factores, citocininas (BA y TDZ),

nutrimentos, temperatura y tipos de explante favorecen a la inducción y formación de brotes en los explantes.

5.2 Número de brotes

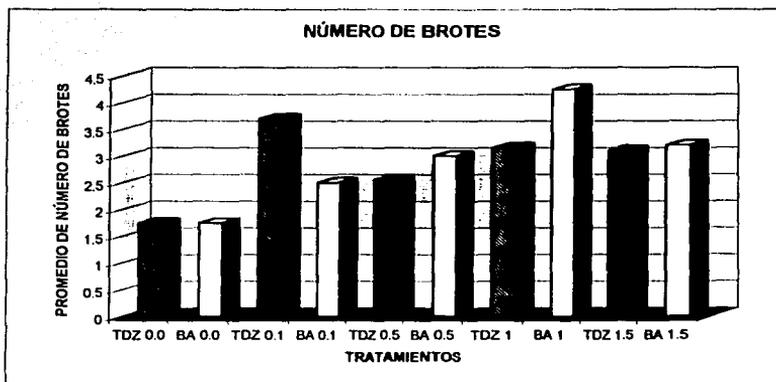
El promedio general para esta variable fue de 3 brotes por explante siendo para las concentraciones de BA y TDZ existiendo una diferencia altamente significativa entre tratamientos (Anexo 1, Tabla 1).

El valor máximo de promedio de BA fue obtenido con una concentración de 1.0 mg·l⁻¹ con 4-5 brotes por explante, es decir, el 30% mayor que el promedio general esto es a los 45 días después de la siembra, lo cual probablemente nos indica que la morfogénesis en el explante de *Gladiolus* esta regulada por esta concentración (Figura 1).

Las altas concentraciones de BA presentaron mayores resultados, por lo que en el valor mínimo de número de brotes se presentó con una concentración de 0.1 mg·l⁻¹ de BA con solo 2 brotes por explante alcanzando un mayor número al incrementar la concentración de 1.0 hasta 1.5 mg·l⁻¹, esto es similar a los trabajos realizados por Sen y Sen (1995) que al aplicar una concentración de 1.0 mg·l⁻¹ de BA al medio de cultivo mostraron la existencia de una respuesta en la proliferación de brotes con un promedio de 10-12 brotes al utilizar explantes de brotes apicales y de nódulo de cultivo. Soumendra *et al* (1999) determinaron que la concentración óptima para la multiplicación de brotes es de 1.0 mg·l⁻¹ de BA tuvieron el 93% de respuesta de los explantes en 12-15 días. Por otro lado, Ziv M (1999) obtuvo una alta proliferación de brotes de 4-5 brotes por explante a concentraciones de 0 a 2 mg·l⁻¹ de BA siendo posible esta respuesta al aplicar un

bioreactor de burbujas con un medio líquido y 6% de sacarosa. Sin embargo el mayor número de brotes por explante puede estar influenciado por otros factores como el medio de cultivo, la técnica implementada y el tipo de explante.

Figura 1. Número de brotes en el cultivo *in vitro* de *Gladiolus*.



En cuanto a los brotes obtenidos con TDZ presentaron un valor máximo al aplicar una baja concentración ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) con un promedio de 4 brotes por explante siendo este el 20% mayor que el promedio general, esto es a los 45 días después de la siembra, siendo esta la dosis óptima para la multiplicación en número de brotes (Figura 1), similar a lo encontrado por Nihar *et al* (1997) demostraron que al utilizar la concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ se obtiene un alto número de proliferación de brotes con un promedio de 12 brotes utilizando como explantes nódulo de orquídeas.

5.3 Longitud de brotes

Durante el seguimiento de la evaluación de la longitud de brotes se determinó un promedio general de 2.8 cm de cada brote por explante presentándose para las concentraciones de BA 7.5 mg·l⁻¹ y para el TDZ 2.6 mg·l⁻¹ teniendo una diferencia altamente significativa entre los tipos de reguladores empleados (Anexo 1, Tabla 2).

Contrariamente al número de brotes, la longitud fue favorecida a concentraciones mínimas de BA. El valor máximo se tuvo al aplicar la concentración de 0.1 mg·l⁻¹ de BA con 3.9 cm de longitud siendo este el 30% mayor que el promedio general (Figura 2).

A menor número de brotes hay mayor longitud de brotes, esto es atribuido a la expansión celular y a la síntesis de clorofila y debido a las diferentes formas químicas de las Citocininas que son rápidamente transformadas por los tejidos de las plantas promoviendo el crecimiento.

