



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE *Polianthes tuberosa* L. A PARTIR DE CORMO, HOJA, FLOR Y YEMA

FANNY HERNÁNDEZ MENDOZA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: "Caracterización de las condiciones para la micropropagación de *Polianthes tuberosa* L. a partir de cormo, hoja, flor y yema", realizada por la alumna: Fanny Hernández Mendoza, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

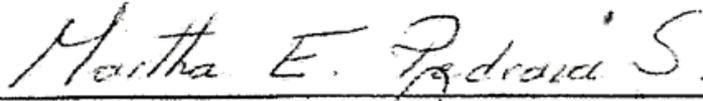
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


Dr. Guillermo Carrillo Castañeda

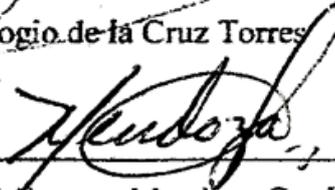
ASESOR


Dra. Martha Elena Pedraza Santos

ASESOR


Dr. Eulogio de la Cruz Torres

ASESOR


Dra. Ma. del Carmen Mendoza Castillo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2013

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados**, en especial a IREGEP-Genética del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por el apoyo y facilidades para mi formación profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo de la beca concedida (424576) que permitió, en parte, la realización de esta investigación.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda Consejero y Director de la presente tesis, por su tiempo y recursos para hacer posible que el presente trabajo sea una realidad.

A la Dra. Martha E. Pedraza Santos por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo y por ser una excelente persona con gran calidez humana.

A todos los integrantes de mi **Consejo Particular**: Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, Dra. Martha E. Pedraza Santos, Dr. Eulogio de la Cruz Torres, Dra. Ma. Del Carmen Mendoza Castillo, por su colaboración y disposición para la realización del presente trabajo, por el tiempo invertido y por las observaciones realizadas.

A mis compañeros y amigos, Agueda, Selene, Ulises, Ana lidia, Ana Karen, Esau, Aurelio, Mayra, Lulú, Magnolia, Bere e Isabel, que me han apoyado cuando lo he necesitado y por compartir conmigo momentos agradables.

A todas las personas y facilidades con que conté para la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, Alberto Hernández y María Mendoza

Por ser el pilar fundamental en mi vida, por todo su apoyo y esfuerzo, lo que hizo posible mi meta alcanzada. Para ellos mi amor, y respeto.

A mi esposo, Víctor García Gaytan

Por formar parte de mi vida, quien me ha brindado su apoyo incondicional en todo momento, gracias por tu amor, paciencia y comprensión.

A mis queridas hermanas, Pamela, Areli y Daniela

Por el apoyo incondicional en todo momento, por su inmenso cariño y por fortalecer nuestra familia, mis sinceros agradecimientos.

A mis cuñados, Chano, Raúl y Armando

Por ser parte de la familia y apoyarme en los momentos difíciles y buenos.

A mis pequeños y amados sobrinos, Miguel Ángel, Raúl y Mina

Quienes llenan de alegría y amor, gracias por la demostración de afecto y cariño, los amo.

CONTENIDO

Página

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL SUMMARY	xiii
CAPÍTULO I.....	1
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Hipótesis general.....	7
II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1 Características de <i>P. tuberosa</i> L.	8
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. tuberosa</i> L.	9
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de agaváceas	10
2.4 Inducción de mutaciones.....	10
CAPITULO II.....	12
REGENERACIÓN DE BROTES <i>in vitro</i> DE <i>Polianthes tuberosa</i> L. A PARTIR DE BOTÓN FLORAL Y DE TEJIDO FOLIAR.....	12
RESUMEN.....	12
Abstract.....	13
I. INTRODUCCIÓN	15
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Localización del sitio experimental.....	18
2.2 Material biológico	18
2.3 Medios de cultivo	18
2.4 Establecimiento.....	19
2.5 Diseño experimental	21
2.6 Análisis estadístico.....	21
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Tipos de desarrollo en los cultivos de <i>P. tuberosa</i> L.	22
3.1.1 Desarrollo de brotes	22
3.1.2 Cultivos con desarrollo de raíz.....	23

3.1.3	Desarrollo de plantas	24
3.1.4	Cultivos con desarrollo de tejidos de tépalos	24
3.1.5	Cultivos con desarrollo de callo	25
3.1.6	Cultivos de explantes de tejido foliar.....	28
IV. CONCLUSIONES.....		32
CAPITULO III.....		36
REGENERACIÓN <i>in vitro</i> DE BROTES DE <i>Polianthes tuberosa</i> L. A PARTIR DE YEMAS VEGETATIVAS DE LA INFLORESCENCIA Y DE TEJIDO DE CORMO.....		36
RESUMEN.....		36
Abstract.....		37
I. INTRODUCCIÓN		38
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....		40
2.1	Localización del sitio experimental.....	40
2.2	Material biológico.....	40
2.3	Medios de cultivo	40
2.4	Establecimiento.....	41
2.5	Diseño experimental	43
2.6	Análisis estadístico.....	43
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		44
3.1	Contaminación en yemas vegetativas de <i>P. tuberosa</i> L.	44
3.2	Tipos de desarrollo en los cultivos de <i>P. tuberosa</i> L.	44
3.2.1	Cultivos con desarrollo de brotes y plántulas a partir de yemas vegetativas.....	44
3.2.2	Cultivos con desarrollo de callo	48
3.2.3	Cultivos desarrollados a partir de cormo	49
IV. CONCLUSIONES.....		53
V. LITERATURA CITADA.....		54
CAPÍTULO IV.....		58
CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE CORMOS GENERADOS A PARTIR DE PLANTAS (<i>Polianthes tuberosa</i> L.) DE CORMOS IRRADIADOS .		58
RESUMEN..		58
Abstract.....		58
I. INTRODUCCIÓN		59

II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
2.1 Localización del sitio experimental.....	61
2.2 Material biológico.....	61
2.3 Establecimiento de los cormos.....	61
2.4. Análisis estadístico.....	62
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
3.1 Respuesta de plantas irradiadas de <i>P. tuberosa</i> L.....	63
IV. CONCLUSIONES.....	68
V. LITERATURA CITADA.....	69
CAPÍTULO V.....	71
RESULTADOS PRELIMINARES DE LA PROPAGACIÓN DE <i>Polianthes</i>	
<i>tuberosa</i> L. A PARTIR DE ESQUEJES.....	71
RESUMEN.....	71
Abstract.....	72
I. INTRODUCCIÓN.....	73
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
2.1 Localización del sitio experimental.....	75
2.2 Material biológico.....	75
2.3 Sustratos.....	75
2.4 Establecimiento de esquejes en invernadero.....	75
2.5 Establecimiento de esquejes en el laboratorio.....	77
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78
3.1 Respuesta de esqueje al número de nudos y sellado con parafina en esquejes de <i>P. tuberosa</i> L.....	78
3.2 Respuesta a los diferentes sustratos en esquejes de nardo.....	79
3.3 Respuesta de ácido indol butírico en esquejes de <i>P. tuberosa</i> L.....	81
IV. CONCLUSIONES.....	82
V. LITERATURA CITADA.....	83
DISCUSIÓN GENERAL.....	85
CONCLUSIONES GENERALES.....	89
LITERATURA CITADA.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

	Página
Cuadro 1. Fechas importantes en la historia del cultivo de tejidos vegetales (1902-2012)	3

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Clave y composición de los medios de cultivo GC utilizados para la inducción de brotes de nardo (<i>P. tuberosa</i> L.) a partir de tejido foliar y de botones florales. Las cantidades se expresan por litro de medio.	19
Cuadro 2. Respuesta de los explantes de tejido de botón de <i>P. tuberosa</i> L. al ser cultivados en el medio de cultivo GC con los reguladores de crecimiento indicados. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.	23
Cuadro 3. Nivel de contaminación y tipo de desarrollo observado en los cultivos de <i>P. tuberosa</i> L. generados a partir de explantes de botón. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.	25
Cuadro 4. Nivel de contaminación y respuesta de los cultivos de botón de <i>P. tuberosa</i> L. al cultivarse en medios de consistencia líquida y sólida con 1, 2 y 3 % de sacarosa. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.	27
Cuadro 5. Nivel de contaminación y respuesta de los cultivos generados a partir de explantes de tejido foliar de <i>P. tuberosa</i> L. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.	28

CAPÍTULO III

Cuadro 1. Clave y composición de los medios de cultivo GC utilizados para la inducción de brotes de <i>P. tuberosa</i> L. a partir de yema vegetativa y corno. Las cantidades se expresan por litro de medio.	41
Cuadro 2. Contaminación observada en el cultivo <i>in vitro</i> a partir de yemas vegetativas de <i>P. tuberosa</i> L. al ser expuestos a las soluciones de hipoclorito de sodio indicadas. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.	44

Cuadro 3. Tipo de desarrollo observado en los cultivos generados a partir de explantes de yema vegetativa de <i>P. tuberosa</i> L. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.	45
Cuadro 4. Respuesta de las yemas de <i>P. tuberosa</i> L. a los cuatro meses al ser cultivadas en el medio de cultivo GC con los reguladores de crecimiento indicados. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.	47
Cuadro 5. Respuesta de los cultivos de tejido de corno de <i>P. tuberosa</i> L. al cultivarse en el medio de cultivo GC con los reguladores de crecimiento indicados.	50

CAPÍTULO V

Cuadro 1. Tratamientos de esquejes de diferente tamaño de <i>P. tuberosa</i> L. en tierra, sellados con parafina fundida.	76
Cuadro 2. Tratamientos de esquejes de tres nudos sellados en los extremos con parafina, en sustratos evaluados en esquejes de <i>P. tuberosa</i> L.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Tamaño y aspecto de los botones florales en diferente nivel de crecimiento de nardo. 20
- Figura 2.** Regeneración de brotes en los cultivos de botón de *P. tuberosa* L. A), B) y C) Cultivos desarrollados en el medio 2 2 durante uno, dos y cuatro meses de incubación, respectivamente. D) y E) Cultivos desarrollados en el medio 8 2 A, al mes y tres meses de incubación respectivamente. Las fotografías no están en la misma escala. 24
- Figura 3.** Aspecto de diferente tipo de desarrollo en los cultivos generados a partir de explantes de tejido de botón de *P. tuberosa* L. A) Desarrollo de tépalos en el medio 2 2 a los dos meses de cultivo, B) Desarrollo de callo verde en el medio 4 2 al mes de cultivo, C) Desarrollo de proembriones en el medio 4 2 a los cuatro meses de cultivo, y D) Desarrollo de callo color blanco marfil en el medio 3 2 al mes de cultivo. 26
- Figura 4.** Aspecto de los cultivos de botón de *P. tuberosa* L. A), B) y C) Desarrollados en los medios líquidos 4 1 L, 4 2 L y 4 3 L y D), E) y F) Desarrollados en los medios de constitución sólida (hilera inferior de fotos). Todos ellos muestran desarrollo de callo. 27
- Figura 5.** A) Aspecto de regeneración de callo a partir de tejido foliar en el medio 4 2 a los dos meses de cultivo y B) Aspecto de proembriones a partir de tejido foliar en el medio 1 2 a los dos meses de cultivo. 29

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Aspecto de una yema axilar de la inflorescencia de nardo (*P. tuberosa* L.) 42
- Figura 2.** A) Brotes generados de la base de la yema vegetativa de *P. tuberosa* L. a los dos meses. B) A los tres meses de cultivo con nuevos brotes. C) Cultivos con estructuras de proembriones en la base de la yema a los tres meses de cultivo y D) Plántula con brotes nuevos generados directamente del tejido de la base de la plántula a los cuatro meses de cultivo. 46
- Figura 3.** Aspecto de los brotes de *P. tuberosa* L. en el proceso de regeneración a partir de los cultivos de yema vegetativa de nardo en 47

el medio 2 2. A) Brotes generados directamente de la yema de un mes. B) Brotes de dos meses de cultivo con la misma respuesta.

- Figura 4.** Aspecto del desarrollo de estructuras proembriogénicas generadas a partir de la base de la yema vegetativa de inflorescencia de *P. tuberosa* L. A) Medio 4 2 y B) Medio 5 2. **48**
- Figura 5.** A) Aspecto de brotes de *P. tuberosa* L. de un mes de cultivo, desarrollados a partir de tejido de corno a pesar de estar contaminado el cultivo. B) Aspecto de la plántula a partir de corno a los cuatro meses de cultivo en el medio 2 2 (BAP 4.50 mg y ANA 0.10 mg). **49**

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Efecto de la radiación en el número de cormos en *P. tuberosa* L. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$ **63**
- Figura 2.** Respuesta del volumen de cormos a la radiación en *P. tuberosa* L. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$. **64**
- Figura 3.** Respuesta del peso de cormos a la radiación en *P. tuberosa* L. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$. **65**
- Figura 4.** Efecto de dosis de radiación en el volumen de cormos en *P. tuberosa* L. **65**
- Figura 5.** Efecto de dosis de radiación en el peso de cormos en *P. tuberosa* L. **66**

CAPÍTULO V

- Figura 1.** Supervivencia de esquejes de nardo (*P. tuberosa* L.) en respuesta al número de nudos y al sellado de los extremos con parafina fundida. **78**
- Figura 2.** Aspecto de los esquejes de nardo (*P. tuberosa* L.) en respuesta al número de nudos y al sellado de los extremos con parafina con uno, dos y tres nudos a los 15 días de establecidos en sustrato de tierra. **79**
- Figura 3.** Respuesta de esquejes de *P. tuberosa* L. al cultivo en diferentes sustratos A) y B) A los 60 y 90 días de establecidos en arena, **80**

respectivamente, deshidratándose el primer nudo en ambos C) Foto de esqueje en agrolita a los 90 días con un verde intenso.

- Figura 4.** Respuesta de la variable sobrevivencia de esquejes de *P. tuberosa* L. en diferentes sustratos. **80**
- Figura 5.** Aspecto de esqueje de *P. tuberosa* L. con yema verde a los 120 días de establecido con sustrato arena. **81**
- Figura 6.** Respuesta de esquejes de *P. tuberosa* L. al regulador AIB. A) Aspecto a los diez días de establecidas y B) Aspecto a los 30 días de establecidas. **82**

CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE *Polianthes tuberosa* L. A PARTIR DE CORMO, HOJA, FLOR Y YEMA

RESUMEN GENERAL

Fanny Hernández Mendoza, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2013

Debido a las tecnologías con que se cuenta en la actualidad es relativamente fácil incrementar la biodiversidad y se considera que dos grupos de técnicas son indispensables para aumentar la variabilidad genética de los cultivos. Las técnicas empleadas para la inducción de mutaciones son las herramientas útiles para incrementar la variabilidad genética y las técnicas de cultivo *in vitro* permiten la multiplicación rápida de los fenotipos seleccionados. El nardo (*Polianthes tuberosa* L.) es una planta endémica de México, la importancia de este cultivo radica en que es utilizada como flor de corte así como en la industria farmacéutica y del perfume. Es peculiar que presenta poca variabilidad genética, porque es propagada vegetativamente. En este estudio se realizaron cuatro trabajos, tres realizados en IREGEP-Genética del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México y uno en la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán. En la primera y segunda parte, el presente estudio plantea la utilización de la biotecnología para la regeneración masiva de plántulas de *P. tuberosa* L. a partir de cormo, hoja, flor y yema. Fueron colocados sobre la superficie del medio de cultivo base GC que contiene (todas las cantidades relacionadas con los medios se expresan por litro) agua de coco, 50 mL, agar 6.4 g y el pH ajustado a 5.7. Con este medio fueron preparados una serie de medios de cultivo que contenían bencil amino purina (BAP), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), tiazuron (TDZ) y cinetina así como sacarosa (10, 20 y 30 g). La regeneración de brotes a partir de tejido de botón se logró en mayor porcentaje (3.5 %) en los explantes cultivados en el medio 2.2, el desarrollo de raíz se logró en un medio que contenía 1.0 mg de ácido indolacético y 0.1 mg de BAP. En los cultivos de tejido foliar se logró la regeneración de callo verde en mayor porcentaje (50.9 %) en medio sólido con 4.5 mg de BAP, 0.05 mg de ANA y 20 g de sacarosa. El desarrollo de los brotes que dieron origen a las pequeñas plántulas a partir de yema ocurrió mediante, el desarrollo directo de la yema la cual al crecer desarrolla una plántula y a partir del tejido de la base de la yema, de esta región se obtuvieron hasta seis brotes por yema en el medio que contiene BAP, 4.5 mg y ANA, 0.1 mg, medio del cual la regeneración de brotes fue mayor (56.1 %). En el caso de cormo el problema es la contaminación llegando en algunos casos hasta el 100 % de los cultivos. En la tercera parte, cormos de *P. tuberosa* L. se sometieron a siete dosis de radiación (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 Gy), a partir de la evaluación de la primera generación vegetativa irradiado (V1) el mayor número de cormos se logró con una dosis de radiación de 15 Gy, el mayor volumen y tamaño de cormo se logró con 30 Gy. En la cuarta parte, se probaron sustratos para la propagación de esquejes, así como número de nudos y sellado de parafina fundida en la parte superior y en ambos extremos del esqueje, la mayor sobrevivencia se logró con tres nudos y sellando con parafina fundida ambos extremos del esqueje en el sustrato de arena (120 días). Es importante resaltar el valor de poder lograr la regeneración masiva *in vitro* de plantas de nardo a partir de hoja, botón y yema floral, para poder rescatar mutantes somáticos que se observan en las plantas, ya sean mutaciones generadas de manera espontánea o inducidas.

Palabras clave: Propagación, regeneración de plantas, medio de cultivo, hormonas, Eficiencia de la regeneración, contaminación.

CHARACTERIZATION OF CONDITIONS FOR MICROPROPAGATION OF *Polianthes tuberosa* L. FROM CORMO, SHEET, FLOWER AND BUD

GENERAL SUMMARY

Fanny Hernández Mendoza, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2013

Nowadays is relatively easy to enhance biodiversity, considering two biotechnological tools available to increase the genetic variability of crops: Radioinduced mutagenesis and *in vitro* propagation. These are two complementary methodologies that through the induction of variability the first and the rapid multiplication of selected phenotypes the former, can potentiate the process of plant breeding, having several advantages over other conventional methods. Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) is a plant endemic to Mexico. Being important both as a cut flower and as raw material in the pharmaceutical and fragrance industry. The variability of tuberose is very narrow, and this is attributed in four parts: three were conducted at IREGEP-Genetics Graduate College Campus Montecillo, Texcoco, State of México, and one was performed at Faculty of Agrobiology "President Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán. In the first and second part, this paper examines the use of biotechnology to massive regeneration of seedlings of *P. tuberosa* L. using button, leaf, bud and corm. Propagles were placed on the surface in culture medium containing GC base (all media related quantities are expressed per liter) coconut water, 50 mL, 6.4 g agar, pH adjusted to 5.7. With this basic medium, were prepared a series of culture media containing benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole acid acid (IAA), thidiazuron (TDZ), kinetin and sucrose (10, 20 and 30 g). Highest percentage of plants regeneration (3.5%) was achieved with button in explants grown in medium 2. Root development was achieved in a medium containing indole butyric acid, 1.0 mg and BAP, 0.1 mg. In cultures derived of leaf tissue, highest percentage (50.9%) of regeneration obtaining green callus, was achieved with solid medium added with BAP, 4.5 mg, NAA, 0.05 mg and 20 g of sucrose. The shoot development that gave rise to small plantlets from bud occurred through the direct development of the bud which develops a plantlet from the base of the bud. From this region were obtained up to six plantlets per bud in the medium containing BAP, 4.5 mg and NAA, 0.1 mg, being the highest regeneration of plantlets (56.1%). With corm the contamination problem achieving up to 100%. In the third part, corms of *P. tuberosa* L. were subjected to seven radiation doses (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 Gy), from the evaluation of the first vegetative irradiated generation (V1) the largest number of corms was achieved with a radiation dose of 15 Gy, the largest volume and size of corms was achieved with 30 Gy. In the fourth part, substrates were tested for the propagation of cuttings and number of internodes applying molten paraffin in one y two ends of the cutting, the best survival was achieved with three nodes applying molten paraffin in two ends of the cutting and the optimum substrate was arena (120 days). It is important to highlight the importance of achieving massive regeneration *in vitro* of tuberose plant from leaf and flower bud button, in order to rescue somatic mutants observed in plants being this generated either spontaneously or induced.

Keywords: Regeneration of plantlets, culture media, hormones, regeneration efficiency, contamination.