El valor mínimo se encuentra en concentraciones de 1.5 mg·l⁻¹ de BA con un promedio de 2.5 cm de longitud, determinando así, que a mayor número de brotes menor longitud de estos, de tal forma que existe una relación directa en la demanda de los órganos que al incrementarse disminuye su crecimiento.

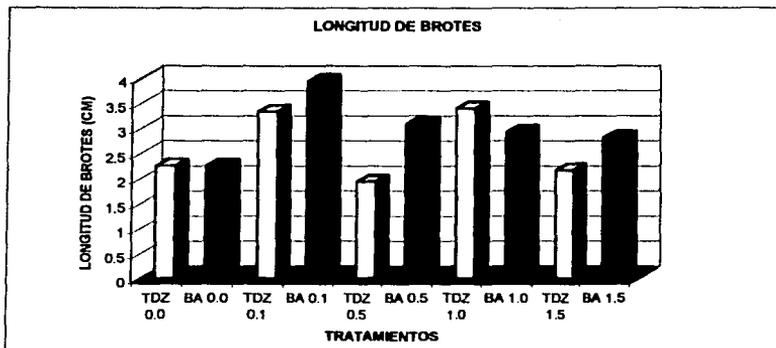
La luz puede influenciar el crecimiento de las plantas como lo manifiestan Dantu y Bhojawani (1995) donde a una concentración de 0.5 mg·l⁻¹ de BA obtuvieron un

promedio de 10.5 cm con una aplicación de luz al 90%, incrementando la fotosíntesis y con niveles altos de nutrimentos en el medio de cultivo, incrementando la longitud de los brotes.

Así mismo la concentración de nutrimentos en el medio de cultivo, también influyen en el crecimiento longitudinal de los brotes, como lo mencionan Soumendra *et al* (1999) al utilizar concentraciones menores de 1.0 mg.l⁻¹ de BA presentando una mayor longitud de brotes al incrementar los niveles de concentración de nutrientes en el medio de cultivo.

Por lo anterior podemos suponer que la longitud de los brotes esta más relacionada con otro factores como la luz y la nutrición que en la aplicación de citocininas como el BA.

Figura 2. Longitud de brotes en el cultivo *in vitro* de *Gladiolus*.



Mientras que los tratamientos con TDZ tuvieron un comportamiento similar al de número de brotes. El valor máximo se dio con una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ con 4 cm de longitud (Figura 2), siendo este 20% mayor que el promedio general seguido con una concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ con un promedio general de 3.5 cm de longitud, teniendo así que existe un equilibrio de crecimiento teniendo uniformidad de los brotes en cuanto a número y longitud.

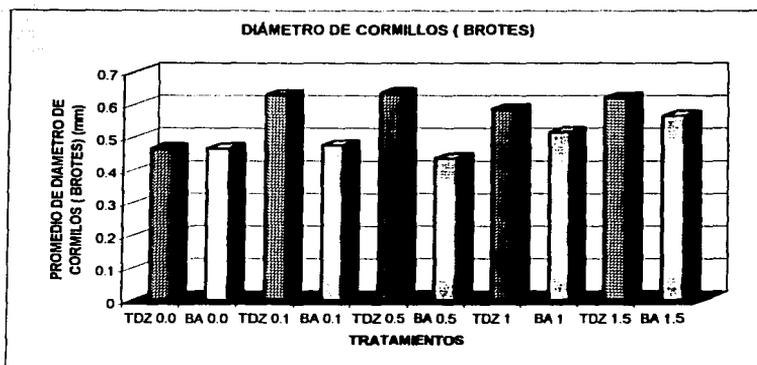
El valor mínimo se determinó a una concentración de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ, Teniendo así, que a menor número de brotes menor longitud de estos (Figura 2), lo cual puede ser atribuido por la alta o baja actividad que presenta esta citocinina con esta concentración, como lo mencionan Nihar *et al* (1997) y Yoko *et al* (2000) determinaron que la concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ promueve el alargamiento en longitud de los brotes.

5.4 Diámetro de cormillos.

Para esta variable se determino un promedio general de 5 mm de diámetro de los cormillos por explante a los 45 días después de la siembra siendo para la concentración de BA de 4 mm y para el TDZ de 6 mm, teniendo una diferencia altamente significativa (Anexo 1, Tabla 3).

El valor máximo se encuentra en las concentraciones de 1.0 y 1.5 mg·l⁻¹ de BA con 5 mm siendo este el 100% igual que el promedio general (Figura 3), mientras que el valor mínimo esta determinado con una concentración de 0.5 mg·l⁻¹ con un promedio de 4 mm de diámetro siendo menor al promedio general.

Figura 3. Diámetro del cormillo en el cultivo *in vitro* de *Gladiolus*.



Para TDZ se presenta su valor máximo con concentraciones de 0.1 y 0.5 mg.l⁻¹ con un promedio de 6 mm de diámetro sobrepasando el promedio general (Figura 3), el valor mínimo se obtuvo con una concentración de 1.0 mg.l⁻¹ de TDZ con un diámetro de 5 mm de diámetro siendo igual al promedio general.

Los resultados son similares a los reportados por Dantu y Bhojwani (1995) que indicaron que para la obtención de un mayor diámetro de cormillos es recomendable la utilización de explantes axilares en un medio de cultivo líquido suplementado con 1.0 mg.l⁻¹ de BA. Por otra parte la aplicación de otras Citocininas como la kinetina a una concentración de 0.5 mg.l⁻¹ favorece la obtención de cormillos con un diámetro de 5 mm (Ziv, M. 1979)

Los resultados pueden variar por el tipo de compuesto citocinico como lo refiere Ziv M., (1979), encontrando que a altas concentraciones de BA favorece el crecimiento mientras que las altas concentraciones de TDZ lo disminuyen.

5.5 Días a formación de raíces

La formación de raíces se dio a partir del sexto día después de la siembra, durante la evaluación de esta variable se dan diferencias entre los testigos y los tratamientos establecidos con BA y TDZ.

En el tratamiento uno (T_1) con BA a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ presento formación de 1 a 2 raíces, siendo similar al tratamiento uno (T_1) con TDZ a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ con una formación de 2 a 3 raíces. Esta formación de raíces fueron inhibidas en su crecimiento, acortándolas y engrosándolas manifestando estas situaciones al incrementar las concentraciones de BA y TDZ.

Hussey (1977) al trabajar en la propagación *in vitro* de *Gladiolus* indicó que al aumentar la concentración de 0.008 a $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y TDZ las raíces se acortan engrosándolas e inhibiendo su crecimiento al aumentar las concentraciones.

VI. Conclusiones.

- Los reguladores de crecimiento (BA y TDZ) influyen en el proceso de organogénesis en el cultivo *in vitro* de *Gladiolus*.
- En las concentraciones de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ se obtuvieron tazas mayores de proliferación de brotes, siendo esto de 5 y 4 brotes por explante respectivamente.
- Con concentraciones de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ presentaron una mayor longitud de brotes.
- El manejo en las concentraciones de los reguladores de crecimiento (BA y TDZ) son mejores para obtener un mejor diámetro de cormillos.
- Con la mayor concentración de BA empleada ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) se incremento la longitud de los brotes, algunos explantes desarrollaron raíces, pero se redujo la tasa de proliferación y el diámetro de cormillos.
- Cuando se emplea la concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA se obtiene una mayor tasa de proliferación de brotes, aumentando su diámetro pero se redujo su longitud.

- Con la concentración menor de TDZ ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) presentó una tasa mayor de proliferación de brotes incrementando su longitud de los mismos y presentando un mejor diámetro de cornillos.
- Con las concentraciones de 1.0 y $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TDZ se presentó una mayor longitud de brotes, aumentando su diámetro de los mismos y reduciendo la tasa de proliferación de brotes.

VII Bibliografía

- ◆ Abeles, F.B., P.W. Morgan, M.E. Saltveit. (1992). Ethylene in plant biology. 2nd ed. New York. Academic Press. pp: 312-326.
- ◆ Alóni, R. (1987). The induction of vascular tissue by auxin. pp: 363-374.
- ◆ Amaki, W., Y. Shinohara., Y. Hayata., H. Sano, and Y. Suzuki. (1984). Effects of bulb desiccation and storage on the *in vitro* propagation of hycinth. Sci. Hort. 23. pp: 353-360.
- ◆ Anderson, W.C., K.A Mielke., P.N. Miller and T. Allen. (1990). *In vitro* bulblet propagation of virus-free Dutch iris. Acta Hort. 66. pp: 77-81.
- ◆ Appelgren, M. and Heide, O.M. (1972). Regeneration in streptocarpus leaf discs and its regulation by temperature and growth substances. Physiol. Plant. 27. pp: 417-423.
- ◆ Baker, C., H.F. Wilkins and P.D. Ascher. (1990). Comparison of precultural treatments and cultural conditions on *in vitro* response of tulip. Acta Hort. 266. pp: 83-90.
- ◆ Bajaj ,Y.P.S., Sidhu, M.M.S and Gill A.P.S. (1983). Some factors effecting the *in vitro* propagation of *Gladiolus*. Sci. Hort. 18. pp: 269-275.