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Debido a las tecnologías con que se cuenta en la actualidad es relativamente fácil incrementar la biodiversidad y se considera que son dos grupos de técnicas las indispensables para aumentar la variabilidad genética de los cultivos (Toker *et al.*, 2007). Por un lado, las técnicas empleadas para la inducción de mutaciones son las herramientas útiles para incrementar la variabilidad genética y por el otro, las técnicas de cultivo *in vitro* permiten la multiplicación rápida de los fenotipos seleccionados. Estas técnicas se complementan y aplican para la obtención de mutantes (Van Harten, 1998) porque permiten el tratamiento de un gran número de individuos y la multiplicación de los fenotipos seleccionados en un espacio reducido, en tiempos relativamente cortos y bajo condiciones fitosanitarias satisfactorias. Además, después de tratar el material vegetal con el agente mutagénico seleccionado, los tejidos quiméricos pueden ser separados de los sectores modificados para regenerar las plantas que expresarán las características deseadas (Ahloowalia, 1995). Las herramientas biotecnológicas necesarias que hicieron posible el avance de las técnicas del cultivo *in vitro*, tales como el desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores del crecimiento, no estuvieron disponibles hasta finales de los años 50 del siglo pasado y a partir de ese momento se sucedieron una serie de acontecimientos como se muestra en el Cuadro 1. En dicho cuadro se muestran fechas y hechos importantes ocurridos durante la historia del desarrollo de la biotecnología.

Los orígenes del cultivo *in vitro* se atribuyen a los intentos realizados por Gottlieb Haberlandt (1902) quien al cultivar células aisladas de plantas, postuló el

principio de la totipotencia de la célula vegetal indicando que todas las células de la planta tienen la capacidad de regenerar plantas completas, principio que constituye la base teórica en la que se sustentan las técnicas del cultivo *in vitro* (Gómez, 1998). El cultivo *in vitro* se define como el cultivo de órganos, tejidos y células aisladas de plantas superiores en un medio de cultivo nutritivo y específico para cada tipo de planta y bajo condiciones ambientales controladas (Ibarra y Guevara 2009).

La totipotencia fue demostrada por primera vez por Steward *et al.* (1958) cuando desarrollaron plantas de zanahoria a partir de células aisladas. La totipotencia, en la práctica se demuestra al utilizar los tejidos juveniles así como los menos diferenciados de la planta, lo que ha sido demostrado por Ammirato (1989) y Pierick (1990). A mediados del siglo pasado se regeneraron plantas a partir de callos, mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* (Reinert, 1958 y Steward *et al.*, 1958) y posteriormente se demostró que estos embriones somáticos se originaban a partir de células aisladas, que mostraban la capacidad de la totipotencia de las células vegetales (Gómez, 1998).

Knudson (1922) demostró que es posible la germinación de semillas de orquídeas de *Cattleya* y *Epidendrum* en un medio estéril que contenía sales minerales y azúcar y el primero en cultivar tejidos vegetales con éxito fue White en 1934, quien logró cultivar ápices de raíces de jitomate en medios con sales y azúcar enriquecidos con extracto de levadura. Mediante embriogénesis somática se desarrollan plantas a partir de las células somáticas (Kessel, 2012) y, en este proceso, ocurre la diferenciación celular mediante la cual, a partir de una célula indiferenciada que se multiplica, se regeneran células que se van diferenciando y especializando en las diversas funciones

del organismo hasta constituir una planta. La diferenciación durante el desarrollo se produce varias veces en un organismo multicelular ya que el organismo cambia de un simple cigoto a un sistema complejo de tejidos y tipos de células. La desdiferenciación celular es el proceso mediante el cual las células adultas vivas, aunque hayan alcanzado la especialización y estabilidad fisiológica, pueden recobrar el estado y actividad de una célula meristemática cuando son adecuadamente estimuladas.

Cuadro 1. Fechas importantes en la historia del cultivo de tejidos vegetales (1902-2012)

Año	Autor(es)	Contribución
1902	G. Haberlandt	Primer intento de cultivo de tejidos vegetales a partir de células aisladas, sobre un medio artificial.
1904	Hanning	Primer intento de cultivo de embriones de algunas especies de crucíferas
1909	Kuster	Fusión de protoplastos vegetales, aunque el producto fue incapaz de sobrevivir
1922	W. J. Robbins y W. Kotte	Cultivo <i>in vitro</i> de ápices de raíz (cultivo de órganos) durante períodos cortos
1922	Knudson	Germinación de semillas de orquídea <i>in vitro</i> de manera asimbiótica
1926	Went	Descubrió el ácido indol acético, primera hormona de crecimiento de la planta descubierta
1934	P. R. White	Cultivo de raíces de tomate a largo plazo adicionándole al medio vitamina B
1939	R. J. Gautheret y P. Nobecourt	Primer cultivo de tejidos vegetales (callo) a largo plazo, a partir de tejido de cambium de zanahoria
1939	P. R. White	Cultivo de callo de tejido tumoral de tabaco del híbrido interespecífico de <i>Nicotina glaucum</i> X <i>N. longsdorffi</i>
1941	J. Van Overbeek	Descubrimiento del valor nutricional del endospermo líquido del coco, para el cultivo de embriones de zanahoria
1942	P. R. White y A. C. Braun	Experimentos en corola-agalla y la formación de tumores en las plantas, crecimiento de tejidos corola-agalla sin bacterias
1946	Ball	Primeras plantas completas de <i>Lupinus</i> y <i>Tropaeolum</i> a partir de ápices de tallo
1948	A. Caplan y F. C. Stewart	Uso de agua de coco además de 2,4-D, para la proliferación de cultivo de tejidos de zanahoria y papa
1950	G. Morel	Cultivo de tejidos de monocotiledóneas usando agua de coco
1953	W. H. Muir	Primero en aislar células individuales a partir de tejidos de callo

1953	W. Tulecke	Obtención de callo haploide de polen de gimnosperma (<i>Ginkgo biloba</i>)
1955	C. O. Miller, F. Skoog <i>et al.</i>	Descubrimiento de la cinetina, hormona para división celular
1955	E. Ball	Cultivo de tejido de gimnosperma (sequoia)
1957	F. Skoog and C. O. Miller	Descubrimiento de la regulación de la formación de órganos (raíces y vástagos), variando la proporción citocinina/auxina en el medio de cultivo
1959	Reinert y Steward	Regeneración de proembriones a partir de agregados de callo y suspensión de células de <i>Daucus carota</i>
1960	E. C. Cocking	Degradación enzimática de la pared celular para la obtención de protoplastos en grandes cantidades
1960	G. Morel	Desarrollo de la técnica de cultivo del brote del ápice
1960	Bergmann	Filtración de suspensiones celulares y aislamiento de células por plaqueo
1962	Murashige y Skoog	Desarrollaron el medio de cultivo Murashige y Skoog para el cultivo de tejidos vegetales, con mayor concentración de sales
1962	Kanta y Maheshwari	Demostró que en algunas especies de Papaveráceas los granos de polen tenían la capacidad de germinar <i>in vitro</i>
1964	G. Morel	Propagación vegetativa de orquídeas mediante el cultivo de meristemos
1966	Steward	Demuestra experimentalmente la totipotencia mediante la regeneración de plantas de zanahoria a partir de células individuales
1966	S. G. Guha y S. C. Maheshwari	Cultivo de anteras y polen produciendo embriones haploides en <i>Datura</i>
1970	Smith y Nathans	Primera enzima de restricción descubierta en <i>Haemophilus influenza</i> (HindIII)
1970	Baltimore	La transcriptasa inversa del virus de ARN aislada de tumores de pollo y ratón
1972	Carlson	Hibridación interespecífica, por fusión de protoplastos, en dos especies de <i>Nicotiana</i>
1972	Berg	Primer ADN recombinante producido, mediante la combinación de virus SV40 y virus λ
1974	J. P. Nitsch	Cultivo de microsporas de <i>Datura</i> y <i>Nicotina</i> , para duplicar el número de cromosomas para generar semillas de plantas diploides homocigóticos en únicamente cinco meses
1974	Zaenen <i>et al.</i>	Descubrieron que el plásmido-Ti es el principal inductor de tumores de <i>Agrobacterium</i>
1975	O'Farrel	Desarrolló el sistema de electroforesis en gel de dos dimensiones con alta resolución
1977	Chilton <i>et al.</i>	Integración con éxito, del ADN del plásmido-Ti, de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , en plantas
1977	Sanger y Maxam-Gilbert	Establecieron la tecnología para la secuenciación de ADN
1978	G. Melchers	Producción de hibridación somática de tomate y papa

1980	Zambryski	Estructura detallada de las secuencias y el borde de ADN-T
1983	K. A. Barton <i>et al.</i>	La inserción de genes extraños unidos a vectores plasmídicos en protoplastos de vegetales
1983	M. D. Chilton	Producción de plantas de tabaco después de la transformación de células individuales o la inserción de genes
1983	Kary Mullis	Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de ADN.
1984	Horsh <i>et al.</i>	Infección y transformación de discos de hoja con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , y regeneración de plantas transformadas
1987	Klien <i>et al.</i>	Biolística, método de transferencia génica desarrollado para la transformación de plantas
1995	Fleischmann <i>et al.</i>	Secuenciación del genoma de <i>Haemophilus influenzae</i>
1997	Blattner <i>et al.</i>	Secuenciación del genoma de <i>E. coli</i>
2001	Venter <i>et al.</i>	Secuenciación del genoma humano
2005	Buell Robin <i>et al.</i>	Secuenciación del genoma del arroz
2010	Dong <i>et al.</i>	El desarrollo y la evaluación de la suspensión de células individuales a partir de trigo y cebada como un sistema modelo, un primer paso hacia la aplicación de la genómica funcional
2010	Rukavtsova <i>et al.</i>	Uso del ARN de interferencia para la ingeniería metabólica de las plantas.
2011	Hoshino <i>et al.</i>	Cultivo <i>in vitro</i> de endospermo y su aplicación en el mejoramiento de las plantas basado en la poliploidía
2011	Meybodi <i>et al.</i>	Aplicación de la electroterapia para la eliminación de potivirus de papa.
2012	Cai <i>et al.</i>	Exudación: técnica en expansión para la producción continua de metabolitos secundarios de plantas a partir de cultivo en suspensión

Fuente: Bhojwani y Dantu (2013)

Conforme a lo indicado, el desarrollo de la célula vegetal *in vitro* puede ser dirigido con base en las proporciones, la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento en el medio, generándose dos respuestas:

Desdiferenciación celular acompañada de multiplicación y crecimiento de células indiferenciadas a callos.

Rediferenciación. Los callos, bajo las condiciones adecuadas, son capaces de generar órganos y plantas mediante organogénesis o embriogénesis somática.

Los tejidos u órganos de la planta utilizados para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, pueden estar asociados a poblaciones de microorganismos, principalmente hongos y bacterias, que pueden ser difíciles de eliminar mediante los procedimientos rutinarios de desinfección superficial y, por tal razón es necesario: 1. Seleccionar las partes más limpias de la planta (tejidos u órganos) evitando utilizar las que estén en contacto con el suelo y 2. Evaluar los productos utilizados para desinfectar así como los procedimientos de desinfección que permitan el establecimiento de los tejidos en el medio de cultivo para la regeneración y la propagación masiva de dicha planta.

Cuanto más joven e indiferenciado se encuentre el tejido a cultivar, más fácil será la inducción del proceso de diferenciación *in vitro* y la micropropagación tiene mayores posibilidades de lograrse. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies.

El tamaño del explante se debe considerar, un explante grande puede favorecer la proliferación de callo, producir mayor heterogeneidad y contaminación por patógenos; el tamaño mínimo, puede no dar la respuesta deseada (Roca y Mroginski, 1993).

En este trabajo, de manera preliminar, se ha caracterizado a un grupo de plantas de nardo que han sido propagadas a partir de cormos sometidos a un proceso de

inducción de mutaciones con rayos gamma; sin embargo, ha estado orientado a determinar los mejores métodos para la regeneración *in vitro* de plantas a partir de tejidos y órganos de la planta de las cuales en la actualidad se carece de este conocimiento.

Hipótesis general

El concepto de totipotencia de Haberlandt (1902), indica que de toda célula vegetal, es factible la regeneración de la planta, la condición de desarrollo o grado de especialización de la célula del tejido foliar, de botón, del corno así como de la yema vegetativa de la vara floral de *P. tuberosa* L. puede interferir o modificar dicho postulado de Haberlandt.

Brotos desarrollados *in vitro* pueden regenerar raíz *in vitro* o en la etapa de aclimatación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características de *P. tuberosa* L.

El género *Polianthes* es endémico de México y desde tiempos prehispánicos fue cultivado por los aztecas, por lo que se reconoce al centro de México como su lugar de origen. Se cultiva en las zonas templadas y tropicales del mundo y es importante a nivel científico, económico, y cultural (Solano y Patricia, 2007). Entre sus especies se encuentra *P. tuberosa* L., conocida con el nombre común de nardo, considerada como planta de ornato e importante para la industria farmacéutica y del perfume debido a que presentan alta producción de metabolitos secundarios y compuestos de valor comercial (Gonzatti 1981, Sangavai y Chellapandi 2008).

P. tuberosa L. es una planta herbácea, perenne, de hojas verdes, largas, delgadas, y con brillo, que se encuentran concentradas en la base de la inflorescencia. Las flores son blancas aunque algunas variedades presentan ligeros tonos amarillos o rosados y suelen ocupar más de un tercio de la inflorescencia distribuidas en numerosas parejas que forman una espiga. La inflorescencia suele medir más de un metro de altura es conocido con el nombre común de flor de hueso, margarita olorosa o vara de San José (Espinosa *et al.*, 2009). Su multiplicación se lleva a cabo a partir de los cormos; sin embargo los cormos generan grupos de bulbillos de los que directamente se obtienen los cultivos, la vida de florero es de siete a 10 días (Shillo, 1992). El número haploide de cromosomas es de 30, de los cuales cinco son grandes y 25 pequeños, en el conjunto diploide, dos pares de cromosomas se asocian con la organización de núcleo (Singh, 2006).

En el género *Polianthes* existen 15 especies y tres variedades de dos cultivares de plantas ornamentales nativas de México, de la familia Agavaceae. *P. tuberosa* L. es la única especie cultivada para flor cortada en áreas tropicales y subtropicales. El cultivo del nardo es utilizado en la industria de la floricultura en países como México, China, India, Nueva Zelanda y Taiwán. (Barba-Gonzalez *et al.*, 2012).

2.2 Cultivo *in vitro* de *P. tuberosa* L.

Información específica de la regeneración *in vitro* de plantas de *P. tuberosa* L. es escasa. Sangavai y Chellapandi (2008) desarrollaron métodos de propagación pero únicamente lograron regenerar brotes. Con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D se logró el mayor porcentaje de inducción de callos proembriogénicos a partir de botones y tépalos (100 y 52.3 % respectivamente) en un periodo de tiempo de 1.5 a 2 meses, respectivamente. Cultivos proembriogénicos verdes (20 por cultivo) se pudieron obtener en un medio de cultivo con 1 mg L⁻¹ de BA (Estrada, 2010). La inducción de brotes a partir de cormos se logró en un medio de cultivo con 3 mg L⁻¹ de BAP (93 %) suplementado con 3 % de sacarosa y, al subcultivar los brotes regenerados en un medio de cultivo MS suplementado con 2.5 mg L⁻¹ de BAP, 0.5 mg L⁻¹ de ANA y 0.1 mg L⁻¹ de cinetina, se incrementó la longitud de los brotes (Naz *et al.*, 2012).

La regeneración de callos *in vitro* de *P. tuberosa* L. se ha logrado a partir de explantes de tépalos (Otsuji *et al.*, 1994) y la obtención de brotes a partir de secciones de cormo (Sangavai y Chellapandi, 2008); ambos métodos aplicados principalmente para la producción de metabolitos secundarios. A partir de cultivos *in vitro* de explantes de tépalos de nardo también se han obtenido metabolitos secundarios (Otsuji *et al.*, 1994) y la finalidad no ha sido la propagación de plantas. En la India fueron irradiados

cormos de *P. tuberosa* L. y se determinó que la dosis óptima es de 2 Krad que equivaldría a 20 Gy (Younis y Borham, 1975; Abraham y Desai, 1976). En México se estudió el efecto de las radiaciones gamma de ^{60}Co en cormos de *P. tuberosa* L. y se determinó que la DL_{50} es de 23.8 Gy y la DL_{100} es de 37.5 Gy y en este trabajo se identificaron 14 posibles mutantes en la primera propagación vegetativa (Escalante, 2003).

2.3 Cultivo *in vitro* de agaváceas

Existen varios trabajos de propagación *in vitro* de otras agaváceas como en semillas de *Yucca aloifolia* (Karpov, 2004), *Y. valida* (Arce-Montoya *et al.*, 2006), hoja y yema apical en *Agave tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006; Portillo *et al.*, 2007; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008), hoja en *A. sisalana* (Hazra *et al.*, 2002; Nikam *et al.*, 2003), yemas axilares y apicales en *A. victoriae-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008), semillas y yema apical en *A. oscura* (Domínguez *et al.*, 2008; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008), ápices, cotiledón y hoja en *A. vera-cruz* (Tejavathi *et al.*, 2007), semillas en *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii* y *A. potatorum* (Domínguez *et al.*, 2008), yema apical en *A. duranguensis*, *A. pigmaea* y *A. salmiana* sp. *crassispina* (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008) y yemas axilares y el tejido del tallo en *A. inaequidens* (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008).

2.4 Inducción de mutaciones

Mediante la inducción de mutaciones se ha contribuido significativamente al mejoramiento genético de plantas ornamentales y se ha obtenido un alto porcentaje de mutantes con modificaciones en el color de flor, tamaño de hojas y pétalos, tamaño y

arquitectura de las plantas (más de 50 % de los mutantes generados ha sido con radiaciones gamma). En la base de datos de variedades mutantes de la Organización para la Agricultura y Alimentación-Agencia Internacional de Energía Atómica (FAO-IAEA) oficialmente se han liberado y registrado aproximadamente 3200 variedades en más de 200 variedades de especies de plantas. En consecuencia, la mutagénesis inducida juega un papel importante en el mejoramiento genético de los cultivos pues en la base de datos de la FAO-IAEA, aproximadamente 142 cultivares mutantes y 25 variedades fueron registradas en 2011 (Lagoda, 2012).

En nardo, los cormos se han irradiado con siete dosis de radiación gamma ^{60}Co (0 a 30 Gy), con intervalos de 5 Gy entre tratamientos. De los cormos irradiados se establecieron los cultivos *in vitro*, en el medio de Murashige y Skoog, con 1 mg L⁻¹ de BA y 0.5 mg L⁻¹ de ANA y los cormos restantes se sembraron en una mezcla de sustrato (suelo, tierra de hojas y tezontle en la proporción de 1:1:1). Las plantas de nardo sembradas en sustrato irradiadas con dosis altas disminuyeron su desarrollo, presentando hojas deformes, brotes arrosados y mayor variación en el largo y ancho de las hojas, comparadas con las plantas no irradiadas. Las plantas de nardo procedentes de brotes *in vitro* aclimatados presentaron la DL₅₀ (9.09 Gy) menor a la de los cormos establecidos *in vivo* (25.91 Gy) y la dosis de 30 Gy fue letal para todas las plantas después de cinco meses de cultivo (Estrada-Basaldua *et al.*, 2011).

CAPITULO II

REGENERACIÓN DE BROTES *in vitro* DE *Polianthes tuberosa* L. A PARTIR DE BOTÓN FLORAL Y DE TEJIDO FOLIAR

RESUMEN

El nardo (*Polianthes tuberosa* L.) es una planta endémica de México, la importancia de este cultivo radica en que es utilizada como flor de corte y en la industria farmacéutica y del perfume. Es peculiar que presenta poca variabilidad genética, en parte porque es propagada vegetativamente, por lo que es necesario incrementar la variabilidad genética de esta especie para contribuir el desarrollo de nuevas variedades. El presente estudio plantea la utilización de la biotecnología para la regeneración masiva de plántulas de *P. tuberosa* L. Un segmento de la base del botón de aproximadamente 3 mm de grueso fue colocado (cinco segmentos por frasco) sobre la superficie del medio de cultivo. Segmentos de hoja madura de aproximadamente 1 cm² fueron colocados (cuatro segmentos por frascos) en el medio de cultivo, base GC que contiene (todas las cantidades relacionadas con los medios se expresan por litro) agua de coco, 50 mL, agar 6.4 g y el pH ajustado a 5.7. Con este medio básico se preparó una serie de medios de cultivo que contenían bencil amino purina (BAP), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), tidiazuron (TDZ) y cinetina, así como sacarosa (10, 20 y 30 g). La regeneración de brotes a partir de tejido de botón se logró en mayor porcentaje (3.5 %) en los explantes cultivados en el medio sólido que contenía BAP, 4.5 mg y ANA, 0.1 mg y en menor porcentaje (1.1 %) en el medio con BAP, 2.0 mg y ANA, 0.5 mg, dos brotes se observaron en un explante cultivado en el medio con BAP, 4.5 mg y ANA, 0.05 mg, ambos medios con 20 g de sacarosa. Los brotes generados a partir de explantes de tejidos de botón, desarrollaron raíz en un medio que contiene 1.0 mg de ácido indol

butírico y 0.1 mg de BAP. En los cultivos de tejido foliar se logró la regeneración de callo verde en mayor porcentaje (50.9 %) en el medio sólido con 4.5 mg de BAP, 0.05 mg de ANA y 20 g de sacarosa. Cabe resaltar la importancia de poder lograr la regeneración *in vitro* de plantas de nardo a partir de limbo foliar, como de yemas axilares de la hoja y botón para poder rescatar mutantes somáticos que se observan en las plantas, ya sean mutaciones generadas de manera espontánea o inducida.