- ◆ Bouza, L., Jacques, B., Sotta, E. and Miginiac, B. (1994). Relation between auxin and cytokinin contents and *in vitro* rootings of peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Plant Growth Regul.* pp: 69-73.
- ◆ Broughton, W.J. and A.J. Mc-Comb. (1971). Change in the pattern of enzyme development in gibberellin-treated pea internodes. *Annual of Botany.* 35. pp: 213-228.
- ◆ Broertjes, C., B. Haccius and S. Weidlich. (1968). Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. *Euphytica.* 17 pp: 321-344.
- ◆ Budde, R.J.H. and D.D. Randall. (1990). Protein kinases in higher plant. pp: 351-367.
- ◆ Carlson, R.D. and Cronetti. (1990). Commercial uses of gibberellins and cytokinins and new areas of applied research. 19. pp: 604-610.
- ◆ Cumming, B.G. and D.E. Peck. (1984). Tissue culture of *grapo hyacinth*. *Hort. Science.* 19. pp: 723-724.
- ◆ Chakravarty, B. and S. Sen. (1987). *In vitro* regeneration from callus cultures of *Scilla indica* (Roxb) Backer. *Cur. Sci.* 56. pp: 960-962.
- ◆ Chen, C-M. (1987). Characterization of cytokinins and related compounds by HPLC. 5. pp: 23-38.

- ◆ Chory, J., D.F. Voytas., N.E. Olszewski and F.M. Ausbel. (1987). Gibberellin induce changes in the populations of translatable mRNAs and accumulated polypeptides in dwarfs of maize and pea. *Plant Physiol.* 83. pp: 15-23.
- ◆ Davies, P.J. (1970). *Mechanisms in plant development* prentice Hall. Englewood. pp: 15-18.
- ◆ Davies, W.J. and T.A. Mansfield. (1988). *Abscisic and drought resistance in plants.* ISI. Atlas of Science: animal and plant Science. pp: 263-269.
- ◆ Dantu, P.K. and Bhojwani S.S. (1995). *In vitro* corm formation and field evaluation of corm-derived plant of *Gladiolus*. *Sci. Hort.* 61. pp: 115-129.
- ◆ Debergh, P. (1987). Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. pp: 383-393. In: C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett and D.D. Bioesboer (eds). *Plant tissue and cell culture.* Alan R. Liss, New York.
- ◆ Debergh, P.C. and P.E. Read. (1991). *Micropropagation.* pp: 1-3. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds). *Micropropagation: Technology and Application.* Kluwer Academic., Dordrecht, the Netherlands.
- ◆ Debergh, P.C., J. Aitken-Christie., K. Cohen., B. Grout., Von Arrold., R. Zimmerman and M. Ziv. (1992). Reconsideration of the term 'vitification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 30. pp: 135-140.

- ◆ Deklerk, G.J., J. Delvallee and A. Paffen. (1992). Dormancy release of micropropagated bulblets of *Lilium speciosum* after long culture in soil. HortScience. 27. pp: 147-148.
- ◆ Djilianov, D., M.M. Gerrits., A. Ivanov., H.A. Van Onckelen and G.J.M. de Klerk. (1994). ABA content and sensitivity during the development of dormancy in lily bulblets regenerated *in vitro*. Physiol. Plant. 91. pp: 639-644.
- ◆ Edwards, G.E., H. Nakamoto., J.N. Burnell and M.D. Hatch. (1985). Piruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C₄ photosynthesis; properties and mechanism of light/dark regulation. pp: 255-286.
- ◆ Eliasson, L., G. Bertell and E. Bolander. (1989). Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. Plant Physiol. 91. pp: 310-314.
- ◆ Flores, S.E. and H. Tobin. (1987). Benzyladenine regulation of the expression of two nuclear genes for chloroplast proteins. In: J.E. Fox., M. Jacobs (eds), molecular biology of plant growth control. pp: 123-132.
- ◆ Galston, A.W. and R. Kaur-Sawhney. (1987). Polyamines as endogenous growth regulators. pp: 280-295. in P.J. Davies (eds), plant hormones and their role in plant growth and development. Martinus Nijhoff, Boston.
- ◆ Gavinlertvatana, P., P.E. Read., H.F. Wilkins and R. Heins. (1979). Influence of photoperiod and daminozide stock plant pretreatments on ethylene and CO₂ levels

and callus formation from *dahlia* leaf segment cultures. J. Am. Soc. Hort. Sci. 104. pp: 849-852.

- ◆ Griesbach, R.A. (1972). The life structure and function in *Gladiolus*. In the World of *Gladiolus* (N. Koenig and W. Crowley, eds.), North Am. Glad. Council Edgerton Press, Md. pp:8-40.
- ◆ Glasziou, K.T. (1969). Control of enzyme formation and inactivation in plants. Annual Rev. Of Plant Physiol. 20. pp: 63-88.
- ◆ Guy, C.L. (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. Annual Review of plant physiology and plant molecular Biology. 47. pp: 187-233.
- ◆ Harris, M.J. and W.H. Outlaw. (1990). Histochemical techniques: A low-volume, enzyme-amplified immunoassay with sub-fmol sensitivity. Application to measurement of abscisic and stomatal guard cell. Physiol. Plant. 78. pp: 495-500.
- ◆ Hughes, K.W. (1981). *In vitro* ecology: Exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Environ. Bot. 21. pp: 281-288.
- ◆ Hussey, G. (1975). Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae* and *Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot. 26. pp: 253-262.
- ◆ Hussey, G. (1976). *In vitro* release of axillary shoot from apical dominance in monocotyledonous plantlets. Ann. Bot. 40. pp: 1323-1325.

- ◆ Hussey, G. (1977). *In vitro* propagation of *Gladiolus* by precocious axillary shoot formation. 6. pp: 287-296.
- ◆ Hussey, G. (1978). The application of tissue culture to the vegetative propagation of plant. Sci. Prog., Oxford. 65. pp: 185-208.
- ◆ Hussey, G. (1980). *In vitro* propagation. pp: 51-61.
- ◆ Hussey, G. (1982). *In vitro* propagation of *Narcissus*. Ann. Bot. 49. pp: 707-719.
- ◆ Huxler. (1981). Physiology Plant. pp: 319-326.
- ◆ Jacobs, W.P. (1977). Plant hormone and plant development. Cambridge University Press. pp: 19-21.
- ◆ Jameson, P.E., D.S. Letham., R. Zhang., C.W. Parter and J. Badenuch-Jones. (1987). Cytokinin translocation and metabolism in lupin species. 14. pp: 695-718.
- ◆ Jehan, H., D. Courtois., C. Ehret., K. Lorch and V. Petiard. (1994). Plant regeneration of *Iris pallida* lam. And *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. Plant Cell Rep. 13. pp: 671-675.
- ◆ Jha, S. and S. Sen. (1987). Nuclear changes and organogenesis during callus culture of *Urginea indica* kunth., Indian squill. Cytology. 52. pp: 433-438.
- ◆ Kallas, Peter, Wolfram Meier-Augenstein and Schidknecht. (1990). The structure activity relationship of the turgorin PLMF1 in the sensitive plant *Mimosa*

pudica L.: *In vitro* binding of [¹⁴C-carboxyl]-PLMF1 to plasma membrane fractions from *Mimosa leavea* and bioassays with PLMF1-isomeric compounds. Journal of plant physiol. pp: 225-230.

◆ Karam, N.S. and AL-Majathoub, M. (2000). Direct shoot regeneration and icrotuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill. Using seedling tissue. Sci.Hortic. 86. pp: 235-246.

◆ Kim, K.S. (1991). The effect of growth regulators, temperature and sucrose on the dormancy in *Lilium speciosum* bulblets cultured *in vitro*. Korean J. Plant Tissue Culture. 18. pp: 103-111.

◆ Kim, K.W., M.S. Kang and D.H. Goo. (1991). External and histological characteristics of organogenesis from *Gladiolus* callus. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 32. pp: 125-130.

◆ Kim, K.W. and S.Y. Han. (1993). Cormlet formation in *Gladiolus* shoot base by growth retardants *in vitro*. J.Kor. Soc Hort. Sci. 34. pp: 136-144.

◆ Kim, K.S., E. Davelaar and G.L. Klerk. (1994). Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. Physiol. Plant. 90. pp: 59-64.

◆ Konar, R.N., E. Thomas and H.E. Street. (1972). Origin and structure of embryoids arising from epidermal cell of the stem of *Ranunculus scolerantus* L. J. Cell. Sci. 11. pp: 77-93.