Palabras Clave: Regeneración de plántulas, variabilidad genética, medio de cultivo, hormonas.

Abstract

Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) is a plant endemic to Mexico, being grown for its use either as a cut flower or in the pharmaceutical and perfume industry. This specie has reduced genetic variability due in part to its propagation that is vegetative. In consequence is necessary to increase the genetic variability of this species to promote the development of new varieties. This paper examines the use of biotechnology for massive regeneration of plantlets of *P. tuberosa* L. A segment from the base of the button of approximately three mm thickness was placed (five segments per flask) on the surface of the culture media. Leaf segments were placed approximately 1 cm² (four segments per flask) in the culture media. GC base containing (all amounts related to the medium are expressed per liter) coconut water, 50 mL, 6.4 g agar, pH adjusted to 5.7 This medium was prepared with a series of culture media containing benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole acid-acid (IAA), thidiazuron (TDZ) and kinetin and sucrose (10, 20 and 30 g). Highest percentage of regeneration of buds (3.5%) was achieved having button as initial

explants, in medium 2 2 and a smaller percentage (1.1%) in medium 1 2, two buds were observed in a cultured explant on the medium 8 2 A. Buds from root developed into button in a medium containing indole butyric acid, 1.0 mg and BAP, 0.1 mg. In cultures of leaf tissue regeneration was achieved as green callus in a percentage of 50.9 % on a solid medium with BAP, 4.5 mg, NAA, 0.05 mg and 20 g of sucrose. It is important to highlight the importance of achieving *in vitro* plant regeneration of tuberose from both leaf and axillary bud and leaf button to rescue somatic mutants observed in plant mutations generated also spontaneously or induced.

Keywords: Regeneration of plantlets, genetic variability, medium, hormones.

I. INTRODUCCIÓN

Existe la tecnología para inducir cambios fenotípicos en las plantas de ornato y así generar nuevas variedades con modificaciones tanto morfológicas como en el color y fragancia de las flores o bien relacionados con la tolerancia de los cultivos a condiciones adversas bióticas y abióticas (Evans *et al.*, 2011; Rout *et al.*, 1999). Debe indicarse que la expresión de las mutaciones somáticas puede perpetuarse mediante la regeneración de plantas a partir de los tejidos u órganos modificados.

El nardo es una planta endémica de México que rutinariamente se propaga vegetativamente, utilizando los cormos que se producen a partir de yemas situadas en la base de estructuras caulinares (Shillo, 1992). La importancia de este cultivo radica en que es utilizada como flor de corte así como en la industria farmacéutica y del perfume. Es peculiar que presenta poca variabilidad genética, en parte porque es propagada vegetativamente, por lo que es necesario aumentar la diversidad genética de esta especie para contribuir al desarrollo de nuevas variedades.

Para el desarrollo de la horticultura y la industria farmacéutica, la estrategia del empleo de las técnicas de mutagénesis y de cultivo de tejidos como auxiliares de los métodos tradicionales del mejoramiento de plantas, es esencial para obtener los resultados deseados más rápidamente (Rodríguez, 2013).

La regeneración de brotes de nardo *in vitro* a partir de segmentos de corno es el procedimiento más común (Muralidhar y Mehta, 1982; Bose *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 2000; Rajasekharan *et al.*, 2000; Nazneen *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2006; Sangavai y

Chellapandi, 2008; Gajbhiye *et al.*, 2011; Naz *et al.*, 2012) y con esta parte de la planta, el principal obstáculo para el establecimiento de los cultivos *in vitro* es la contaminación. La regeneración de plantas a partir de segmentos de ápices (Hutchinson *et al.*, 2004), discos de hoja (Bindhani *et al.*, 2004), raíz (Narayanswamy y Prabhudesai, 1979) y anteras (Gi y Tsay, 1989) ha presentado mayor grado de dificultad y los resultados obtenidos en estas investigaciones son moderados. Beyrami *et al.* (2008) regeneraron plantas a partir de tejido de cormo, callos de anteras y hojas. En la India, Kadam *et al.* (2010) intentaron la propagación *in vitro* de plantas de *P. tuberosa* L., utilizando un medio MS que contiene 6.0 mg de BAP, 0.5 mg de ANA, 0.7 mg de 2,4-D y 0.5 mg de TDZ para lograr la obtención de brotes a partir de tejido de tépalos (4.0 %) y de botones florales (4.33 %). En Taiwan, Shen *et al.* (1991) intentaron la micropropagación de *P. tuberosa* L., con un medio MS modificado que contiene 2.25 mg de BAP y 0.5 mg de ANA, lograron la obtención de brotes a partir de tejidos de botón. Otsuji *et al.* (1994) interesados en la obtención de polisacáridos de nardo, obtuvieron la regeneración de callo a partir de segmentos de tejido de tépalos, en cultivos en suspensión. De acuerdo a la revisión de literatura, únicamente dos grupos de investigadores, Kadam *et al.* (2010) y Shen *et al.* (1991) han logrado la regeneración de brotes de nardo a partir de tejidos de la flor y, por lo tanto, el presente estudio se realizó con el objetivo de regenerar plántulas de nardo plenamente desarrolladas a partir de tejido foliar y de botones, mediante la utilización de la biotecnología.

Hipótesis

El concepto de totipotencia de Haberlandt (1902), indica que de toda célula vegetal, es factible la regeneración de la planta.

La condición de desarrollo o grado de especialización de la célula del tejido foliar y de botón floral de *P. tuberosa* L. puede interferir o modificar dicho postulado de Haberlandt.

Brotes desarrollados *in vitro* pueden regenerar raíz *in vitro* o en la etapa de aclimatación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del IREGEP-Genética del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

2.2 Material biológico

Botones de inflorescencia provenientes de la Central de Abastos de la Ciudad de México Delegación Iztapalapa y del mercado local de Texcoco, Edo. de México y hojas maduras que provenían de plantas de *Polianthes tuberosa* L. cultivadas en invernadero

2.3 Medios de cultivo

El medio de cultivo base GC (Guillermo Carrillo, comunicación personal) conformado por las sales inorgánicas del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y (todas las cantidades relacionadas con los medios se expresan por litro) agua de coco, 50 mL, agar 6.4 g, con el pH ajustado a 5.7 con un potenciómetro Sargent-Welch modelo LS. Con este medio básico se preparó una serie de medios de cultivo que contenían BAP, ANA, 2,4-D, AIA, TDZ y cinetina así como sacarosa (10, 20 y 30 g) en las condiciones que se describen en el Cuadro 1.

Los medios, preparados en forma líquida y sólida, fueron servidos (20 mL) en frascos de 100 mL de capacidad. La esterilización del medio se realizó en autoclave, durante 15 minutos y 1.05 kg/cm² de presión.

Cuadro 1. Clave y composición de los medios de cultivo GC utilizados para la inducción de brotes de nardo (*P. tuberosa* L.) a partir de tejido foliar y de botones florales. Las cantidades se expresan por litro de medio.

Clave	BAP mg	2,4-D mg	ANA mg	TDZ Mg	AIA mg	Cinetina mg	AIB mg	Sacarosa g
4 1 L	1.25	0.12						10
4 1	1.25	0.12						10
1 2	2.00		0.50					20
1 2 D	1.00		0.25					20
1 2 D ₂₀	0.40		0.10					20
2 2	4.50		0.10					20
2 2 D	2.25		0.05					20
2 2 D ₂₀	0.90		0.02					20
3 2	2.00	0.70	0.50	0.50				20
4 2 L	1.25	0.12						20
4 2	1.25	0.12						20
4 2 D	0.62	0.06						20
4 2 D ₂₀	0.25	0.03						20
4 2 AIB	0.10						1.00	20
5 2	1.00		0.20					20
5 2 D	0.50		0.10					20
5 2 D ₂₀	0.20		0.04					20
6 2					4.00	2.60		20
6 2 D					2.00	1.30		20
6 2 D ₂₀					0.80	0.52		20
7 2 A	2.00		0.25					20
7 2 B	1.00		0.50					20
8 2 A	4.50		0.05					20
8 2 B	2.25		0.10					20
4 3 L	1.25	0.12						30
4 3	1.25	0.12						30

Los medios que terminan con la letra L son de constitución líquida y los demás de constitución sólida.

2.4 Establecimiento

En la Figura 1 se observa el tamaño y aspecto de los botones florales en diferente nivel de crecimiento, los más pequeños que median aproximadamente 2 cm. fueron los más utilizados, así como tejido foliar sin daño mecánico de plantas de nardo sanas. Este material se desinfectó superficialmente mediante un lavado con agua y

detergente, para posteriormente sumergirlos en alcohol 70 % y después en solución antibacterial (1.3 % v/v) en agua destilada durante dos minutos en cada solución, finalmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial 40 % v/v (6 % de cloro activo) durante 15 minutos.



Figura 1. Tamaño y aspecto de los botones florales en diferente nivel de crecimiento de nardo.

Posteriormente, en la campana de flujo laminar se retiró la solución de hipoclorito de sodio para enjuagar los explantes cuatro veces con agua destilada estéril.

Un segmento de la base de cada botón de aproximadamente 3 mm de grueso fue colocado (cinco segmentos por frasco) sobre la superficie del medio de cultivo sólido y liquido del tratamiento respectivo (Cuadro 1) así mismo, segmentos de hoja de aproximadamente 1 cm² fueron colocados (cuatro segmentos por frascos) en cada medio de cultivo sólido.

Los explantes se incubaron a 26 - 29 °C de temperatura y fotoperiodo de 16 horas (luz blanca fría fluorescente de 75 W) y radiación fotosintéticamente activa de 45 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Cada mes los cultivos fueron evaluados y subcultivados en medio de cultivo fresco durante un periodo de cuatro meses, a menos de que se indique otra cosa en los resultados.

2.5 Diseño experimental

Los explantes se distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, a los 30 y hasta los 120 días después de la siembra se registraron el porcentaje de las variables: contaminación, desarrollo de callo, desarrollo de tépalos, número de brotes, promedio de brotes por explante, total de brotes, raíz, cultivos sin desarrollo, desarrollo de proembriones.

2.6 Análisis estadístico

Un análisis de varianza para cada una de las variables registradas fue realizado con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) versión 9.0. Se utilizó el procedimiento ANOVA para el análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tipos de desarrollo en los cultivos de *P. tuberosa* L.

3.1.1 Desarrollo de brotes

La regeneración de brotes a partir de tejido de botón se logró en 120 días en 3.5, 2.5, y en 1.1 % de los cultivos desarrollados en los medios con clave 2 2, 8 2 A y 1 2, respectivamente (Cuadro 2 y (Figura 2), en los que únicamente se presentan los resultados de los cultivos que mostraron algún tipo de desarrollo en los medios indicados. El resto de los cultivos establecidos en otros medios de cultivo no tuvieron un desarrollo sostenido y finalmente se degradaron y murieron. Dos brotes se regeneraron en un explante que fue cultivado en el medio 8 2 A. Debe indicarse que el desarrollo de los brotes que dieron origen a las pequeñas plántulas se observó en el tejido del pedicelo floral, lo cual ocurrió a los dos meses de establecidos los cultivos. Al presente, no existe información acerca de la regeneración de brotes a partir de explantes de botón floral en variedades mexicanas; sin embargo, Kadam *et al.* (2010) en India, lograron la regeneración de brotes a partir de tépalos (4.0 %) así como de botón (4.33 %) en el medio MS que contenía BAP, 6.0 mg; ANA, 0.5 mg; 2,4 D, 0.7 mg y TDZ, 0.5 mg. Por su parte, Shen *et al.* (1991) en Taiwan, lograron la regeneración de brotes a partir de botón en el medio MS modificado que contenía BAP, 2.25 mg y ANA, 0.5 mg. En la investigación presente, la mayor formación de brotes se observó en medios con porcentajes relativamente altos de BAP (4.5 mg) y bajos de la auxina ANA (0.1 mg). En estudios que se han realizado consideran que el regulador de crecimiento BAP es importante en la propagación *in vitro* de *P. tuberosa* L. (Naz *et al.*, 2012). Vargas y

García (1995) también encontraron pequeños brotes en *Spathiphyllum* sp (cala blanca) en presencia de 10 mg de BAP y de ANA.

Cuadro 2. Respuesta de los explantes de tejido de botón de *P. tuberosa* L. al ser cultivados en el medio de cultivo GC con los reguladores de crecimiento indicados. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Cultivos con desarrollo de:				
	Tépalo	Raíz	Brotes	Número de brotes por cultivo	Total de brotes
1 2	36.2 \pm 0.5 b	6.6 \pm 0.6 ab	1.1 \pm 0.5 ab	1.0	1
1 2 D	17.7 \pm 0.0 cd	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
2 2	40.0 \pm 0.6 a	0.0 \pm 0.0 d	3.5 \pm 0.0 a	1.0	4
2 2 D	17.4 \pm 0.8 c	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
3 2	0.0 \pm 0.5 e	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
7 2 A	18.3 \pm 0.0 c	2.6 \pm 0.5 cd	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
7 2 B	15.8 \pm 0.5 cd	6.6 \pm 0.8 ab	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
8 2 A	25.0 \pm 0.6 b	1.7 \pm 0.6 cd	2.5 \pm 1.0 ab	1.5	4
8 2 B	24.2 \pm 0.5 b	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
4 2	0.0 \pm 0.0 e	4.2 \pm 0.0 bcd	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
5 2	13.9 \pm 0.8 cd	4.3 \pm 0.5 abc	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0
6 2	11.7 \pm 0.6 d	7.5 \pm 0.5 a	0.0 \pm 0.0 b	0.0	0

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$ $n=60$.

3.1.2 Cultivos con desarrollo de raíz

En los cultivos obtenidos a partir de botón se observó el desarrollo de raíces en 7.5, 6.6 y 6.6 % de ellos, al cultivarse en los medios 6 2, 1 2 y 7 2 B, respectivamente y, con menor porcentaje en los medios 5 2, 4 2, 7 2 A y 8 2 A (Cuadro 2).

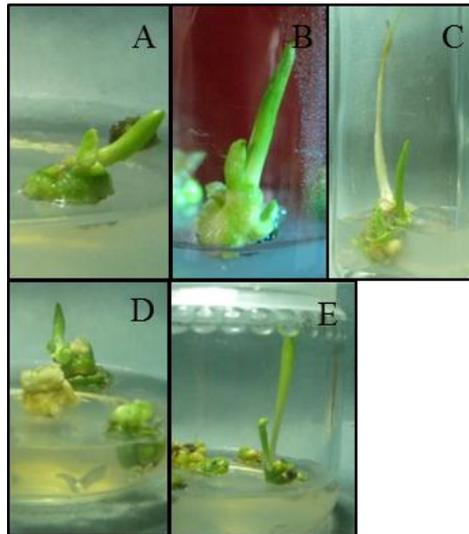


Figura 2. Regeneración de brotes en los cultivos de botón de *P. tuberosa* L. A), B) y C) Cultivos desarrollados en el medio 2.2 durante uno, dos y cuatro meses de incubación, respectivamente. D) y E) Cultivos desarrollados en el medio 8.2 A, al mes y tres meses de incubación respectivamente. Las fotografías no están en la misma escala.

3.1.3 Desarrollo de plantas

Los brotes que se regeneraron en los medios indicados en el Cuadro 2, no generaron raíces en el periodo de incubación de cuatro meses pero al cambiarlos al medio de cultivo 4.2 AIB, se logró que se iniciara el desarrollo de raíces en un periodo adicional de incubación de un mes

3.1.4 Cultivos con desarrollo de tejidos de tépalos

El crecimiento de los tépalos de los cultivos de botón se observó en casi todos los medios (hasta 40 % en el medio 2.2) de los explantes cultivados y crecieron hasta siete veces aproximadamente el tamaño del explante original (Figura 3 A) en siete

periodos consecutivos de cultivo, posteriormente se marchitaron y se degeneraron (Cuadro 2).

3.1.5 Cultivos con desarrollo de callo

El desarrollo de callo en los tejidos de botón, fue aparente al mes de establecidos los cultivos, se observó en todos los cultivos pero en mayor proporción (39.0 %) en los explantes cultivados en el medio 4 2 y en el medio 3 2 (22.5 %) (Cuadro 3). Los callos tuvieron tonalidades de color verde y en algunos, se generaron sobre su superficie estructuras proembriónicas (Figuras 3 B y 3 C); sin embargo, esto no pudo comprobarse debido a que al ser subcultivados se transformaron gradualmente en callo. El desarrollo de proembriones se observó en mayor grado en cultivos desarrollados en los medios 4 2 (15.8 %) y 2 2 (13.9 %) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Nivel de contaminación y tipo de desarrollo observado en los cultivos de *P. tuberosa* L. generados a partir de explantes de botón. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Contaminación	Cultivos sin desarrollo	Cultivos con desarrollo de:	
			Proembriones	Callo
1 2	24.2 \pm 1.0 ab	42.9 \pm 1.3 e	2.2 \pm 0.6 cd	11.0 \pm 0.6 d
12 D	25.0 \pm 0.6 a	64.4 \pm 0.6 cd	1.1 \pm 0.5 d	16.7 \pm 0.5 cd
2 2	4.2 \pm 0.5 c	33.9 \pm 0.5 e	13.9 \pm 0.8 a	8.7 \pm 0.6 d
2 2 D	4.1 \pm 0.5 c	65.2 \pm 1.3 b	8.7 \pm 0.6 b	8.7 \pm 0.6 d
3 2	7.5 \pm 0.5 c	77.5 \pm 0.6 b	0.0 \pm 0.0 d	22.5 \pm 0.5 b
7 2 A	4.1 \pm 0.5 b	64.3 \pm 1.0 b	6.1 \pm 0.5 bc	8.6 \pm 0.6 d
7 2 B	0.0 \pm 0.0 d	54.2 \pm 1.0 bcd	10.0 \pm 0.8 ab	13.3 \pm 0.0 c
8 2 A	0.0 \pm 0.0 d	47.5 \pm 0.5 d	7.5 \pm 0.5 b	15.8 \pm 0.5 c
8 2 B	0.0 \pm 0.0 d	50.8 \pm 0.5 cd	10.0 \pm 0.8 ab	15.0 \pm 1.0 c
4 2	20.8 \pm 0.5 b	41.1 \pm 1.0 f	15.8 \pm 0.5 bc	39.0 \pm 0.5 a
5 2	4.2 \pm 0.5 c	59.1 \pm 1.8 bc	8.7 \pm 0.5 b	13.9 \pm 0.8 c
6 2	0.0 \pm 0.0 d	77.5 \pm 1.3 a	1.7 \pm 0.6 cd	1.7 \pm 0.6 e

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$ $n=60$

Los explantes establecidos en el medio 3 2, generaron callo (22.5 %) cuya apariencia fue muy peculiar ya que, a diferencia de los callos que se desarrollaron en los otros medios indicados en el Cuadro 3, éstos fueron de color blanco marfil (Figura 3 D) y además, en estos callos nunca se observó el desarrollo de estructuras proembrionicas.

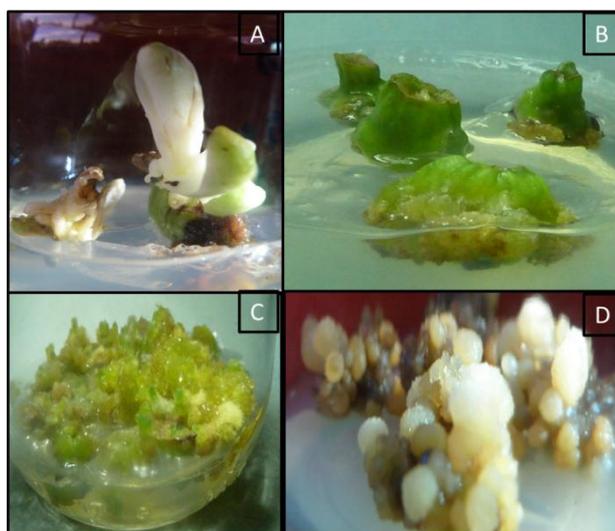


Figura 3. Aspecto de diferente tipo de desarrollo en los cultivos generados a partir de explantes de tejido de botón de *P. tuberosa* L. A) Desarrollo de tépalos en el medio 2 2 a los dos meses de cultivo, B) Desarrollo de callo verde en el medio 4 2 al mes de cultivo, C) Desarrollo de proembriones en el medio 4 2 a los cuatro meses de cultivo, y D) Desarrollo de callo color blanco marfil en el medio 3 2 al mes de cultivo.

El desarrollo de callos en los medios de consistencia líquida y sólida con diferentes concentraciones de sacarosa se presenta en el Cuadro 4 y Figura 4. Por lo general lo que se observó en los medios líquidos fue parecido a lo que se observa en los cultivos correspondientes de los medios solidos aunque con un grado de desarrollo mucho menor.