- ◆ Kromer, K.D. (1985). Regeneration of some monocotyledonous plants from subterranean organs *in vitro*. *Acta Agrobotanica*. 38. pp: 65-87.

- ◆ Kumar et al. (1986). *Plant Tissue Cell Culture Abstr.* pp : 11.

- ◆ Kumar, A., Palni, L.M.S. and Gupta, A.K. (1999). *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort. : Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 57. pp: 105-112.

- ◆ Leifert, C., H.Camota and W.M. Waites. (1992) Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 29. pp: 153-160.

- ◆ Letman, D.S. and Palni, L.M.S. (1983). The biosynthesis and metabolism of cytokinin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34. pp: 163-197.

- ◆ Lewis, G.J., A.A. Obermeyer and T.T. Bernart. (1972). *Gladiolus* – A revision of the south African species. *J.S. Afr. Bot.* pp: 10.

- ◆ Lilien-Kipnis, H. and M. Kochba. (1987). Mass propagation of new *Gladiolus hybrids*. *Acta Hort.* 212. pp: 631-638.

- ◆ Li, J., Nagpal., P. Vitart., V. McMorris., T. and Chory, J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science*. pp:124-130.

- ◆ Liu, P.B.W. and J.B. Log. (1976). Action gibberellic acid on cell proliferation in the subapical shoot meristem of watermelon seedlings. *American Journal Botany*. 63. pp: 700-704.
- ◆ Lynch, J. (1989). Salinity stress in creases cytoplasmatic Ca⁺ activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol*. 90. pp: 1271-1274.
- ◆ Maesato, K., K.S. Sarma., H. Fukui and T. Hara. (1991). *In vitro* bulblet induction from shoot apices of *Lilium japonicum*. *Hort. Science*. 26. pp: 211.
- ◆ Maesato, K., K. Sharada., H. Fukui., T. Hara and K.S. Sarma. (1994). *In vitro* bulblets regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thunb. Effect of plant growth regulators and culture environment. *J. Hort. Sci*. 69. pp: 289-297.
- ◆ Marmé, D. (1989). The role of calcium and calmodulin in signal transduction. pp: 57-80.
- ◆ Martin, G.C. (1983). commercial uses gibberellins. 2. pp: 395-444.
- ◆ Manoharan, M., Sree Vidya, C.S. and Lakshmi Sita, G. (1998). Agrobacterium-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annum* L. var. Pusa jwala). *Plant Science*. 131. pp: 77-83.
- ◆ Menon, A.R., M. Rincon and W.F. Boss. (1989). Inositol trisphosphate metabolism in carrot (*Daucus carotta* L.), cells. *Plant Physiol*. 91. pp: 477-480.
- ◆ Morris and Jhonson. (1985). In : Dixon. pp: 127-167.

- ◆ Murthy, B.N.S., S.D. Murch and P.K. Saxena. (1995). Thidiazuron induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol. Plant.* 94. pp: 268-276.
- ◆ Mundy, J. (1984). Hormonal regulation of α -amylase inhibitor synthesis in germinating barley. *Clarlsberg Research Communications.* 49. pp: 439-444.
- ◆ Nihar R.N., Shiba, P.R. and Satyanarayan, P. (1997). *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* L., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. And *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Sci. Hortic.* 71. pp: 243-250.
- ◆ Niimi, Y. and Watanabe, H. (1982). *In vitro* propagation of *Lilium rebellum* Baker, especially of bulblet formation on stem segments. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* pp: 391-394.
- ◆ Niimi, J., Endo, Y. and Arisaka, E. (1988). Effects of chilling-and GA₃-treatments on breaking dormancy in *Lilium rubellum* Baker bulblets cultured *in vitro*. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* pp: 250-257.
- ◆ Novak, F.J. and Petru, E. (1984). Tissue culture propagation of *Lilium hybrids*. *Sci. Hortic.* pp: 191-194.