La respuesta obtenida por Otsuji *et al.* (1994) contrasta con los resultados obtenidos en esta investigación ya que ellos obtienen callo a partir de tépalos de *P. tuberosa* L. en el medio MS que contenía altas concentraciones (2.61 y 2.25 mg) de 2,4 D.

Cuadro 4. Nivel de contaminación y respuesta de los cultivos de botón de *P. tuberosa* L. al cultivarse en medios de consistencia líquida y sólida con 1, 2 y 3 % de sacarosa. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Contaminación	cultivos sin desarrollo	cultivos con desarrollo:	
			Proembriones	Callo
4 1 L	12.5 \pm 0.5 b	82.9 \pm 1.7 a	2.9 \pm 0.5 a	14.3 \pm 0.9 b
4 2 L	16.7 \pm 0.8 ab	73.0 \pm 2.8 abc	5.0 \pm 0.5 a	22.0 \pm 1.3 ab
4 3 L	18.3 \pm 0.6 ab	82.7 \pm 2.2 ab	1.0 \pm 0.5 a	16.3 \pm 0.8 b
4 1	15.8 \pm 0.5 ab	74.3 \pm 1.3 abc	4.0 \pm 0.0 a	21.3 \pm 1.3 ab
4 2	20.8 \pm 0.5 a	64.2 \pm 1.0 c	2.1 \pm 0.6 a	33.7 \pm 1.4 a
4 3	15.0 \pm 0.6 ab	66.7 \pm 2.4 bc	2.9 \pm 0.5 a	30.4 \pm 1.0 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$ n=30.

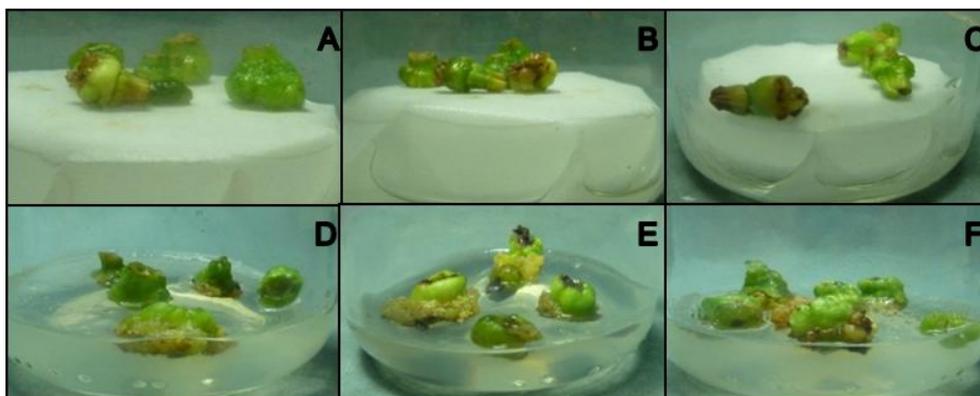


Figura 4. Aspecto de los cultivos de botón de *P. tuberosa* L. A), B) y C) Desarrollados en los medios líquidos 4 1 L, 4 2 L y 4 3 L y D), E) y F) Desarrollados en los medios de constitución sólida (hilera inferior de fotos). Todos ellos muestran desarrollo de callo.

3.1.6 Cultivos de explantes de tejido foliar

Como se muestra en el Cuadro 5, no se logró la regeneración de brotes a partir de tejido de hojas maduras que provenían de plantas cultivadas en invernadero. En cambio, en todos los medios se generó callo, resaltando esta respuesta en los cultivos desarrollados en los medios 8 2 A (50.9 %) y 1 2 D (40.3 %). El desarrollo de estructuras proembriónicas también fue observado en estos cultivos, en mayor porcentaje en los cultivos desarrollados en los medios 1 2 (11.5), 2 2 (8.8) y en menor proporción en los medios 8 2 A y 1 2 D (Cuadro 5 y Figura 5).

Cuadro 5. Nivel de contaminación y respuesta de los cultivos generados a partir de explantes de tejido foliar de *P. tuberosa* L. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Contaminación	Tejido sin desarrollo	Tejido con desarrollo:	
			Proembriones	Callo
1 2	35.0 \pm 1.2 ab	69.2 \pm 0.8 bcd	11.5 \pm 0.6 a	19.2 \pm 0.6 cd
1 2 D	22.5 \pm 0.6 cd	56.5 \pm 1.0 cd	3.2 \pm 0.6 ab	40.3 \pm 0.5 a
2 2	15.0 \pm 0.0 d	66.2 \pm 0.5 ab	8.8 \pm 1.0 a	25.0 \pm 1.0 b
2 2 D	31.3 \pm 1.3 bc	70.9 \pm 1.0 abc	0.0 \pm 0.0 b	29.1 \pm 0.8 bc
7 2 A	31.3 \pm 1.4 bc	52.7 \pm 0.5 de	0.0 \pm 0.0 b	47.3 \pm 0.6 a
7 2 B	40.0 \pm 0.8 ab	66.7 \pm 0.8 cde	0.0 \pm 0.0 b	33.3 \pm 0.8 bc
8 2 A	33.8 \pm 1.0 ab	45.3 \pm 0.0 e	3.8 \pm 0.6 ab	50.9 \pm 0.5 a
8 2 B	40.0 \pm 0.8 ab	81.3 \pm 1.0 abc	0.0 \pm 0.0 b	18.8 \pm 0.5 d
4 2	38.8 \pm 1.0 ab	81.6 \pm 1.8 abc	0.0 \pm 0.0 b	18.4 \pm 0.5 d
5 2	42.5 \pm 1.3 a	100.0 \pm 0.6 a	0.0 \pm 0.0 b	0.0 \pm 0.0 e
6 2	22.5 \pm 0.6 cd	75.8 \pm 1.3 a	0.0 \pm 0.0 b	24.2 \pm 1.0 bcd

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$ $n=44$

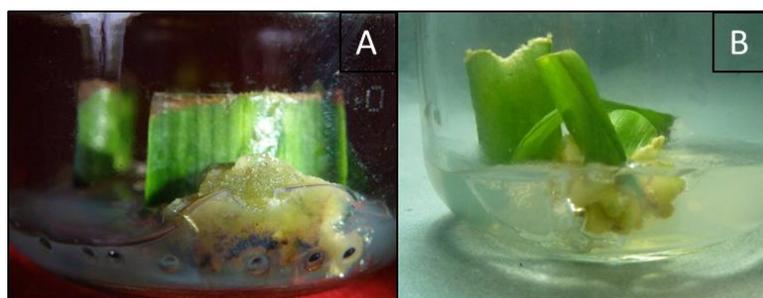


Figura 5. A) Aspecto de regeneración de callo a partir de tejido foliar en el medio 4 2 a los dos meses de cultivo y B) Aspecto de proembriones a partir de tejido foliar en el medio 1 2 a los dos meses de cultivo.

Esta investigación se llevó a cabo para generar plántulas de nardo a partir de tejido de botón floral y de hoja. Las hojas utilizadas, plenamente desarrolladas, provenían de plantas cultivadas en invernadero y el botón se considera que también es un órgano altamente diferenciado de la planta, se obtuvo de varas florales adquiridas en la Central de Abastos de la Ciudad de México, Delegación Iztapalapa, y en el mercado local de Texcoco, Edo. de México. Como ya se ha indicado, Beyrami *et al.* (2008) no lograron la regeneración *in vitro* de plantas de nardo a partir de anteras ni de tejido foliar y, de manera específica, estos resultados únicamente se pueden discutir con los obtenidos por Kadam *et al.* (2010), de India y del grupo de Shen *et al.* (1991), de Taiwán. En las dos investigaciones, los brotes fueron regenerados en medios de cultivo de constitución sólida, encontrándose diferencias en el número de reguladores de crecimiento incluidos en los medios de cultivo. En ese trabajo, los medios contenían únicamente dos fitohormonas, BAP y ANA; logrando regenerar un total de 8 brotes en tres medios de cultivo (Cuadro 2). La regeneración de brotes en mayor porcentaje se logró en el medio (2 2) que contenía 4.5 mg de BAP y 0.1 mg de ANA, Kadam *et al.* (2010), utilizaron el medio MS con 6 mg de BAP, 0.5 mg de ANA, 0.7 mg de 2,4 D, y 0.5 mg de TDZ. Como se observa, ese medio tiene un porcentaje más alto de los

reguladores que se usaron en este estudio ya que los otros autores aplicaron dos reguladores de crecimiento más, el 2,4-D y TDZ, siendo por tanto, el costo del medio de cultivo mayor para la regeneración de plántulas a partir de botón y tépalos. Shen *et al.* (1991) en una comunicación preliminar, logran la regeneración de plantas en el medio MS modificado que contenía 2.25 mg de BAP y 0.5 mg de ANA, aplicando la citocinina en menor cantidad y auxina en concentración mayor. Se considera que los autores no siguieron con la investigación ya que no se encuentran los resultados en trabajos formales publicados, hasta la fecha. Los resultados obtenidos en esta investigación pueden considerarse como preliminares y se están determinando las condiciones experimentales para regenerar una gran cantidad de plántulas a partir de cada cultivo. A la fecha, se tienen detectados aspectos del procedimiento que pueden mejorarse para incrementar notablemente la eficiencia del método de propagación como: a). Ajustar la concentración de los reguladores de crecimiento BAP y ANA. b). El proceso de desinfección de las muestras de botón debe modificarse para evitar el daño que le causan las sustancias utilizadas durante este proceso y, con respecto a la hoja, c). Se debe utilizar tejido foliar de hojas inmaduras ya que el resultado negativo obtenido se puede atribuir a que las hojas utilizadas estaban lignificadas. En estudios realizados con *Stevia rebaudiana* Bessalho *et al.* (1993) utilizaron hojas jóvenes y lograron embriones somáticos en forma directa.

Es necesario resaltar la importancia de lograr la regeneración *in vitro* de plantas de nardo a partir tanto de hoja, como de yemas axilares de la hoja y botón para poder rescatar mutantes somáticas que se observan en las plantas ya sean éstas mutaciones generadas de manera espontánea o inducida. Debido a que el nardo es propagado de manera comercial a partir de cormo, el grado de variabilidad que presenta es muy

restringido. En general, se puede afirmar que la mayoría de los cultivos económicamente importantes son, desde el punto de vista genético muy uniformes, porque son originados a partir de unas cuantas líneas puras y, en consecuencia, son altamente vulnerables a la acción de los agentes bióticos y abióticos adversos. En particular el cultivo de nardo es producto de clones con características bien definidas y además, la propagación se lleva a cabo de manera vegetativa, prácticamente en ausencia de recombinación genética por lo que este cultivo al ser atacado por algún agente biótico o abiótico adverso tiene mayores posibilidades de ser destruido.

Este trabajo constituye una parte metodológica importante que permitirá implementar un procedimiento altamente eficiente de regeneración de plantas de nardo que acoplado a un procedimiento eficiente de inducción de mutaciones se podrían generar fenotipos con cambios en la coloración, forma, tamaño y perfume de la flor, tamaño de la planta, morfología y pigmentación de las hojas, grado de tolerancia a los factores bióticos y abióticos más comunes en este cultivo. En otras palabras, está en marcha todo un proceso para revolucionar el cultivo de nardo.

IV. CONCLUSIONES

Se logró la regeneración de plantas de nardo a partir de explantes de tejido de botón.

Aunque se tienen detectados los aspectos metodológicos que deben modificarse (Ajustar la concentración de los reguladores de crecimiento BAP y ANA. El proceso de desinfección de las muestras de botón y tejido foliar debe modificarse para evitar el daño que le causan las sustancias utilizadas durante el proceso de desinfección) para lograr con éxito la propagación eficiente de planta de nardo.

El desarrollo de proembriones en tejido foliar se logró la mejor respuesta con la concentración de 4.5 mg de BAP y 0.1 mg de ANA.

V. LITERATURA CITADA

- Bespalhok F J C, J C Hashimoto, J Minoru, L C E Vieira (1993)** Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal 5 (1): 51-53.
- Beyrami Z E, P Azadi, A Safari, M R Shafii, S Sadeqi (2008)** Study on somaclonal variation in *Polianthes tuberosa* *in vitro* culture. The National Ornamental Plant Research Station, Mahallat (Iran) 30724: 102.
- Bindhani B K, A K Dalal, B Behara (2004)** Role of auxins for callus induction and chromosomal variation in *Polianthes tuberosa* L. 'Single'. International Journal of Genetics and plant Breeding 64 (2): 173-174.
- Bose T K, B K Jana, S Moulik (1987)** A note on the micropropagation of tuberose from scale stems section. Indian Journal of Horticultura 44: 100-101.
- Evans D A, W R Sharp, C E Flick (2011)** Plant Regeneration from Cell Cultures. J Jules, J Wiley, USA. Horticultural Reviews (3): 214-314.
- Gajbhiye S S, M K Tripathi, M S Vidya, M Singh, B S Baghel, S Tiwari (2011)** Direct shoot organogenesis from cultured stem disc explants of tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). Journal of Agricultural Technology 7(3): 695-709.
- Gi H S, H S Tsay (1989)** Anther culture and somaclonal variation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Journal of Agricultural Research China 38: 346-352.
- Hutchinson M J, R Onamu, S Obukosia (2004)** Effect of Thidiazuron, Benzylaminopurine and Naphthalene Acetic acid on *In vitro* propagation of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. Journal of Agriculture, Science and Technology 6 (1): 48-59.

- Kadam G B, K P Singh, A K Singh, R Jyothi (2010)** *In vitro* regeneration of tuberose through petals and immature flower buds. Indian Journal of Horticulture 67 (1):73-75.
- Khan N H, N Zaidi, S Jabeen, J Iqbal (2000)** Micropropagation potential of *Polianthes tuberosa* L bulbs, scales and leaves. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 43 (2): 118-122.
- Mishra A, R K Pandey, R K Gupta (2006)** Micropropagation of tuberose (*Polianthus tuberosa* L.) cv. Calcattia double. Progressive Horticulture 37: 226-236.
- Muralidhar C E, A R Mehta (1982)** Clonal propagation of three ornamental plants through tissue Culture methods. Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo 693-694 pp.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiologiy Plantarum 15: 473-497.
- Narayanswamy S, V R Prabhudesai (1979)** Somatic Pseudoembryogeny in tissue cultures of tuberose (*Polianthes tuberosa*). Indian Journal of Experimental Biology, 17: 873-875.
- Naz S, F Aslam, S Ilyas, K Shahzadi, A Tariq (2012)** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). Journal of Medicinal Plants Research 6 (24): 4107-4112.
- Nazneen S, M Jabeen, I Ilahi (2003)** Micropropagation of *Polianthes tuberosa* through callus formation. Pakistan Journal Botany 35 (1): 17-25.
- Otsuji K, Y Honda, Y Sugimura, A Takei (1994)** Production of polysaccharides in liquid cultures of *Polianthes tuberosa* cells. Biotechnology Letters 16 (9): 943-948.
- Rajasekharan V, K Haripriya, S Arumugam, A Shakila (2000)** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Abstract published in Centennial

conference on spices and aromatic plants: challenges and opportunities in the new century. pp 86-88.

Rodríguez C D (2013) Biotecnología y producción agroalimentaria. Problemas del Desarrollo 19 (74): 19-20.

Rout G R, S Samantaray, J Mottley, P Das (1999) Biotechnology of the rose: a review of recent progress. Scientia Horticulturae 81: 201-228.

Sangavai C, P Chellapandi (2008) *In vitro* Propagation of a Tuberose Plant (*Polianthes tuberosa* L.). Electronic Journal of Biology 4 (3): 98-101.

Shen T M, R D Cowen, M M Meyer (1991) *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Horticultural Science 26 (6): 756-756.

Shillo R (1992) The cuber community holds the answer to flowering problems in *Polianthes*. Acta Horticulturae 325: 139-364.

Statistical Analysis System (2002) Institute Inc. SAS/STAT. User's Guide. Versión 9.0. Cary, N. C.

Vargas E T y E García (1995) Propagación *in vitro* de cala blanca *Spathiphyllum* sp. Agronomía Tropical 47 (2): 171-183.

CAPITULO III

REGENERACIÓN *in vitro* DE BROTES DE *Polianthes tuberosa* L. A PARTIR DE YEMAS VEGETATIVAS DE LA INFLORESCENCIA Y DE TEJIDO DE CORMO

RESUMEN

Polianthes tuberosa L. es una planta endémica de México, comercialmente se cultiva para flor de corte, y, además, es utilizada en la industria farmacéutica y del perfume. De manera práctica, los productores la propagan utilizando los cormos, lo que ha ocasionado que el cultivo presente poca variabilidad genética y, posiblemente por esta razón solo se conoce flores blancas. El objetivo de la presente investigación ha sido desarrollar una metodología práctica y económica para la regeneración de plántulas a partir de yemas vegetativas de la inflorescencia y cormo. Las yemas y pequeños segmentos de tejido de cormo fueron colocadas sobre la superficie del medio de cultivo, base GC con las sales inorgánicas del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) que contiene (todas las cantidades relacionadas con los medios se expresan por litro) agua de coco 50 mL, sacarosa 20 g, agar 6.4 g y el pH ajustado a 5.7. Con este medio básico se prepararon medios de cultivo que contenían bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), y cinetina. La formación de brotes que dieron origen a las plántulas ocurrió mediante, la regeneración directo de la yema la cual al crecer forma sólo una plántula y a partir del tejido de la base de la yema, de esta región se obtuvieron hasta seis brotes por yema en el medio que contiene BAP, 4.5 mg y ANA, 0.1 mg, medio del cual la regeneración de brotes fue mayor (56.1 %). En el caso de cormo el problema fue la contaminación llegando en algunos casos hasta el 100 % de los cultivos. Es de resaltar la importancia de poder lograr la regeneración masiva *in vitro* de plantas de nardo a

partir de yemas florales, que le da la posibilidad de recuperar mutantes espontáneos o inducidos.

Palabras Clave: Eficiencia de la regeneración, *in vitro*, contaminación, yema.

Abstract

Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) is a plant endemic to Mexico, commercially grown for cut flower, and is also used in pharmaceutical and perfume industries. Practically, producers propagate this plant using corms, being this cause of the present little genetic variability in the crop and possibly for this reason only white flowers are known. The objective of this research was to develop a practical and economical method for the regeneration of plantlets from vegetative of the inflorescence and corm. Small buds and corm tissue segments were placed on the surface of the culture medium base GC, containing inorganic salts of Murashige and Skoog (1962) and also having (all media related quantities are expressed per liter) coconut water, 50 mL, 20 g sucrose, 6.4 g agar, being the pH adjusted to 5.7. With this basic medium were prepared a series of culture media containing benzylaminopurine (BAP), naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole acetic acid (IAA), and kinetin. The shoot formation that gave rise to small plantlets occurred through the direct regeneration of the bud which to grow a plantlets arising only from base of the bud From this region were obtained up to six buds in medium containing BAP, 4.5 mg and NAA, 0.1 mg, being the regeneration of buds higher (56.1%). Corm if the contamination problem was in some cases up to 100% of the cultures. It is important to highlight the importance of achieving massive regeneration *in vitro* tuberose plant from flower bud that gives the possibility to recover spontaneous or induced mutants.

Keywords: Regeneration efficiency, *in vitro*, contamination, bud.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación que se ha llevado a cabo en el cultivo de *Polianthes tuberosa* L. (nardo) se ha enfocado principalmente hacia los aspectos de la regeneración de plantas, así como en resolver los problemas fitosanitarios tales como el ataque de hongos y de bacterias; sin embargo, en el aspecto de mejoramiento genético, se considera que muy poco se ha realizado hasta el presente. La regeneración de plántulas por medio de las técnicas de cultivo de tejidos, permite el manejo de un gran número de individuos por lo que la propagación de los genotipos seleccionados se hace en un reducido espacio, bajo condiciones libres de patógenos y en un corto tiempo (Ahloowalia, 1995).

La actividad básica en el mejoramiento de plantas consiste en la creación de variabilidad genética y selección de individuos con características deseables y superiores (Schum, 2003).

P. tuberosa L., endémica de México, comercialmente se cultiva para flor de corte, pero también es utilizada en la industria farmacéutica y del perfume. De manera práctica, los productores la propagan utilizando los cormos, lo que ha ocasionado que el cultivo presente poca variabilidad genética en el color de la flor, solo se conoce flores blancas. Existen pocos trabajos acerca de la propagación *in vitro* en esta especie y, el cormo, es la parte de la planta comúnmente utilizada en estas investigaciones porque la inducción *in vitro* de la regeneración de plantas se logra relativamente fácil (Muralidhar y Mehta, 1982, Bose *et al.*, 1987, Khan *et al.*, 2000, Rajasekharan *et al.*, 2000, Nazneen *et al.*, 2003, Mishra *et al.*, 2006, Sangavai y Chellapandi, 2008, Gajbhiye *et al.*, 2011, Naz *et al.*, 2012) pero cuando es utilizado este órgano se presentan problemas de

contaminación que pueden reducir drásticamente la eficiencia de este proceso. También muy pocos investigadores han intentado, como se muestra en la lista de referencias, la regeneración de plantas a partir de segmentos de ápices (Hutchinson *et al.*, 2004), hoja (Bindhani *et al.*, 2004, Beyrami *et al.*, (2008), raíz (Narayanswamy y Prabhudesai, 1979), botón floral (Kadam *et al.*, 2010) y anteras (Gi y Tsay, 1989) sin éxito o con escasos resultados.

De acuerdo a la revisión de literatura, no existe información acerca de la propagación de nardo *in vitro* utilizando las yemas vegetativas de la inflorescencia.

Es factible obtener nuevas variedades con características sobresalientes si se aplican técnicas altamente eficientes y prácticas de propagación *in vitro* y los métodos de mutagénesis convencionales por lo que, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar una metodología práctica y económica para la regeneración de plántulas a partir de las yemas vegetativas de la inflorescencia y de corno.

Hipótesis

El concepto de totipotencia de Haberlandt (1902), indica que de toda célula vegetal, es factible la regeneración de la planta.

Las condiciones de desarrollo o grado de especialización de las células de tejido del corno así como de las yemas vegetativas de la parte inferior de la inflorescencia de nardo que se encuentra en plena floración permiten regenerar plántulas de nardo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del IREGEP-Genética del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

2.2 Material biológico

Yemas vegetativas de la vara floral de *Polianthes tuberosa* L. fueron obtenidos de flores provenientes de la Central de Abastos de la Ciudad de México, Delegación Iztapalapa y en el mercado local de Texcoco, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, mientras que los cormos de la selección San Andrés fueron obtenidos de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán.

2.3 Medios de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo base GC (Guillermo Carrillo, comunicación personal) que contiene sales inorgánicas del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y (todas las cantidades relacionadas con los medios se expresan por litro) agua de coco 50 mL, sacarosa 20 g, agar 6.4 g con el pH ajustado a 5.7 con un potenciómetro Sargent-Welch modelo LS. Con este medio básico fueron preparados una serie de

medios de cultivo que contenían BAP, ANA, 2,4-D, AIA y cinetina, según se describe en el Cuadro 1.

Los medios fueron servidos (20 mL) en frascos de 100 mL de capacidad. La esterilización del medio se realizó en autoclave, durante 15 minutos y 1.05 kg/cm² de presión.

Cuadro 1. Clave y composición de los medios de cultivo GC utilizados para la inducción de brotes de *P. tuberosa* L. a partir de yema vegetativa y cormo.

Las cantidades se expresan por litro de medio.

Clave	BAP mg	2,4-D mg	ANA Mg	AIA mg	Cinetina mg	AIB mg
1 2	2.00		0.50			
2 2	4.50		0.10			
4 2	1.25	0.12				
4 2 AIB	0.10					1.00
5 2	1.00		0.20			
6 2				4.00	2.60	
7 2 A	2.00		0.25			
7 2 B	1.00		0.50			
8 2 A	4.50		0.05			
8 2 B	2.25		0.10			

2.4 Establecimiento

Yemas vegetativas de la inflorescencia y cormos fueron seleccionados sin daño mecánico de plantas sanas de nardo, las yemas se obtuvieron realizando cortes transversales en los nudos, con un bisturí se retiró la hoja modificada (bráctea) que cubre la yema, posteriormente los extremos de los segmentos de la inflorescencia fueron sellados con parafina fundida (Figura 1). Este material se desinfectó superficialmente mediante un lavado con agua y detergente, para sumergirlos en alcohol 70 %, después

en solución antibacterial (1.3 % v/v) en agua destilada durante dos minutos en cada solución, finalmente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 50, 60 y 70 % para yemas y 70 % para corno v/v (6 % de cloro activo) durante 15 minutos.



Figura 1. Aspecto de una yema axilar de la inflorescencia de nardo (*P. tuberosa* L.)

Posteriormente, en la campana de flujo laminar se retiró la solución de hipoclorito de sodio para enjuagar los explantes cuatro veces con agua destilada estéril.

Las yemas fueron cuidadosamente separadas del tallo, con la menor cantidad posible de tejido de tallo y colocadas (cuatro por frasco) sobre la superficie del medio de cultivo. Así mismo, pequeños segmentos de tejido de corno 0.5 cm de longitud fueron colocados (cuatro por frasco) sobre la superficie del medio de cultivo.

Los explantes se incubaron a 26 - 29 °C de temperatura y fotoperiodo de 16 horas (luz blanca fría fluorescente de 75 W) y radiación fotosintéticamente activa de 45 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Cada mes los cultivos fueron evaluados y subcultivados en medio de cultivo fresco durante un periodo de cuatro meses.

2.5 Diseño experimental

Los frasco con explantes se distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, a los 30 y hasta los 120 días después de la siembra se registraron el porcentaje de las variables: contaminación, desarrollo de callo, desarrollo de brotes, promedio de brotes por cultivo, total de brotes, brotes con desarrollo de hojas y cultivos sin desarrollo.

2.6 Análisis estadístico

Un análisis de varianza para cada una de las variables registradas fue realizado con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) versión 9.0. Se utilizó el procedimiento ANOVA para el análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para comparación de medias.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Contaminación en yemas vegetativas de *P. tuberosa* L.

Con la finalidad de reducir el problema de contaminación, las yemas fueron expuestas a las soluciones de 50, 60 y 70 % v/v de hipoclorito de sodio, en el proceso de desinfección y, como se esperaba, el mayor porcentaje de cultivos contaminados se presentó en las yemas tratadas con la solución de 50 % hipoclorito y la menor contaminación en los cultivos de yemas tratadas con la solución de 70 % (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contaminación observada en el cultivo *in vitro* a partir de yemas vegetativas de *P. tuberosa* L. al ser expuestos a las soluciones de hipoclorito de sodio indicadas. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.

Hipoclorito de sodio (%)	Yemas contaminadas	Yemas sin contaminación
50	31.0 \pm 1.0	69 \pm 2.08
60	24.4 \pm 1.7	75.6 \pm 1.5
70	19.0 \pm 1.3	81.0 \pm 1.9

n= 12.

3.2 Tipos de desarrollo en los cultivos de *P. tuberosa* L.

3.2.1 Cultivos con desarrollo de brotes y plántulas a partir de yemas vegetativas

La regeneración de brotes promedio se logró al mes de establecidas las yemas vegetativas en los medios con clave 2 2, 8 2 A, 1 2 y 7 2 B (56, 22, 17 y 17 %, respectivamente) y, lo interesante que ocurrió en las yemas cultivadas en el medio 2 2

fue que se obtuvo más de un brote por yema (Cuadro 3, Figura 2). Los brotes que se regeneraron en los medios indicados en el Cuadro 3 no generaron raíces en el periodo de incubación de cuatro meses pero al cambiarlos al medio de cultivo 4 2 AIB, se logró que se iniciara el desarrollo de raíces en un periodo adicional de incubación de un mes.

Cuadro 3. Tipo de desarrollo observado en los cultivos generados a partir de explantes de yema vegetativa de *P. tuberosa* L. Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Total de brotes	Promedio de brotes por cultivo
1 2	16.7 \pm 0.7 bc	1.2
2 2	56.1 \pm 0.7 a	2.1
4 2	0.0 \pm 0.0 d	0.0
5 2	0.0 \pm 0.0 d	0.0
6 2	11.9 \pm 0.0 c	1.1
7 2 A	13.8 \pm 0.7 bc	1.0
7 2 B	16.7 \pm 0.7 bc	1.2
8 2 A	21.9 \pm 1.4 b	1.1
8 2 B	15.2 \pm 0.0 bc	1.0

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$ $n=36$.

En comparación se puede citar el caso de la propagación de plantas a partir de yemas de la inflorescencia de la orquídea *Phalaenopsis* (David y Bala 2012), en donde en la base del pedúnculo no existen, rudimentos visibles de yemas, en la región media, se encuentran las yemas vegetativas con cierto grado de turgencia de las cuales es factible regenerar plantas y, hacia la región apical, las yemas reproductivas generan las flores. Se consideran que este mismo fenómeno se presentó al utilizar la vara floral de nardo para obtener plántulas.

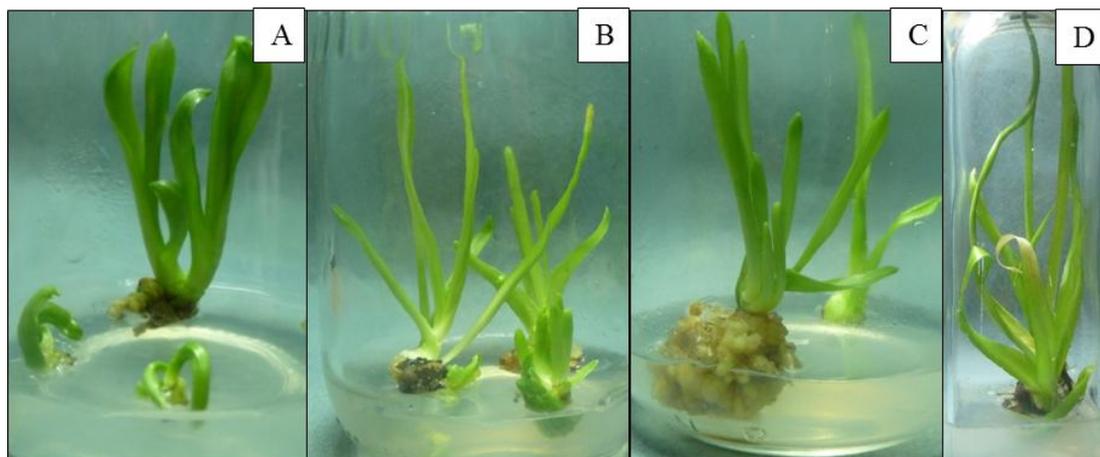


Figura 2. A) Brotes generados de la base de la yema vegetativa de *P. tuberosa L.* a los dos meses. B) A los tres meses de cultivo con nuevos brotes. C) Cultivos con estructuras de proembriones en la base de la yema a los tres meses de cultivo y D) Plántula con brotes nuevos generados directamente del tejido de la base de la plántula a los cuatro meses de cultivo.

El desarrollo de los brotes que dieron origen a las pequeñas plántulas ocurrió mediante: a) El crecimiento directo de la yema la cual se expresó como una plántula (Figura 3) y b) A partir del tejido de la base de la yema, región que estaba en contacto con el medio de cultivo de donde, se generaron plántulas (Figura 2). En un caso, de esta región se obtuvieron hasta seis brotes en la última evaluación; al transcurrir dos meses se generaron más brotes, y otras ocho yemas produjeron cada una cuatro brotes, al ser cultivadas en el medio 2 2 (Figura 3). Esto quiere decir que el desarrollo de las plántulas que se generan a partir del tejido de la base de la yema es diferente al primer caso y se originan muy posiblemente mediante un proceso de embriogénesis somática, porque en algunos cultivos aparecen estructuras proembriónicas (Figura 2 C).

En esta investigación, el mayor porcentaje de brotes se observó en medios con contenidos relativamente altos de BAP y bajos de la auxina ANA. En un estudio que se

ha realizado recientemente (Naz *et al.*, 2012). Consideran que el regulador de crecimiento BAP es importante en la propagación y multiplicación masiva *in vitro* de *P. tuberosa* L.

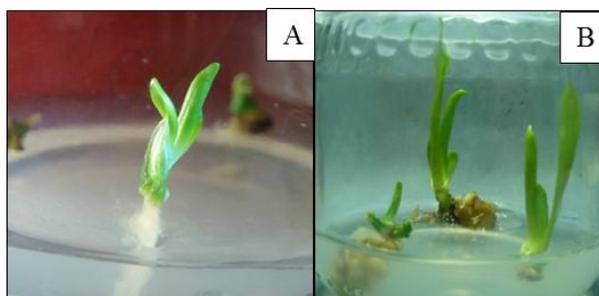


Figura 3. Aspecto de los brotes de *P. tuberosa* L. en el proceso de regeneración a partir de los cultivos de yema vegetativa de nardo en el medio 2 2. A) Brotes generados directamente de la yema de un mes. B) Brotes de dos meses de cultivo con la misma respuesta.

En los brotes generados de yema vegetativa en el medio 2 2, se observó el crecimiento de 4 hojas promedio por brote, en 59.2 % de plántulas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Respuesta de las yemas de *P. tuberosa* L. a los cuatro meses al ser cultivadas en el medio de cultivo GC con los reguladores de crecimiento indicados.

Los datos se expresan en % y \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Contaminación (%)	Explantes Sin desarrollo	Explantes con desarrollo Callo	Brotes con desarrollo de hojas
1 2	34.0 \pm 0.0 a	63.6 \pm 1.4 b	19.7 \pm 2.1 b	12.5 \pm 0.7 b
2 2	34.0 \pm 1.4 a	31.8 \pm 2.1 d	12.1 \pm 1.4 bc	59.2 \pm 4.2 a
4 2	32.0 \pm 1.4 a	47.1 \pm 1.4 c	52.9 \pm 1.4 a	0.0 \pm 0.0 d
5 2	34.0 \pm 1.4 a	57.6 \pm 0.0 bc	42.4 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 d
6 2	33.0 \pm 2.1 a	82.1 \pm 0.7 a	6.0 \pm 0.0 c	3.7 \pm 0.7 c
7 2 A	35.0 \pm 0.7 a	69.2 \pm 0.7 b	16.9 \pm 0.7 bc	3.9 \pm 1.4 c
7 2 B	34.0 \pm 0.0 a	63.6 \pm 1.4 b	19.7 \pm 2.1 bc	13.9 \pm 0.7 c
8 2 A	36.0 \pm 1.4 a	62.5 \pm 1.4 bc	15.6 \pm 1.4 bc	11.8 \pm 1.4 b
8 2 B	34.0 \pm 0.0 a	66.7 \pm 0.0 b	18.2 \pm 0.0 bc	3.9 \pm 1.4 c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$ $n=36$

3.2.2 Cultivos con desarrollo de callo

El desarrollo de callo en los cultivos de yemas vegetativas, fue aparente hasta los dos meses de establecidos los cultivos, se observó en todos los cultivos pero en mayor proporción 52.9 %, de los explantes cultivados en el medio 4 2 (BAP 1.25 mg y 2,4-D 0.12 mg) y en el medio 5 2 (42.4 % de los explantes) (BAP 1.0 mg y ANA 0.20 mg). (Cuadro 4).

Los callos mostraron tonalidades de color verde, en los medios de cultivo (4 2 y 5 2) se observó el desarrollo de estructuras proembriogénicas (Figura 4); sin que se lograra la regeneración de brotes e inclusive se transformaron en callo. Otsuji *et al.* (1994) generaron cultivos de callo a partir de segmentos de tejido de tépalo, en cultivos en suspensión en un medio MS con 2,4-D, (2.61 y 2.25 mg) para la obtención de polisacáridos de nardo. Sangavai y Chellapandi (2008) lograron el desarrollo de callo en cultivos de tejido de cormo (37.8 %), en el medio MS que contenía BAP, 0.5 mg y AIA, 3.0 mg.

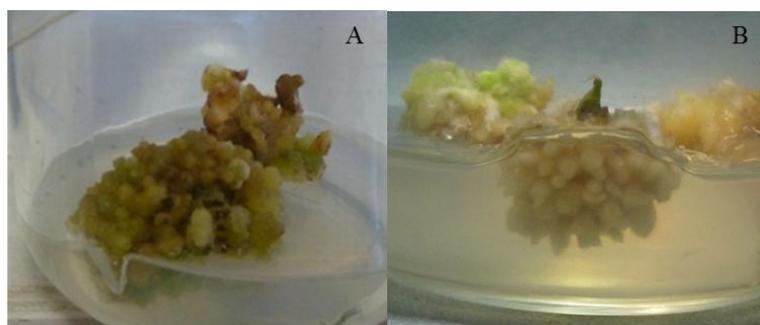


Figura 4. Aspecto del desarrollo de estructuras proembriogénicas generadas a partir de la base de la yema vegetativa de inflorescencia de *P. tuberosa* L. A) Medio 4 2 y B) Medio 5 2.

3.2.3 Cultivos desarrollados a partir de cormo

Hubo regeneración de brotes a partir de tejido de cormo en todos los medios de cultivo utilizados observando cambios a partir de una semana de establecidos. De acuerdo a las evaluaciones efectuadas desde un mes y hasta cuatro meses de cultivo, la regeneración de brotes se logró (10 %) en los medios 1 2 (BAP 2.0 mg y ANA 0.50 mg), 2 2 (BAP 4.50 mg y ANA 0.10 mg), 5 2 (BAP 1.0 mg y ANA 0.20 mg) y 8 2 A (BAP 4.50 mg y ANA 0.05 mg), seis brotes se obtuvieron en el medio 2 2 (Figura 5) (Cuadro 5).

Panigrahi y Saiyad (2013) lograron la regeneración de brotes a partir de cormos de *P. tuberosa* L. variedad *Calcutta Single* (3.5 ± 0.2) en el medio MS que contenía BAP y cinetina 0.2 mg.

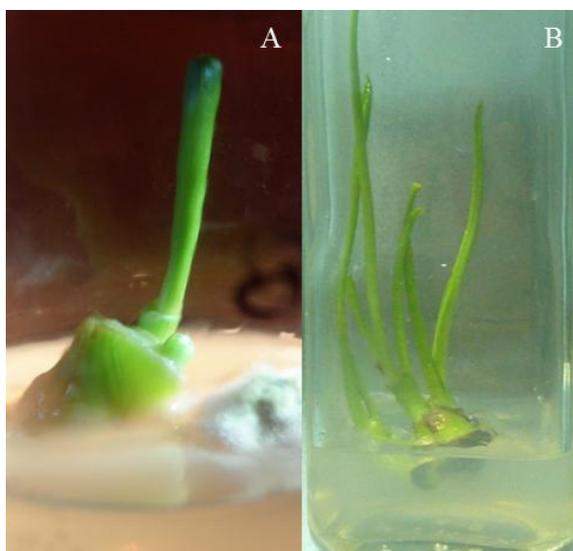


Figura 5. A) Aspecto de brotes de *P. tuberosa* L. de un mes de cultivo, desarrollados a partir de tejido de cormo a pesar de estar contaminado el cultivo. B) Aspecto de la plántula a partir de cormo a los cuatro meses de cultivo en el medio 2 2 (BAP 4.50 y ANA 0.10 mg).

Cuadro 5. Respuesta de los cultivos de tejido de cormo de *P. tuberosa* L. al cultivarse en el medio de cultivo GC con los reguladores de crecimiento indicados.

Medio de cultivo	Contaminación (%)	Promedio de brotes por cultivo (%)	Total de brotes (%)
1 2	90	1.0	3
2 2	90	2.0	6
4 2	100	0.0	0
5 2	90	1.5	5
6 2	100	0.0	0
7 2 A	100	0.0	0
7 2 B	100	0.0	0
8 2 A	90	1.0	3
8 2 B	100	0.0	0

n=36

Esta investigación se llevó a cabo para generar plantas de nardo a partir de las yemas vegetativas de la vara floral y de tejido de cormo. Los cormos utilizados, plenamente desarrollados, provenían de plantas cultivadas en invernadero y las yemas vegetativas utilizadas, se consideraron que también están altamente diferenciadas en la inflorescencia de la planta. En nardo la mayoría de las investigaciones se han realizado utilizando el tejido de cormo (Muralidhar y Mehta, 1982, Bose *et al.*, 1987, Shen *et al.*, 1991, Honda *et al.*, 1996, Khan *et al.*, 2000, Rajasekharan *et al.*, 2000, Nazneen *et al.*, 2003, Mishra *et al.*, 2006, Ahmad *et al.*, 2006, Beyrami *et al.*, 2008, Sangavai y Chellapandi, 2008, Jyothi *et al.*, 2008, Gajbhiye *et al.*, 2011, Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011, Naz *et al.*, 2012 y Panigrahi y Saiyad, 2013). Hasta el tiempo presente, no existen trabajos publicados en los que los investigadores hayan utilizado las yemas de la inflorescencia de la planta de nardo por lo que el presente trabajo es el primero que demuestra que es posible la obtención de plantas a partir de este órgano de la planta, cultivado en presencia de los reguladores de crecimiento BAP 4.5 mg y ANA 0.1 mg. En estas condiciones se han logrado regenerar un total de 139 brotes en seis medios de cultivo (1 2, 2 2, 7 2 A, 7 2 B, 8 2 A y 8 2 B) que contienen BAP y ANA, las cuales

están en fase de aclimatación. Otro aspecto importante de esta investigación radica en haber demostrado que la regeneración de plántulas se lleva a cabo mediante dos procesos biológicos diferentes: la transformación o desarrollo directo de la yema en plántula y por el proceso de diferenciación del tejido de la base de la yema en plántula, posiblemente mediante la expresión de embriogénesis somática. Este tema está considerado para abordarse y aclararse posteriormente.

La mayor regeneración de brotes se obtuvo en el medio 2 2 con el proceso de diferenciación del tejido de la base de la yema aun cuando el mayor número de cultivos que respondieron fue directamente de la yema, en el mismo medio (2 2). Kadam *et al.* (2010) en India, lograron la regeneración de brotes a partir de tépalos (4.0 %) así como de botón floral (4.33 %) en el medio MS que contenía BAP, 6.0 mg; ANA, 0.5 mg; 2,4 D, 0.7 mg y TDZ, 0.5 mg, con mayor número de reguladores de crecimiento, lo cual implica mayor costo para la regeneración de plántulas.