- ◆ Owe, J.H. and Mundy J. (1990). Role of abscisic acid. *Physiol. Plant.* 72. pp: 637-641.
- ◆ Pierik. (1984). *Vakbl. Bloem.* pp: 44-45.
- ◆ Pierik, R and Teteroo, F. (1987). Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan *in vitro* from inflorescencia explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.10. pp: 135-142.
- ◆ Read, E.A.S. and Fellman, C.D. (1985). Manipulating stock plants for improved *in vitro* mass propagation. *Proc. Intl. Plant Tissue Cell Cult.: Application to crop improvement.* (F.J. Novack, L. Havel, and J. Dolezel, eds.). Czech. Acad. Sci. Prague. pp: 467-473.
- ◆ Remotti, P.C. and Löffler, H.J.M. (1995). Callus induction and plant regeneration from *Gladiolus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 42. pp: 171-178.
- ◆ Roest, S. and Bobelmann, G. (1975). Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium in vitro*. *Sci. Hortic.* pp: 317-330.
- ◆ Sachs, R.M. (1965). Stem elongation. *Annual Review of Plant Physiology*. 16. pp. 73-96.
- ◆ Schildknecht, Hermann. (1983). Turgorins hormones of the endogenous daily rhythms of higher organized plant-detection. isolation, structure, synthesis, and activity. *Angewandte Chemie int. Edition English.* pp : 695-710.

- ◆ Schildknecht, Hermann. (1984). Turgorins-new chemical messengers for plant behaviour. *Endeavour, New. Series.* pp: 113-117.
- ◆ Seabrook, Cumming, B.G. and Dionne, L.A. (1976). The *in vitro* induction of adventitious shoot and root apices on *Narcissus* (daffodil and narcissus) cultivar tissue. *Can. J. Bot.* pp: 814-819.
- ◆ Sen, J. and Sen S. (1995). Two step bud culture technique for high frequency regeneration of *Gladiolus* corms. *Sci. Hort.* 64. pp: 133-138.
- ◆ Steinitz, B., Cohen, A., Goldberg, Z. and Kochba, M. (1991). Precocious *Gladiolus* corm formation in liquid shake culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26. pp: 63-70.
- ◆ Stimart, D.P. and Ascher, P.D. (1981). Foliar emergence from bulblets of *Lilium longiflorum* Thunb. as related to *in vitro* generation temperatures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* pp: 446-450.
- ◆ Soumendra, K.N., S. Sitakanata, P. and Pradeep K. (1999). *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. *Sci. Hort.* 79. pp: 175-183.
- ◆ Sutter, E.G. (1986). Micropropagation of *Ixia viridifolia* and *Gladiolus* x *Homoglossum hybrid*. *Sci. Hortic.* 29. pp: 181-189.

- ◆ Taylor, A. and D.J. Crosgrove. (1989). Gibberellic acid stimulation of cucumber hypocotyls elongation. Effects on growth, turgor, osmotic pressure, and cell wall properties. *Plant Physiol.* 90. pp: 1335-1340.

- ◆ Tepfer, D.A. and D.E. Fosket. (1978). Hormone mediated transnational control of protein synthesis in culture cell of glycine max. *Developmental Biology.* 62. pp: 486-497.

- ◆ Te-chato, S. and Lim, M. (2000). Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. *Sci. Hort.* 86. pp: 291-298.

- ◆ Torrey, J.G. (1976). Root hormones and plant growth. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27. pp: 435-459.

- ◆ Tonon, G., Capuana, M. and Di Marco, A. (2001). Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. *Sci. Hort.* 87. pp: 291-301.

- ◆ Van Aartrijk, and Withers and Alderson. (1986). Adventitious buds formation from bulb-scales explants of *Lilium speciosum* Thumb *in vitro*. Dissertation. Agricultural University. pp: 1-79.

- ◆ Van Aartrijk, J. And Van der Linde, P.C.G. (1986). *In vitro* propagation of flower-bulb crops. In: *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* (R.H. Zimmerman, R.J. Griesbach, F.A. Hammerschlag, and R.H. Lawson, eds.) pp: 317-331. Martinus Nijhoff, Boston.

- ◆ Van Staden, J., Cook, E. and Nooden, L.D. (1988). Cytokinins and senescence. In senescence and aging in plant, L.D. Nooden and A.C. Leopold, eds. Academic Pres. San Diego. pp: 281-328.
- ◆ Van Staden, J., A.D. Bayley., S.J. Upfold and F.E. Drewes. (1990). Cytokinins in cut carnation flowers. VIII. Uptake transport and metabolism of benzyladenine and effect of Benzyladenine derivatives of flowers longevity. Journal of plant physiology. 135. pp: 703-707.
- ◆ Verhagen et al (1986). In Congr. Plant tissue cell culture abstr. pp: 58.
- Wareing, P.F. and Phillips, I.D.J. (1981). Growth and differentiation in plants, 3er edition, Pergamon Press, New York, USA.
- ◆ Wilfret, G.J. (1980). A critical evaluation of the commercial *Gladiolus* cultivars grown in Florida. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 83. pp: 423-427.
- ◆ Yoko, A., Daimon, H. and Mii, M. (2000). Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. Plant Science. 156. pp: 169-175.
- ◆ Zhang, Y. (1989). The influence of GA₃ on fructosyl carbohydrates in wheat plants. Thesis. pp: 63-75.