A la fecha, se tienen detectados aspectos del procedimiento que deben modificarse para incrementar notablemente la eficiencia del método de propagación como: a) El estudio de proporciones de los reguladores de crecimiento BAP y ANA en el medio de cultivo para conocer con precisión la condición experimental óptima para la regeneración masiva de plantas de manera económica y segura. b) Determinar la potencialidad de las yemas en este proceso, de acuerdo a su posición en la vara floral. C) Investigar la embriogénesis somática y en qué condiciones se presenta (yemas a diferente distancia de la vara floral). Es importante resaltar que se utilizó el tejido de corno en esta investigación para demostrar fundamentalmente dos aspectos importantes de esta tecnología. 1. El grave problema de contaminación, que reduce drásticamente la

eficiencia del método y, en este caso se esperaba encontrar el sistema de desinfección apropiado para hacer competitivo esta forma de producción de planta de nardo. 2. Demostrar la facilidad del proceso de propagación. La yema vegetativa es un órgano de la planta más limpio y libre de microorganismos por lo que el problema a corregir respecto a la contaminación fue relativamente más sencillo y se demostró que sometiendo a las yemas a soluciones de concentración de hipoclorito comercial, la contaminación se redujo aceptablemente. El problema que se ha resuelto es la propagación en sí. La gran importancia de esta investigación, después de haber resuelto parcialmente todos los problemas técnicos abordados, es poder aplicar esta tecnología para rescatar mutantes somáticos naturales o inducidos que puedan tener valor potencial en el cultivo de nardo o bien inducir mutaciones aplicando cualquier tecnología y, como complemento importante, la regeneración de planta con características importantes desde el punto de vista agronómico, florístico o industrial. Ese fue el objetivo fundamental ya que, en particular, el cultivo de nardo es el producto de clones con características bien definidas y muy estables, ya que el método de propagación que llevan a cabo los productores es la propagación vegetativa, prácticamente en ausencia de recombinación genética, por lo que este cultivo al ser atacado por algún agente biótico o abiótico adverso tiene mayores posibilidades de ser destruido. De lo anterior se deduce la importancia de la variabilidad genética, que debe ser mayor, en las nuevas variedades generadas de nardo.

En suma, este trabajo constituye una parte metodológica importante en el proceso de la búsqueda de nuevas formas y variedades de nardo que sean cultivadas con menos requerimientos, más vistosas para ornato y más atractivas en la industria de

perfumes. En otras palabras, está en marcha todo un proceso para revolucionar el cultivo de nardo.

IV. CONCLUSIONES

Se puede concluir que basados en la metodología expuesta se logró la regeneración de plantas de nardo a partir de explantes de yema vegetativa con mayor porcentaje (56 %) y de tejido de cormo en menor porcentaje (6 %).

La concentración de 4.5 mg de BAP y 0.1 mg de ANA produce una tendencia a un mayor número de brotes en la base de la yema vegetativa.

El método para la desinfección de explantes de nardo para el cultivo *in vitro* son insuficientes para los explantes procedentes de cormo, pero no para las yemas vegetativas.

V. LITERATURA CITADA

- Ahloowalia B (1995)** Induced mutation and molecular techniques for crop improvement (*in vitro* mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants). Agencia Internacional de Energía Atómica. Austria. 531-541.
- Ahmad M S, T Ahmad, N Zaidi, A I Nasir (2006)** High frequency *in vitro* propagation of *Polianthes tuberosa*. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 49 (5): 344-348.
- Beyrami Z E, P Azadi, A Safari, M R Shafii, S Sadeqi (2008)** Study on somoclonal variation in *Polianthes tuberosa in vitro* culture. The National Ornamental Plant Research Station, Mahallat (Iran) 30724: 102.
- Bindhani B K, A K Dalal, B Behara (2004)** Role of auxins for callus induction and chromosomal variation in *Polianthes tuberosa* L. 'Single'. International journal of Genetics and plant Breeding 64 (2): 173-174.
- Bose T K, B K Jana, S Moulik (1987)** A note on the micropropagation of tuberose from scale stems section. Indian Journal of Horticultura 44: 100-101.
- David R, M Bala (2012)** Preliminary results on the influence of growth hormones on the *in vitro* regeneration of *Phalaenopsis* flower stalks. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology 16 (4): 24-27.
- Estrada-Basaldua J A, M E Pedraza-Santos, E de la Cruz-Torres, A Martínez-Palacios, C Sáenz-Romero, J L Morales-García (2011)** Efecto de rayos gamma 60 Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3: 445-458.

- Gajbhiye S S, M K Tripathi, M S Vidya, M Singh, B S Baghel, S Tiwari (2011)** Direct shoot organogenesis from cultured stem disc explants of tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). Journal of Agricultural Technology 7(3): 695-709.
- Gi H S, H S Tsay (1989)** Anther culture and somaclonal variation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Journal of Agricultural Research China 38: 346-352.
- Honda Y, H Inaoka, A Takei, Y Sugimura y K Otsuji (1996)** Extracellular polysaccharides produced by tuberose callus. Phytochemistry 41 (6): 1517-1521.
- Hutchinson M J, R Onamu, S Obukosia (2004)** Effect of Thidiazuron, Benzylaminopurine and Naphthalene Acetic acid on *In vitro* propagation of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. Journal of Agriculture, Science and Technology 6 (1): 48-59.
- Jyothi R, A K Singh y K P Singh (2008)** *In vitro* propagation studies in tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). Journal of Ornamental Horticulture 11 (3): 196-201
- Kadam G B, K P Singh, A K Singh, R Jyothi (2010)** *In vitro* regeneration of tuberose through petals and immature flower buds. Indian Journal of Horticulture 67 (1):73-75
- Khan N H, N Zaidi, S Jabeen, J Iqbal (2000)** Micropropagation potential of *Polianthes tuberosa* L bulbs, scales and leaves. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 43 (2): 118-122.
- Marulanda-Ángel M L, L Isaza-Valencia, L M Londoño-Giraldo (2011)** Propagación *in vitro* de *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón a partir de meristemas florales. Acta Agronómica 60 (2): 132-139.
- Mishra A, R K Pandey, R K Gupta (2006)** Micropropagation of tuberose (*Polianthus tuberosa* L.) cv. Calcattia double. Progressive Horticulture 37: 226-236.

- Muralidhar C E, A R Mehta (1982)** Clonal propagation of three ornamental plants. *In:* Plant Tissue Culture. Japanese Association. Plant Tissue Culture Tokyo 693-694 pp.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Narayanswamy S V R Prabhudesai (1979)** Somatic pseudoembryogeny in tissue cultures of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Indian Journal of Experimental Biology*, 17: 873-875.
- Naz S, F Aslam, S Ilyas, K Shahzadi, A Tariq (2012)** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (24): 4107-4112.
- Nazneen S, M Jabeen, I Ilahi (2003)** Micropropagation of *Polianthes tuberosa* through callus formation. *Pak. J. Bot.*, 35 (1): 17-25.
- Otsuji K, Y Honda, Y Sugimura, A Takei (1994)** Production of polysaccharides in liquid cultures of *Polianthes tuberosa* cells. *Biotechnology Letters* 16 (9): 943-948.
- Panigrahi J, M S L Saiyad (2013)** *In vitro* propagation of *Polianthes tuberosa* L. cultivars (Calcutta single). *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 3 (3): 76-79.
- Rajasekharan V, K Haripriya, S Arumugam, A Shakila (2000)** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Abstract published in Centennial conference on spices and aromatic plants: challenges and opportunities in the new century. 86-88 pp.
- Sangavai C, P Chellapandi (2008)** *In vitro* propagation of a tuberose plant (*Polianthes tuberosa* L.). *Electronic Journal of Biology* 4 (3): 98-101.

Shen T M, R D Cowen, M M Meyer (1991) Propagación *in vitro* de tuberosa (*Polianthes tuberosa* L.). *HortScience*. 26 (6): 756-756.

Schum A (2003) Mutation breeding in ornamentals: an efficient breeding method? *Acta Horticulturae* 612:47-60.

Statistical Analysis System (2002) Institute Inc. SAS/STAT. User's Guide. Versión 9.0. Cary, N. C.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE CORMOS GENERADOS A PARTIR DE PLANTAS (*Polianthes tuberosa* L.) DE CORMOS IRRADIADOS

RESUMEN

Cormos de nardo de plantas generadas a partir de cormos que fueron irradiados a finales del año 2009 con siete dosis de radiación (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 Gy), fueron obtenidos de las macetas donde se cultivaron dichas plantas para determinar el número de cormos por maceta, el peso (báscula granataria) y su volumen (probeta de 500 mL). Observándose que el mayor número de cormos por maceta se obtuvo de los cormos irradiados con 15 Gy, pero con 30 Gy se encontró el mayor volumen y tamaño de los cormos.

Abstract

Tuberose corms of plants generated from corms irradiated in late 2009 with seven radiation doses (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 Gy) were obtained from the pots where these plants were grown to determine the number of corms per pot, weigh (scale granataria) and the volume (graduated cylinder of 500 mL). Observing that the largest number of corms per pot was achieved with a radiation of 15 Gy, while with 30 Gy was achieved the highest volume and size of corm.

I. INTRODUCCIÓN

La aplicación de técnicas de mutagénesis, como los rayos gamma y otros mutágenos físicos y químicos, ha generado gran variabilidad genética y ha jugado un papel significativo en el mejoramiento de los cultivos y en los estudios genéticos. En particular, el uso de mutagénesis en los programas de mejoramiento ha originado en todo el mundo el lanzamiento de más de 2700 variedades vegetales mutantes en 2008. Gran parte de ellas (incluyendo cereales, legumbres, oleaginosas, tubérculos y ornamentales) se obtuvieron en países en desarrollo, con un enorme y positivo impacto económico (Liang, 2009).

El nardo es una planta nativa de México que rutinariamente se propaga vegetativamente, utilizando los cormos que se producen a partir de yemas situadas en la base de las estructuras caulinares (Shillo, 1992). La importancia de este cultivo radica en que es utilizada como flor de corte así como en la industria farmacéutica y del perfume. Es peculiar que presenta poca variabilidad genética, posiblemente porque es propagada vegetativamente, por lo que es necesario incrementar la variabilidad genética de esta especie para propiciar el desarrollo de nuevas variedades.

Las actividades básicas en el mejoramiento de plantas consisten en la creación de variabilidad genética y selección de individuos con características deseables y superiores (Schum, 2003).

El mejoramiento por mutación es importante para el mejoramiento en especies de cultivos asexuales, donde la hibridación no es posible, y donde los principales

objetivos se enfocan en modificaciones en color, tamaño o forma de la flor y variegación de la clorofila en las hojas, caracteres que pueden ser fácilmente detectados (Datta, 2009).

La mutagénesis es uno de los métodos importantes de mejoramiento genético que ha tenido éxito para la obtención de nuevas variedades y generar variación genética en especies ornamentales cultivadas, como crisantemo (*Crhysanthemum* spp.) (Yamaguchi *et al.*, 2008 y Lee *et al.*, 2010), dalia (*Dahlia* spp.), rosa (*Rosa* spp.), clavel (*Dianthus* spp.), nardo (*P. tuberosa* L.) (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011) y nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) (Canul-ku *et al.*, 2012), que han dado resultados satisfactorios (Ahloowalia y Maluszynski, 2001; Shu *et al.*, 2009).

La principal ventaja de la inducción de mutaciones en cultivos de propagación vegetativa como el nardo, es la capacidad de cambiar uno o pocos caracteres de un cultivo, para la obtención de beneficios económicos, nutricionales y obtener una mejor especie capaz de adaptarse a las necesidades.

Con base en lo anterior el objetivo general de la presente investigación consistió en caracterizar cormos de nardo sometidas a un proceso de inducción de mutaciones con rayos gamma.

Hipótesis

La radiación gamma ^{60}Co induce variación morfológica en cormos de *P. tuberosa* L.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el invernadero de producción de ornamentales ubicado en la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” en Uruapan, Michoacán.

2.2 Material biológico

Se utilizaron cormos de nardo irradiados de la selección San Andrés con siete dosis de radiación (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 Gy) compradas en San Andrés, municipio de Zumpahuacán, Estado de México.

2.3 Establecimiento de los cormos

A los 43 meses después de la irradiación, los cormos fueron retirados de las macetas (matec número 6), mediante un lavado con agua de la llave se eliminó el resto del suelo de este material para, posteriormente determinar el número de cormos por maceta, pesarlos en una báscula granataria y medir el volumen en una probeta de 500 mL, colocando 450 mL de agua, sumergiendo el cormo, al total del volumen se le restó el volumen inicial para obtener el dato de la variable volumen.

2.4. Análisis estadístico

Las macetas se distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones.

Un análisis de varianza para las variables número de corno, volumen y peso fue realizado con el paquete estadístico SAS (SAS, 2002) versión 9.0. Se utilizó el procedimiento ANOVA para el análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para comparación de medias.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Respuesta de plantas irradiadas de *P. tuberosa* L.

El número de cormos por maceta no fue afectado estadísticamente en los diferentes tratamientos aplicados; aunque numéricamente se logró un número de cormos por maceta (4.4) mayor en la radiación de 15 Gy (Figura 1), respuesta que disminuyó con 25 Gy. Ali, (2002) Observó que en dosis bajas de radiación gamma se logró cormos de mayor tamaño, en comparación con dosis altas con menor número y tamaño que el control.

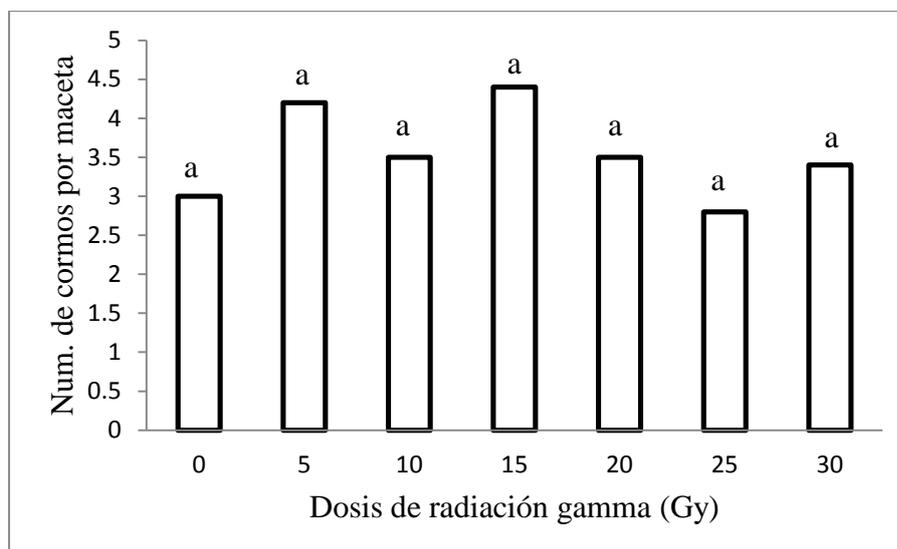


Figura 1. Efecto de la radiación en el número de cormos en *P. tuberosa* L. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$

Con la irradiación de 30 Gy, se logró el mayor volumen (25.01 mL) y el crecimiento del cormo (42.32 g), disminuyendo el volumen en 10 y 15 Gy con 13.85 y 15.48 mL, respectivamente (Figura 2).

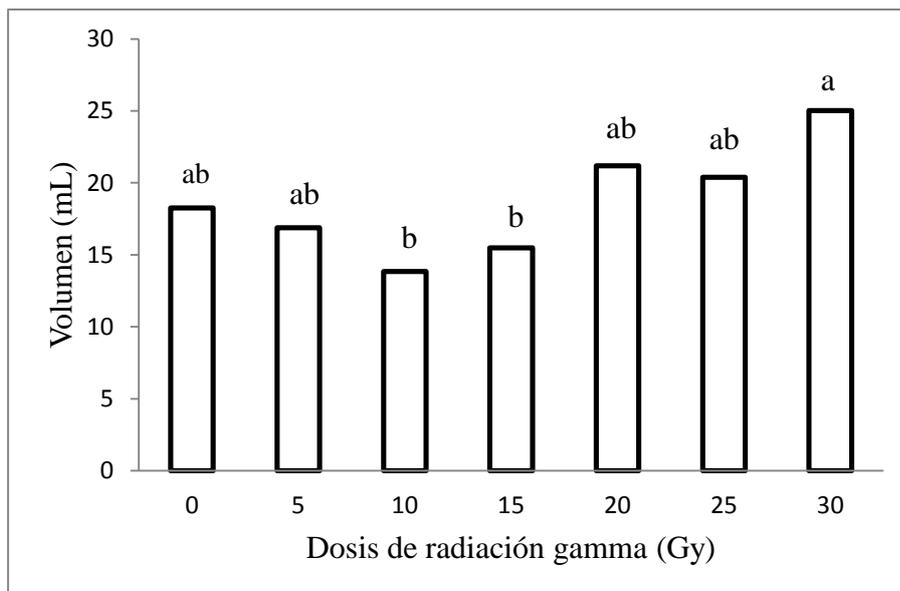


Figura 2. Respuesta del volumen de cormos a la radiación en *P. tuberosa* L. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$

Los menores pesos de cormo se presentaron al irradiar entre 5 y 15 Gy en comparación de los que recibieron mayor dosis de radiación (30 Gy) (Figura 3).

Desde el punto de vista del mejoramiento genético, uno de los caracteres importantes es el tamaño de semilla, debido a que hay una correlación entre el tamaño y vigor de la plántula, por lo general a mayor tamaño, mayor crecimiento y tamaño de plántula (Carrillo *et al.*, 2009).

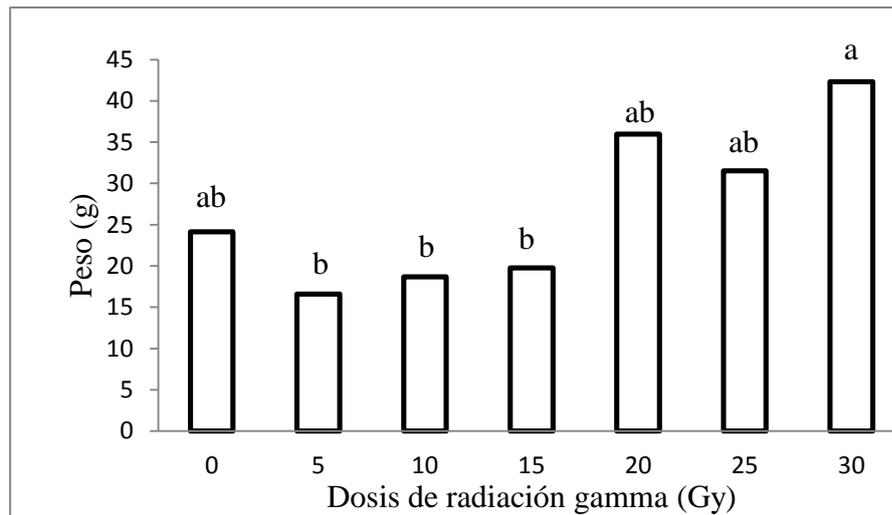


Figura 3. Respuesta del peso de cormos a la radiación en *P. tuberosa* L. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas $p \leq 0.05$.

En cormos irradiados con 5, 10 y 15 Gy, se detectó con mayor frecuencia los volúmenes en el rango de 0-10 mL (Figura 4).

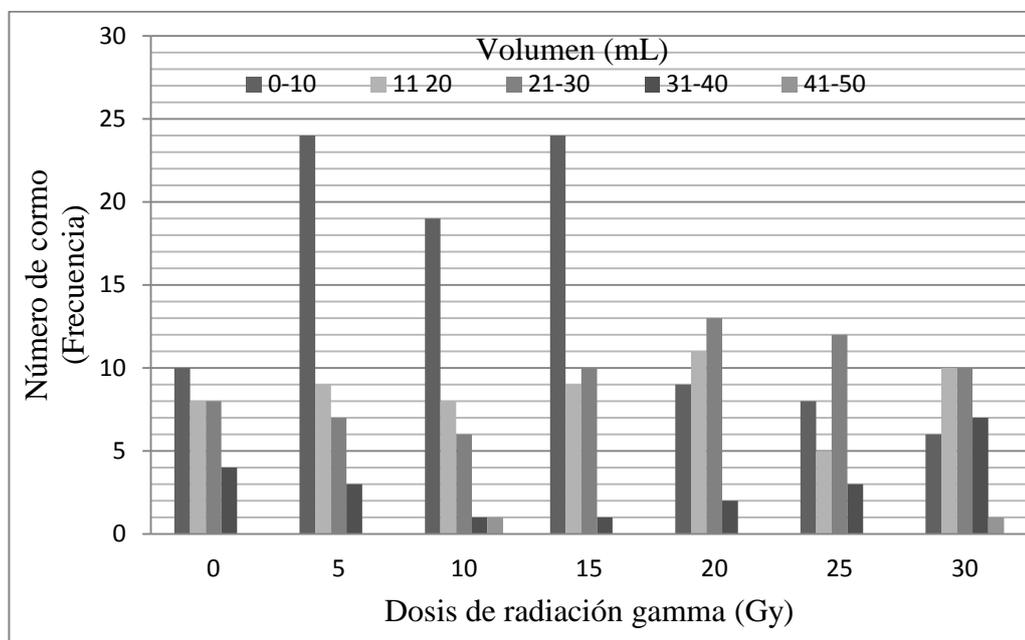


Figura 4. Efecto de dosis de radiación en el volumen de cormos en *P. tuberosa*

L.

Calderón (2011), en *Passiflora edulis* Sims var. *edulis-gulupa*, logró el desarrollo y multiplicación de brotes, la cual fue homogénea y logró los mayores índices de sobrevivencia en dosis de 10, 20 y 30 Gy.

Datta (2009), en cormos menciona las dosis adecuadas para *P. tuberosa* L., con un intervalo de 250 rad a 8 krad, en otro trabajo Krasaechai, (1992) afectó todos los parámetros estudiados en una dosis de 10 Gy e inhibió el crecimiento de cormos en la dosis de 25 Gy, logró hojas con quimera en las plantas irradiadas, pero no encontró mutación para color de la flor, el cual era el objetivo.

Se establecieron 11 clases respecto a peso del cormo, encontrándose que la clase de 11 a 20 g, presentó la mayor frecuencia con 25 cormos. El mayor peso se observó en los cormos irradiados con 30 Gy, encontrándose un cormo en las clases 91-100 y 101-110 (Figura 5).

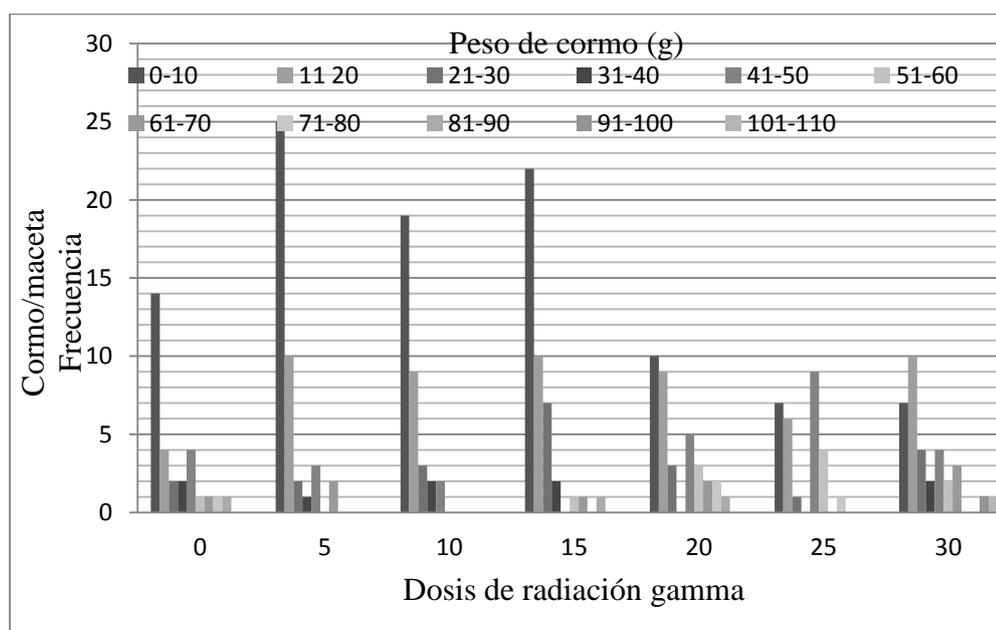


Figura 5. Efecto de la dosis de radiación en el peso de cormos de *P. tuberosa* L.

Debido a que este cultivo es propagado de manera comercial a partir de cormo, el grado de variabilidad que presenta es muy restringido. En la India y de acuerdo a Kharkwal y Shu (2009) reportan dos variedades mutantes en *Polianthes tuberosa* L. de 57 especies consideradas, en comparación con las 49 variedades mutantes obtenidas de *Chrysanthemum* sp.

IV. CONCLUSIONES

Los cormos irradiados entre 10 y 15 Gy presentaron el menor volumen en comparación de los que recibieron mayores dosis de radiación, siendo los de mayor volumen la mayor radiación.

El peso de los cormos irradiados entre 5 y 15 Gy presentaron el menor peso en comparación de los que recibieron mayores dosis de radiación, siendo el mayor peso con 30.

V. LITERATURA CITADA

- Ahloowalia B S, M Maluszynski (2001)** Induced mutations a new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118:167-173.
- Ali J (2002)** Effect of gamma irradiation on vegetative and floral characteristics of tuberose corms (*Polianthes tuberosa* L.) vs. Single. Tesis. Universidad de Agricultura, Faisalabad pp: 90
- Calderón P L A (2011)** Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflora edulis* simvar. *edulis*). Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia pp: 93.
- Canul-Ku J, F García-Pérez, E Campos-Bravo, E J Barrios-Gómez, E De La Cruz-Torres, J M García-Andrade, S Ramírez-Rojas (2012)** Efecto de la irradiación sobre nochebuena silvestre (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (8): 1495-1507.
- Carrillo E, C J Mejía, C A Carballo, S G García, R V Aguilar, T T Corona (2009)** Calidad de semilla en colectas de chile de agua (*Capsicum annum* L.) de los Valles Centrales de Oaxaca. *Agricultura Técnica en México* 35:257-266.
- Datta S K (2009)** Role of classical mutagenesis for development of new ornamental varieties: *In: Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Q Y Shu (ed). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. pp. 300-302.
- Estrada-Basaldúa J A, M E Pedraza-Santos, E de la Cruz-Torres, A Martínez-Palacios, C Sáenz-Romero, J L Morales-García (2011)** Efecto de rayos gamma 60 Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 445-458.

- Kharkwal M C, Q Y Shu (2009)** The role of induced mutations in world food security:
In: Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Q Y Shu (ed). Food and
Agriculture Organization of the United Nations, Rome. pp. 33-38
- Krasaechai Adisom (1992)** Effect of gamma radiation on tuberose (*Polyanthes
tuberosa*). Kasetsart Journal 26 (1): 6-11.
- Lee J, Y Chung, Y Joung, T Han, S Kang Y Yoo, G Lee (2010)** Induction of
mutations for stem quality in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) by
using gamma-ray irradiation. Acta Horticulturae 855:177-182.
- Liang Qu (2009)** Preface: *In: Induced Plant Mutations in the Genomics Era.* Q Y Shu
(ed). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. p 1.
- Schum A 2003.** Mutation breeding in ornamentals: an efficient breeding method?. Acta
Horticulturae 612:47-60.
- Shillo R (1992)** The Cuber Community Holds the Answer to Flowering Problems in
Polianthes Tuberosa. Acta Horticulturae 325: 139-364.
- Shu Q Y (2009)** Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Rome: Food and
Agriculture Organization of the United Nations 1-455.
- Statistical Analysis System (2002)** Institute Inc. SAS/STAT. User's Guide. Versión
9.0. Cary, N. C.
- Yamaguchi H, A Shimizu, K Degi, T Morishita (2008)** Effects of dose rate of gamma
ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in
chrysanthemum. Breeding Science 58:331-335.

CAPÍTULO V

RESULTADOS PRELIMINARES DE LA PROPAGACIÓN DE *Polianthes tuberosa* L. A PARTIR DE ESQUEJES

RESUMEN

La propagación por esquejes de tallo o de raíz es el principal método usado para plantas herbáceas perennes. *P. tuberosa* L., endémica de México, comercialmente se cultiva para flor de corte, y, además, es utilizada en la industria farmacéutica y del perfume, es una planta herbácea, perenne, de hojas verdes, largas, delgadas, algo y con brillo, que se encuentran reunidas en la base de los tallos florales. Los esquejes sin daño fueron seleccionados de varas florales de nardo, sometidas a dos tratamientos: a) En el invernadero y b) En el laboratorio. El primer experimento en el invernadero consistió en obtener esquejes realizando cortes en la vara floral de cada tipo de esqueje (con uno, dos y tres nudos), 20 de cada tipo fueron sellados con parafina fundida en el extremo superior y 20 de cada tipo fueron sellados con parafina fundida en los dos extremos, en el segundo consistió en esquejes con tres nudos, sellados en ambos extremos con parafina fundida, (100 esquejes por tratamiento) sembrados en tres sustratos: tierra, arena de río y agrolita (cuatro esquejes por bolsa). El experimento en el laboratorio consistió de cada tipo de esqueje (con uno, dos y tres nudos) fueron sellados con parafina fundida en ambos extremos, cuatro esquejes de cada tipo fueron colocados en un frasco que contenía 200 mL de una solución acuosa de AIB (1.0 mg por litro), con una sobrevivencia de 35 días. En el primer experimento en el invernadero se logró la mayor sobrevivencia (15 %) con tres nudos y sellados con parafina fundida por los dos extremos (35 días), en el segundo experimento la mayor sobrevivencia (13 %) se logró en el sustrato de arena de río (120 días).

Abstract

Propagation by stem cuttings or root is the main method used with herbaceous perennials, *P. tuberosa* L., endemic to Mexico, is commercially grown for cut flower, and also is used in pharmaceutical and perfume industry. Is an herbaceous, perennial plant with green leaves, long, slender, somewhat fleshy and quite brightness, that are gathered at the base of the flower stems .The cuttings were selected without mechanical damage of tuberosa healthy floral twig, subjected to two treatments: a) in the greenhouse and b) in the lab, First experiment consisted in obtaining each type of cutting (with one, two and three knots), 20 of each type sealing the ends with melted paraffin on superior and 20 of each type sealing the ends with melted paraffin on at both ends.In the second experiment cuttings were obtained with three knots, also sealing the top and bottom edges (100 cuttings per treatment). Three substrates were forest soil, river sand and perlite (four cuttings per bag). The laboratory experiment consisted of placing cuttings into a solution of Indole Butyric Acid (IBA), with a survival of 35 days. In the first experiment in the greenhouse highest survival (15 %) rate was achieved with three knots and sealing with melted paraffin both ends of the stalk of tuberosa (35 days), in the second experiment, the highest survival (13 %) was achieved in river sand substrate (120 days).

I. INTRODUCCIÓN

La propagación por esquejes de tallo o de raíz es el principal método usado para plantas perennes herbáceas, arbustivas o arbóreas; para la aplicación de este método se requieren plantas adultas, medios de cultivo (granito blanco o arena lavados) y enraizadores (Fonnegra y Jiménez, 2007).

En la mayoría de las especies leñosas se ha encontrado que la propagación por estacas es el método de propagación más eficiente en términos de rapidez, manejo y costo (Hartmann y Kester, 1999).

P. tuberosa L., endémica de México, comercialmente se cultiva para flor de corte, y, además, es utilizada en la industria farmacéutica y del perfume, es una planta herbácea, perenne, de hojas verdes, largas, delgadas, semi carnosas y con brillo, que se encuentran reunidas en la base de la vara floral. Las flores son blancas aunque algunas variedades presentan ligeros tonos amarillos o rosados y que se distribuyen en más de un tercio de la vara floral, en numerosas parejas que forman la espiga. La vara floral suele medir más de un metro de altura, es conocido con el nombre común de flor de hueso, margarita olorosa o vara de San José (Espinosa *et al.*, 2009).

En México, los estudios sobre la propagación de esta planta son escasos. A nivel comercial, en este cultivo, el sistema de propagación más utilizado es por cormos que se producen a partir de yemas situadas en la base de las estructuras caulinares (Shillo, 1992).

La propagación vegetativa o asexual involucra divisiones mitóticas de las células, que duplican el genotipo de la planta; de esta duplicación genética se obtiene un clon. En la clonación las características específicas de cualquier planta individual son perpetuadas por este tipo de propagación (Hartmann *et al.*, 1997).

En la actualidad no hay investigaciones sobre la propagación vegetativa por medio de esquejes en nardo, por lo cual el objetivo de esta investigación es conocer la respuesta en prendimiento de esquejes de diferente tamaño en diferentes sustratos.

Hipótesis

La sobrevivencia del esqueje depende del sustrato a utilizar

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero del IREGEP-Genética del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

2.2 Material biológico

Varas florales de *P. tuberosa* L. compradas en la Central de Abastos de la Ciudad de México Delegación Iztapalapa y en el mercado local de Texcoco, Edo de México.

2.3 Sustratos

Los sustratos utilizados fueron tres: tierra, arena de río y agrolita, los cuales se colocaron en bolsas negras de polietileno, con una capacidad de 500 mL.

2.4 Establecimiento de esquejes en invernadero

Los esquejes (fragmentos de plantas separados con una finalidad reproductiva) sin daño fueron seleccionados de varas florales de nardo, sometidas a dos experimentos, el primero consistió: de cada tipo de esqueje (con uno, dos y tres nudos), 20 de cada tipo fueron sellados con parafina fundida en el extremo superior y 20 de cada tipo fueron sellados con parafina fundida en ambos extremos, a todos los esquejes se les aplicó

enraizador radix 1500 en polvo, para colocarlos en tierra (cuatro esquejes por bolsa), las evaluaciones se efectuaron cada ocho días durante 45 días, para la variable de esquejes verdes (Cuadro 1); en un segundo experimento, se prepararon esquejes de tres nudos, sellados en ambos extremos con parafina fundida, a todos los esquejes se les aplicó enraizador radix 1500 en polvo, para colocarlos (100 esquejes por tratamiento) en tierra, arena de río y agrolita (cuatro esquejes por bolsa) Las evaluaciones se efectuaron cada ocho días durante 120 días, para la variable de esquejes verdes (Cuadro 2) .

Cuadro 1. Tratamientos de esquejes de diferente tamaño de *P. tuberosa* L. en tierra, sellados con parafina fundida.

Tratamientos	Número de nudos	Sellado con parafina fundida
1	1	Superior
2	1	Superior e inferior
3	2	Superior
4	2	Superior e inferior
5	3	Superior
6	3	Superior e inferior

Cuadro 2. Tratamientos de esquejes de tres nudos sellados en los extremos con parafina, en sustratos evaluados en esquejes de *P. tuberosa* L.

Tratamiento	Sustrato
1	Tierra
2	Agrolita
3	Arena

2.5 Establecimiento de esquejes en el laboratorio

De cada tipo de esqueje (con uno, dos y tres nudos) fueron sellados con parafina fundida en ambos extremos, cuatro esquejes de cada tipo fueron colocados en un frasco (colocando en una mesa de trabajo de laboratorio) que contenía 200 mL de una solución acuosa de AIB (1.0 mg por litro). Los esquejes se colocaron en el frasco y con una bomba de pecera (Hagen modelo Elite 801), la solución fue aireada. Las evaluaciones se efectuaron cada ocho días durante 45 días, para la variable de esquejes verdes.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Respuesta de esqueje al número de nudos y sellado con parafina en esquejes de *P. tuberosa* L.

La mayor sobrevivencia se logró en los esquejes con tres nudos y sellados con parafina fundida en la parte superior y con tres nudos con parafina fundida en ambos extremos (35 días); y la menor sobrevivencia se obtuvo en esquejes con un nudo, sellados solamente en la parte superior (Figura 1). Al sellar la parte superior e inferior se evita la deshidratación del esqueje, por lo cual el 100 % de estos se retiran del sustrato a los 45 días, (Figura 2). Álvarez (2007) logró la propagación de *Rosmarinus officinalis* L. con esquejes de 10 cm; en esta investigación se observó que el tamaño del esqueje afecta la proliferación de raíces.

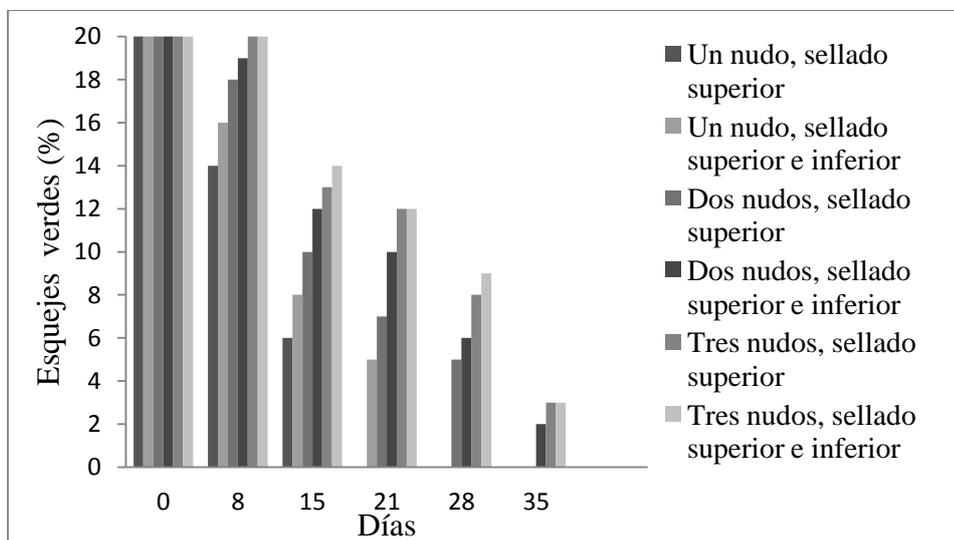


Figura 1. Supervivencia de esquejes de nardo (*P. tuberosa* L.) en respuesta al número de nudos y al sellado de los extremos con parafina fundida.



Figura 2. Aspecto de los esquejes de nardo (*P. tuberosa* L.) en respuesta al número de nudos y al sellado de los extremos con parafina con uno, dos y tres nudos a los 15 días de establecidos en sustrato de tierra.

3.2 Respuesta a los diferentes sustratos en esquejes de nardo

Únicamente los esquejes que sobrevivieron a los 90 días fueron los que se establecieron en los sustratos de arena de río (en mayor proporción y de coloración verde intenso) y agrolita (en menor proporción y de verde menos intenso) (Figura 3). Los esquejes permanecieron verdes (13 %) más de 120 días cuando se colocaron en el sustrato de arena de río (Figura 4) y (Figura 5), en comparación con los esquejes colocados en tierra, en donde se secaron el 100 % de los explantes. La retención de humedad del sustrato es considerada una característica física importante para el crecimiento y desarrollo de un cultivo en maceta (Cabrera, 1999). Posiblemente la retención de la humedad por la arena y agrolita estaba más ajustada a los requerimientos de los esquejes. García-Albarado *et al.* (2013), lograron la germinación (6 %) de semillas en la mezcla de turba 60 % en el sustrato pero no lograron el establecimiento de esquejes de *Ruellia nudiflora*, en todas las mezclas de sustratos utilizados (lombricomposta, turba, arena y vermiculita). Utilizando las mismas mezclas en la

especie *Centrathium punctatum* observaron que su propagación fue mejor por esqueje que por semilla, especialmente en sustratos que contenían un mayor porcentaje de turba (más de 80 % de la mezcla).



Figura 3. Respuesta de esquejes de *P. tuberosa* L. al cultivo en diferentes sustratos A) y B) A los 60 y 90 días de establecidos en arena, respectivamente, deshidratándose el primer nudo en ambos C) Foto de esqueje en agrolita a los 90 días con un verde intenso.

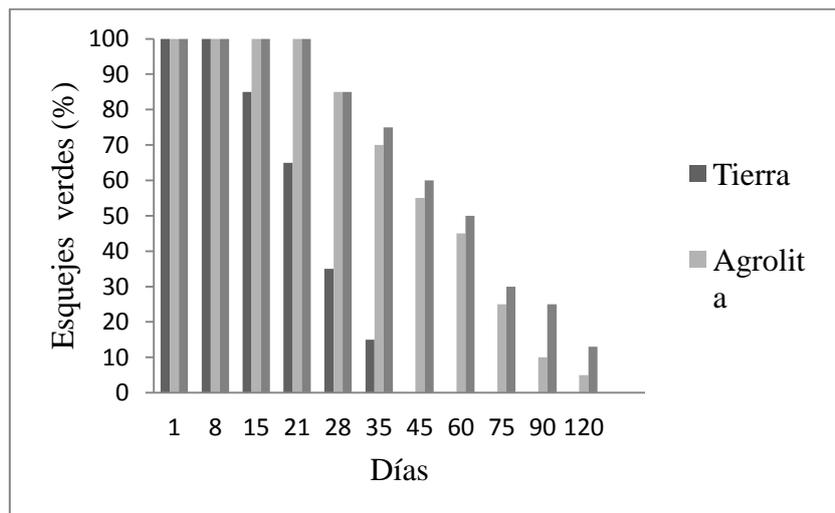


Figura 4. Respuesta de la variable sobrevivencia de esquejes de *P. tuberosa* L. en diferentes sustratos.



Figura 5. Aspecto de esqueje de *P. tuberosa* L. con yema verde a los 120 días de establecido con sustrato arena.