- ◆ Zeevaart, J.A.D. and R.A. Creelman. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 39: pp: 439-473.
- ◆ Ziv, M., Halevy, A.H. and Shilo R. (1970). Organs and plantlet regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Ann. Bot. 34. pp: 671-676.
- ◆ Ziv, M. (1979). Transplanting *Gladiolus* plant propagated *in vitro*. Sci. Hortic. 11. pp: 257-260.
- ◆ Ziv, M. (1989). Plant Cell Tissue Culture. 17. pp: 101-110.
- ◆ Ziv, M. (1990). Acta Hort. (in press). pp: 58-62.
- ◆ Ziv, M, y Lilien-Kipnis, H. (1990). *Gladiolus*. In handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species, por Amirato P.V. et al. edit. MacGraw-Hill, 1990. pp: 461-477.
- ◆ Ziv M. (1991). Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Micropropagation technology and application. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds.) Kluwer Academic Publishers. pp: 45-56.
- ◆ Ziv Meira, (1999). Morphogenesis of *Gladiolus* buds in bioreactors-implication for scaled-up propagation of geophytes. Biotechnology in agriculture. pp: 119-124.

ANEXO 1

TABLA 1

Anova para la variable Número de brotes

FV	GL	SUM. CUA.	CUAD. MED.	Fc	Ft
MEDIA	1	1676.2	1676.2		
A	1	0.41	0.41	0.122 N.S	1%-6.81 5%-3.91
B	4	83.22	20.8	6.20**	1%-3.44 5%-2.43
AB	4	28.22	7.05	2.10 N.S	1%-3.44 5%-2.43
E. EXP.	190	636.95	3.35		
TOTAL	200	2425			

TABLA 2

Anova para la variable Longitud de cornillos (brotes)

FV	GL	SUM. CUA.	CUAD. MED.	Fc	Ft
MEDIA	1	1575.28	1575.28		
A	1	7.49	7.49	4.43 N.S	1%- 6.81 5%- 3.91
B	4	52.12	13.03	7.71**	1%- 3.44 5%- 2.43
AB	4	16.19	4.04	2.39 N.S	1%- 3.44 5%- 2.43
E. EXP.	190	322.29	1.69		
TOTAL	200	1973.37			

TABLA 3

Anova para la variable Diámetro de brotes

FV	GL	SUM. CUA.	CUAD. MED.	Fc	Ft
MEDIA	1	58.1	58.1		
A	1	0.46	0.46	13.9**	1%- 6.81 5%- 3.91
B	4	0.35	0.075	2.27 N.S	1%- 3.44 5%- 2.43
AB	4	0.26	0.065	1.96 N.S	1%- 3.44 5%- 2.43
E. EXP.	190	6.31	0.033		
TOTAL	200	65.48			

ANEXO 2: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS VARIABLES

NUMERO DE BROTES			LONGITUD DE BROTES		DIÁMETRO DE CORMILLOS (BROTES)	
BA	TRAT.	PROMEDIOS	TRAT.	PROMEDIOS	TRAT.	PROMEDIOS
	T4 1.0	4.25 a	T2 0.1	3.93 a	T5 1.5	0.565 a
	T5 1.5	3.20 a	T3 0.5	3.08 a b	T4 1.0	0.515 a
	T3 0.5	3.0 a b c	T4 1.0	2.92 a b c	T2 0.1	0.475 a b c
	T2 0.1	2.5 b c	T5 1.5	2.81 b c	T1 0.0	0.465 b c
	T1 0.0	1.75 b c	T1 0.0	2.25 b c	T3 0.5	0.435 b c
TDZ	TRAT.	PROMEDIOS	TRAT.	PROMEDIOS	TRAT.	PROMEDIOS
	T2 0.1	3.7 a	T4 1.0	3.39 a	T3 0.5	0.635 a
	T4 1.0	3.15 a	T2 0.1	3.33 a	T2 0.1	0.630 a
	T5 1.5	3.1 a b	T1 0.0	2.25 b c	T5 1.5	0.62 a
	T3 0.5	2.5 b c	T5 1.5	2.18 b c	T4 1.0	0.585 a b c
	T1 0.0	1.75 b c	T3 0.5	1.93 b c	T1 0.0	0.465 b c

Valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$

87