3.3 Respuesta de ácido indol butírico en esquejes de *P.tuberosa* L.

La respuesta del desarrollo del esqueje a la aplicación de AIB, no se logró evaluar debido a que los esquejes se secaron, a los 35 días de establecidos; este tiempo fue similar al de los esquejes tratados en el invernadero con sustrato tierra, a pesar de que estaban en solución líquida con el regulador de crecimiento (Figura 6). Los esquejes con tres nudos fueron los que lograron hasta 45 días más tiempo de sobrevivencia.

Ruiz *et al.* (2005) en *Gimelina arborea* Roxb, lograron el enraizamiento en 71.8 % de estacas apicales y brotación en 54.9 %, el AIB inhibió la capacidad de enraizamiento en las estacas apicales, pero la estimuló en estacas intermedias y basales, logrando el mayor enraizamiento en estacas apicales sin AIB (80 %) y en las intermedias con 2.0 mg de AIB (83 %).



Figura 6. Respuesta de esquejes de *P. tuberosa* L. al regulador AIB. A) Aspecto a los diez días de establecidas y B) Aspecto a los 30 días de establecidas.

En la investigación presente no se observó el enraizamiento, logrando la inhibición de este proceso.

IV. CONCLUSIONES

Estos resultados son preliminares y utilizando como base los esquejes de tres nudos con parafina fundida en ambos extremos y como sustrato arena de río para finalmente obtener plantas a partir de esquejes.

V. LITERATURA CITADA

- Álvarez-Herrera J G, S R Lusardo, Y E Chacón (2007)** Efecto de diferentes tamaños de esqueje y sustratos en la propagación del romero (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomía Colombiana* 25 (2): 224-230.
- Cabrera R I (1999)** Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:5-11.
- Espinosa R A, J J P Silva, M G Borges, L R Fajardo, J P Pérez, O P González, y S F Sariago (2009)** Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Curcuma longa* L. *Biotecnología Vegetal* 9 (1):53-59.
- Fonnegra G R, R S L Jimenez (2007)** Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. Universidad de Abtíoquia 2.^a edición. Medellín, Colombia pp. 353.
- García-Albarado J C, F C Gómez-Merino, L I Trejo-Téllez, I A Sandoval-Pérez, V Morales-Ramos (2013)** Propagación de especies herbáceas silvestres con potencial para paisajismo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 1043-1047.
- Hartmann H T, D E Kester, J T Davies, R L Geneve (1997)** Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice Hall, Uper Saddle River, New Jersey 6th edition. pp 199–209.
- Hartmann H T, D E Kester (1999)** Propagación de Plantas: Principios y Prácticas. Antonio Marino (Ed). 7a reimpresión, Ed. CECSA. México D. F., México. pp: 219-363.
- Ruiz G R, J J H Vargas, V M A Cetina, A M Villegas (2005)** Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estacas en el enraizamiento de *Gmelina arborea* Roxb. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28 (4): 319-326.

Shilo R (1992) The cuber community holds the answer to flowering problems in *Polianthes tuberosa*. Acta Horticulturae 325: 139-364.

DISCUSIÓN GENERAL

En el campo de la floricultura mundial, la planta *P. tuberosa* L. es un cultivo importante utilizado tanto para flor de corte como para la obtención de productos de importancia para la industria química. Debido a que la planta de nardo en el campo es propagada de manera vegetativa a partir de los cormos, se puede afirmar que el cultivo de nardo es el producto de clones con características fenotípicas definidas y que prácticamente no cambian porque la propagación se lleva a cabo en ausencia de recombinación genética, por lo tanto, el grado de variabilidad que presenta el cultivo es muy restringido; se puede afirmar que el nardo es un cultivo que ha sido sometido muy poco, en comparación con otros cultivos, a programas de mejoramiento genético. De lo anterior se deduce la importancia de incrementar la variabilidad genética para la generación de nuevas variedades mejoradas de nardo, las nuevas variedades deben poseer características agronómicas sobresalientes, de valor ornamental y de poscosecha así como variedades que produzcan productos fitoquímicos en alta cantidad. Por tal motivo, este trabajo constituye una parte metodológica importante, que es lo relacionado al proceso de la multiplicación masiva de plantas mediante la tecnología del cultivo de tejidos vegetales. Con esta tecnología acoplada a la de procedimientos eficientes para inducir mutaciones se generarán fenotipos con cambios en: la coloración, forma, tamaño y perfume de la flor, tamaño de la planta, morfología y pigmentación de las hojas y grado de tolerancia a los factores bióticos y abióticos más comunes en este cultivo. En otras palabras, se puede poner en marcha todo un proceso para revolucionar el cultivo de nardo.

Dos variedades sobresalientes en México son Single Mexican y Double Pearl, la primera para la obtención de productos de importancia para la industria química y la

segunda para flor de corte, debido a sus flores dobles, ambas con flores blancas. Híbridos de nardo existentes, en la India con flores sencillas: Calcutta Single, Phulerajni, Prajwal, Shringar, Hyderabad Single, Rajatrekha, Khahikuchi Single, Pune Single, Arka Nirantra y de flores dobles: Calcutta Double, Local doublé navsari, Hyderabad Double, Swarnarekha, Suvasini, Vaibhav, Prajwal, Sikkim Selection, GKTC-4, son utilizados para investigaciones incluidas las dos variedades de México, las flores son de color blanco tanto para flores sencillas como flores dobles (Panigrahi y Saiyad, 2013 y Vishwakarma y Kumar, 2013).

En los casos de la caracterización preliminar de plántulas generadas a partir de cormos irradiados, entre mayor sea la radiación gamma menor es el número de cormos producidos y mayor el peso y para los resultados preliminares de la propagación de nardo a partir de esquejes de inflorescencia la respuesta favorable fue al colocar esquejes sellados en los dos extremos en sustrato de arena.

La micropropagación es el principal sistema utilizado para la generación de millones de plántulas cada año. En general, para la micropropagación de cualquier cultivo, varios órganos y tejidos de la planta pueden, en potencia, ser utilizados como punto de partida y con el objetivo de lograr y de mejorar el proceso de regeneración y la multiplicación masiva de plantas, se llevan a cabo pruebas de diversos tipos y combinaciones de reguladores de crecimiento de plantas, para conocer la acción en la expresión del genotipo ya que no existe el método universal para la micropropagación de cultivares diversos. Existen en la literatura ciertos procedimientos para la propagación *in vitro* de plantas que ya han sido establecidos y utilizados. En el caso del cultivo de nardo, la mayoría de los autores han centrado su atención en la utilización de

los segmentos de cormo como el explante utilizado comúnmente para la inducción de brotes (Muralidhar y Mehta, 1982, Bose *et al.*, 1987, Shen *et al.*, 1991, Honda *et al.*, 1996, Khan *et al.*, 2000, Rajasekharan *et al.*, 2000, Nazneen *et al.*, 2003, Mishra *et al.*, 2006, Ahmad *et al.*, 2006, Beyrami *et al.*, 2008, Sangavai y Chellapandi, 2008, Jyothi *et al.*, 2008, Gajbhiye *et al.*, 2011, Estrada-Basaldua *et al.*, 2011, Naz *et al.*, 2012 y Panigrahi y Saiyad, 2013), flores y tépalos (Shen *et al.*, 1991, Otsuji *et al.*, 1994, Kadam *et al.* 2010), hoja (Sunyal *et al.*, 1998, Khan *et al.*, 2000, Bindhani *et al.*, 2004, Beyrami *et al.*, 2008), segmentos de ápices (Hutchinson *et al.*, 2004) y raíz (Narayanswamy y Prabhudesai, 1979) y diversos reguladores del crecimiento vegetal y medios de cultivo han sido empleados (Narayanswamy y Prabhudesai, 1979; Muralidhar y Mehta, 1982; Bose *et al.*, 1987; Shen *et al.*, 1991; Otsuji *et al.*, 1994; Honda *et al.*, 1996; Sunyal *et al.*, 1998; Rajasekharan *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2000; Nazneen *et al.*, 2003; Hutchinson *et al.*, 2004; Bindhani *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2006; Sangavai y Chellapandi, 2008; Jyothi *et al.*, 2008; Beyrami *et al.*, 2008; Kadam *et al.* 2010; Estrada-Basaldua *et al.*, 2011; Naz *et al.*, 2012; Panigrahi y Mohammad, 2013) con lo que se completa, en gran medida, la información y el cuadro biotecnológico que en la actualidad existe para la propagación de plantas de nardo.

Llama la atención que el trabajo de Shen *et al.* (1991) que tratan de la regeneración de plántulas a partir de tépalos, los resultados no se han reportado con avances hasta la fecha actual, solo fueron expuestos los resultados preliminares en un congreso en el año 1991, en el caso del grupo de Kadam *et al.* (2010), hasta la fecha no se han encontrado avances o nuevos resultados, por lo que se deduce que no continuaron con la investigación. El problema en la propagación *in vitro* de nardo a

partir de tejido de cormos es la contaminación y, de hecho, es uno de los factores que más limitan este proceso pero, a pesar de esto, el corno sigue siendo utilizado para la micropropagación porque no existe al tiempo presente la tecnología práctica y económica para micropropagar plantas de nardo a partir de otros órganos de la planta. En la literatura únicamente existen dos grupos de investigadores en la India y en Taiwan, que han logrado la producción de algunas plántulas a partir de botones florales. Los reguladores empleados en este trabajo fueron BAP y ANA y Kadam *et al.* (2010) BAP, 6.0 mg; ANA, 0.5 mg; 2,4 D, 0.7 mg y TDZ, 0.5 mg, es interesante que estos investigadores hayan utilizado la acción conjunta de cuatro reguladores de crecimiento para lograr la respuesta que en el trabajo presente se obtuvo, inducir la regeneración de brotes en los cultivos, en el caso de Shen *et al.* (1991) solo BAP y ANA. La respuesta a diferentes reguladores puede deberse a que Kadam *et al.* (2010) trabajaron con variedades diferentes, conviene resaltar que la utilización de cuatro reguladores de crecimiento así como la alta concentración de BAP tiende a aumentar el costo para la regeneración de las plántulas. Llama la atención, que no existe información acerca de la utilización de tejido foliar ni de yemas vegetativas de la inflorescencia. Brotes individuales fueron generalmente desarrollados fácilmente para la inducción de raíces *in vitro*, lo que ocurre por lo general en más de 90 % de las plántulas.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Este es el primer trabajo en el que se da información de la regeneración de plántulas a partir de yemas vegetativas de inflorescencia.
2. A partir de botón, los resultados obtenidos en la regeneración de plantas en este trabajo también son los primeros en nuestro continente y es el tercer trabajo en obtener resultados a nivel mundial.
3. La regeneración de plantas a partir de yemas vegetativas de la inflorescencia se llevó a cabo posiblemente mediante embriogénesis somática, aunque esto debe confirmarse.
4. La regeneración de plantas a partir tanto de botón como de yema vegetativa de la inflorescencia es masiva, en especial en los casos de regeneración a partir de yema.
5. Resultados preliminares indican que es posible la propagación de planta en invernadero a partir de esquejes.

LITERATURA CITADA

- Abraham V, B M Desai (1976)** Radiation induced mutant in tuberose. Indian Journal of Genetics. *Plant Breeding* 36 (3): 328-331.
- Ahloowalia B (1995)** Induced mutation and molecular techniques for crop improvement (*in vitro* mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants). Agencia Internacional de Energía Atómica. Austria. 531-541.
- Ahmad M S, T Ahmad, N Zaidi, A I Nasir (2006)** High frequency *in vitro* propagation of *Polianthes tuberosa*. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 49 (5): 344-348.
- Ammirato P V (1989)** Recent progress in somatic embryogenesis. IAPTC Newsletter 57: 2-16.
- Arce-Montoya M, M Rodríguez-Álvarez, J A Hernández-González, M L Robert (2006)** Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. Plant Cell Reports 25 (8): 777-783.
- Aureoles-Rodríguez F, J L Rodríguez-de la O, J P Legaria-Solano, J Sahagún-Castellanos, M G Peña-Ortega (2008)** Propagación *in vitro* del ‘Maguey Bruto’ (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. Revista Chapingo Serie Horticultura 14 (3):263-269.
- Barba-Gonzalez R, J M Rodríguez-Domínguez, M C Castañeda-Saucedo, A Rodríguez, E Tapia-Campos (2012)** Mexican Geophytes I. The Genus *Polianthes*. In: Van Tuyl J M, P Arens. Bulbous ornamentales I. Floricultura y Biotecnología Ornamental 6 (1):122-128.

- Beyrami Z E, P Azadi, A Safari, M R Shafii, S Sadeqi (2008)** Study on somoclonal variation in *Polianthes tuberosa* *in vitro* culture. The National Ornamental Plant Research Station, Mahallat (Iran) 30724: 102.
- Bhojwani S S y P K Dantu (2013)** Historical sketch. *In* Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Department of Botany Dayalbagh Educational Institute Agra. Springer India pp: 1-10.
- Bindhani B K, A K Dalal, B Behara (2004)** Role of auxins for callus induction and chromosomal variation in *Polianthes tuberosa* L. 'Single'. International journal of Genetics and plant Breeding 64 (2): 173-174.
- Bose T K, B K Jana, S Moulik (1987)** A note on the micropropagation of tuberose from scale stems section. Indian Journal of Horticultura 44: 100-101.
- Calderón P L A (2011)** Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflora edulis* simvar. *edulis*). Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia pp. 93.
- Canul-Ku J, F García-Pérez, E Campos-Bravo, E J Barrios-Gómez, E De La Cruz-Torres, J M García-Andrade, S Ramírez-Rojas (2013)** Efecto de la irradiación sobre nochebuena silvestre (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3 (8): 1495-1507.
- Datta S K (2009)** Role of Classical Mutagenesis for Development of New Ornamental Varieties: *In: Induced Plant Mutations in the Genomics Era.* Q Y Shu (ed). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome pp. 300-302.
- Domínguez R M S, A G S Alpuche, N L M Vasco, E M B Pérez (2008)** Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de *Agaves* mexicanos. Revista Fitotecnia Mexicana 31(4): 317-322.

- Escalante P C (2003)** Inducción de variabilidad genética en nardo (*Polianthes tuberosa* L.) con rayos gamma de ^{60}Co . Tesis de Licenciatura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo México. 51p.
- Espinosa R A, J J P Silva, M G Borges, L R Fajardo, J P Pérez, O P González, y S F Sariago (2009)** Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Curcuma longa* L. Biotecnología Vegetal 9 (1):53-59.
- Estrada B A (2010)** Morfogénesis *in vitro*, identificación y control de hongos contaminantes y efecto de rayos gamma en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Tesis de Maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pp 69.
- Estrada-Basaldúa J A, M E Pedraza-Santos, E de la Cruz-Torres, A Martínez-Palacios, C Sáenz-Romero, J L Morales-García (2011)** Efecto de rayos gamma ^{60}Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3: 445-458.
- Gajbhiye S S, M K Tripathi, M S Vidya, M Singh, B S Baghel, S Tiwari (2011)** Direct shoot organogenesis from cultured stem disc explants of tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.). Journal of Agricultural Technology 7(3): 695-709.
- Gómez K (1998)** Embriogénesis somática. In: Pérez J. ed. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Villa clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las plantas 56-75.
- Gonzatti C (1981)** Flora Taxonómica Mexicana II. Ed. Ceneti; Guadalajara, México 87-88.
- Haberlandt Gottlieb (1902)** Kulturversuche mit isolierten pf lanzenzellen-Silzungsber. Akad. Wiss. Wien.Math. Nat. Classe. 111. (1): 62-92.
- Hazra S K, S Das, A K Das (2002)** Sisal plant regeneration via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 235-240.

- Hutchinson M J, R Onamu, S Obukosia (2004)** Effect of Thidiazuron, Benzylaminopurine and Naphthalene Acetic acid on *In vitro* propagation of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. Journal of Agriculture, Science and Technology 6 (1): 48-59.
- Ibarra C V A, M V Guevara (2009)** Cultivo *in vitro* de Cempoalxóchitl (*Tagetes erecta*). Tesis de licenciatura, Química industrial pp 58.
- Kadam G B, K P Singh, A K Singh, R Jyothi (2010)** *In vitro* regeneration of tuberose through petals and immature flower buds. Indian Journal of Horticulture 67 (1): 73-75.
- Karpov P (2004)** Clonal propagation of *Yucca aloifolia* L. Acta Universitaris Latviensis, Biology 676: 177-182.
- Kessel D A (2012)** Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. Cultivos Tropicales 33 (3): 34-41.
- Khan N H, N Zaidi, S Jabeen, J Iqbal (2000)** Micropropagation potential of *Polianthes tuberosa* L bulbs, scales and leaves. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 43 (2): 118-122.
- Lagoda P J (2012)** Developments at the Plant Breeding and Genetics Laboratory, Seibersdorf. Plant Breeding and Genetics Newsletter 28:24-25.
- Liang Qu (2009)** Preface: *In: Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Q Y Shu (ed). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. p 1.
- López-Mendoza H, J Carrillo-Rodríguez, J Chávez-Servia (2012)** Effects of gamma-irradiated seeds on germination and growth in *Capsicum annum* L. plants growth in a greenhouse. Acta Horticulturae 947:77-81.

- Martínez-Palacios A, M P Ortega-Larrocea, V M Chavez, R Bey (2003)** Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 135-142.
- Mishra A, R K Pandey, R K Gupta (2006)** Micropropagation of tuberose (*Polianthus tuberosa* L.) cv. Calcattia double. *Progressive Horticulture* 37: 226-236.
- Muralidhar C E, A R Mehta (1982)** Clonal propagation of three ornamental plants. In: *Plant Tissue Culture*. Japanese Association. *Plant Tissue Culture Tokyo* 693-694 pp.
- Narayanswamy S V R Prabhudesai (1979)** Somatic Pseudoembryogeny in tissue cultures of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Indian Journal of Experimental Biology*, 17: 873-875.
- Naz S, F Aslam, S Ilyas, K Shahzadi, A Tariq (2012)** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (24): 4107-4112.
- Nazneen S, M Jabeen, I Ilahi (2003)** Micropropagation of *Polianthes tuberosa* through callus formation. *Pak. J. Bot.* 35 (1): 17-25.
- Nikam T D, G M Bansude, K C K Aneesh (2003)** Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelma). *Plant Cell Reports* 22: 188-194.
- Otsuji K, Y Honda, Y Sugimura, A Takei (1994)** Production of polysaccharides in liquid cultures of *Polianthes tuberosa* cells. *Biotechnology Letters* 16 (9): 943-948.
- Panigrahi J, M S L Saiyad (2013)** *In vitro* propagation of *Polianthes tuberosa* L. cultivars (Calcutta single). *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 3 (3): 76-79.

- Pierick R L M (1990)** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-prensa. España Madrid. pp: 149-326.
- Portillo L, F Santacruz-Ruvalcaba, A Gutiérrez-Mora, B Rodríguez-Garay (2007)** Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. In *Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 43:569-575.
- Rajasekharan V, K Haripriya, S Arumugam, A Shakila (2000)** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Abstract published in Centennial conference on spices and aromatic plants: challenges and opportunities in the new century.86-88 pp.
- Ramírez-Malagón R, A Borodanenko, L Pérez-Moreno, M S Salas-Araiza, H G Nuñez-Palenius, N Ochoa-Alejo (2008)** *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 201-207.
- Reinert J (1958)** Morphogenese and ihren kontrolle and gewebekulturen aus carotene *Naturwissen schoffen* 45: 344-345.
- Roca W M, L A Mroginski(1993)** Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. 1991.
- Sangavai C, P Chellapandi (2008)** *In vitro* Propagation of a Tuberose Plant (*Polianthes tuberosa* L.). *Electronic Journal of Biology* 4 (3): 98-101.
- Shen T M, R D Cowen, M M Meyer (1991)** *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Horticultural Science* 26 (6): 756-756.
- Shillo R (1992)** The Cuber Community Holds the Answer to Flowering Problems in *Polianthes tuberosa*. *Acta Horticulturae* 325: 139-364.

- Singh A K (2006)** Flower Crops: Cultivation and Management New India Publishing Agency 4:357-370.
- Solano E, T F Patricia (2007)** Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: using niche modeling to improve assessments of risk status. *Biodiversity and Conservation* 16: 1885-1900.
- Steward F C, M O Mapes, J Smith (1958)** Growth and organized development of culture cell. *American Journal of Botany* 45: 693-704.
- Tejavathi D H, M D Rajanna, R Sowmya, K Gayathamma (2007)** Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 43: 423-428.
- Toker C, S S Yadav, . S Solanki (2007)** Mutation breeding. En: S. S. Yadav et al. (eds.) *Lentil: An ancient crop for modern times*. Springer. pp. 209-224.
- Van Harten A M (1998)** Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 353 pp.
- Valenzuela-Sánchez K K, R E Juárez-Hernández, V Olalde-Portugal, M V Elena O Paredes-López (2006)** Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 336-340.
- Vishwakarma B K, A Kumar (2013)** Assessment of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) varieties under eastern up conditions. *Plant Archives* 13 (1): 185-186.
- Younis S E, J H Borham (1975)** The effects of gamma irradiation on *Polianthes tuberosa*. *Egyptian Journal of Botany* p 217.