



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**CULTIVO IN VITRO DE *Sinningia speciosa* A PARTIR
DE SEGMENTOS DE HOJA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A
GUILLERMO DIAZ SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

"Cultivo in vitro de Sinningia speciosa a partir de segmentos de hoja"

que presenta el presente: Guillermo Díaz Sánchez
con número de cuenta: 8303436-3 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 21 de Junio de 1996.

PRESIDENTE Dr. Héctor González Rosas
VOCAL Ing. Francisco Cruz Pizarro
SECRETARIO Biol. Elysa Martínez Holguín
PRIMER SUPLENTE Ing. Gloria Solarez Díaz
SEGUNDO SUPLENTE Ing. Guillermo Basante Butrón

RECONOCIMIENTOS

A mis padres quienes me apoyaron con gran cariño y que con su cotidiano ejemplo de familia responsable y amor hacia sus hijos, han hecho posible mi formación profesional.

A mis hermanos quienes pusieron gran interés para que siguiera adelante con esta carrera.

Con gran amor para mi esposa, quien me ha apoyado moralmente, con el propósito de que acabe mi formación profesional.

A todos mis amigos y maestros que hicieron posible mi formación en esta Facultad para estar preparado para solucionar problemas que atañen a nuestra carrera.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que es la parcela donde se cultivan hombres y mujeres para servir a nuestra sociedad.

Al Colegio de Postgraduados, particularmente al Programa de Fruticultura, por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Héctor González Rosas por su acertada conducción, enseñanza, apoyo incondicional en la realización de este logro y a quien expreso mi más profundo reconocimiento por su calidad como persona.

A la Bióloga Elva Martínez Holguín a quien expreso mi gratitud por su invaluable ayuda en la revisión y comentarios vertidos en este trabajo

Al M. C. Francisco Cruz Pizarro como reconocimiento por sus observaciones y acertadas sugerencias

A la Ing. Agrícola Glona Solares por las observaciones realizadas.

Al Ing. Agrícola Guillermo Basante Butrón por sus comentarios realizados a éste trabajo.

Al Biólogo Alejandro Cruz Ramos Villaseñor por su participación entusiasta e invaluable cooperación y aportaciones en el ámbito profesional.

A todas aquellas personas que contribuyeron ilimitadamente en mi formación personal y profesional.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1. <i>Sinningia speciosa</i>	3
2.1.1. Hábitat y distribución geográfica.....	3
2.1.2. Descripción botánica.....	3
2.1.2.3. Importancia.....	4
2.2. Multiplicación asexual.....	5
2.2.1. Técnicas convencionales de propagación de <i>Sinningia speciosa</i>	6
2.3. Cultivo <i>in vitro</i>	6
2.3.1. Generalidades.....	6
2.3.2. Mecanismos de morfogénesis.....	7
2.3.3. Propagación <i>in vitro</i> a partir de segmentos de hoja.....	8
2.3.4. Factores que intervienen en el cultivo <i>in vitro</i>	9
2.3.4.1. Selección del inóculo.....	9
2.3.4.2. Medio de cultivo.....	10
2.3.4.3. Reguladores de crecimiento.....	11
2.3.4.4. Condiciones de cultivo.....	13
3. MATERIALES Y METODOS.....	14
3.1. Establecimiento del cultivo aséptico.....	14
3.1.1. Obtención del inóculo.....	14
3.1.2. Desinfección y siembra.....	14
3.1.3. Medio de cultivo.....	14
3.1.4. Respuesta a los reguladores del crecimiento.....	15
3.2. Multiplicación del inóculo.....	17
3.3. Enraizamiento de brotes.....	18
3.4. Análisis estadístico.....	18
3.4.1. Toma de datos.....	18
3.4.2. Diseño experimental.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Establecimiento del cultivo aséptico.....	19
4.1.1. Desinfección y medio de cultivo.....	19
4.1.2. Respuestas a los de reguladores del crecimiento.....	19
4.2. Multiplicación del inóculo.....	22

4.2.1. Tiempo de brotación.....	22
4.2.2. Número de brotes.....	22
4.2.3. Longitud de brotes.....	28
4.3. Enraizamiento.....	28
5. CONCLUSIONES.....	32
6. BIBLIOGRAFÍA.....	33

CUADRO	INDICE DE CUADROS	Pag.
1	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) Soluciones concentradas.	16
2	Combinación BA/ANA adicionados al medio de cultivo (MS)	16
3	Combinación BA/AIB adicionados al medio de cultivo (MS).	17
4	Análisis de varianza para la variable número de brotes producidos en BA/ANA	23
5	Prueba de Tukey	23
6	Análisis de varianza para la variable número de brotes producidos en BA/AIB	24
7	Prueba de Tukey	24
8	Respuesta de los inóculos de <u>Sinningia speciosa</u> promedios del número y longitud de brotes, culti- vados en el medio MS adicionado con la combina- ción BA/ANA.	25
9	Respuesta de los inóculos de <u>Sinningia speciosa</u> , promedios del número y longitud de brotes, culti- vados en el medio MS adicionado con la combina- ción BA/AIB.	27

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
1 Establecimiento del inóculo en el medio de cultivo	20
2. Inicio de brotación.	20
3. Fase II. Multiplicación del material.	29
4 Material separado y transferido a los 60 días de iniciado la brotación.	29
5. Fase III. Corresponde al enraizamiento y preparación de las plántulas para su transferencia a condiciones no asépticas (adaptación a suelo).	30
6 Fase IV. Preadaptación de las plantulas para su transplante a suelo.	31
7. Estado de floración	31
8. Efecto de la combinación de BA/ANA en proliferación de brotes	32
9. Efecto en la proliferación de brotes en diferentes concentraciones de BA/ANA y BA/AIB	32

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo establecer la metodología para el cultivo *in vitro* de Sinningia speciosa, a partir de segmentos de hoja.

Para su realización, se utilizó como inóculo segmentos de hoja, siendo sembrados bajo condiciones asépticas en un medio de cultivo que contenía, las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962): 2ml/l, de glicina, 10 ml/l de mio-inositol, 5 ml/l de ácido nicotínico, 5 ml/l de pindoxina, 4 ml/l de tiamina-HCl, 30 g/l de sacarosa y 7.5 g/l de agar.

Las condiciones de incubación fueron de 25 ± 1 °C, la intensidad luminica de 5.000 lux y un foto periodo de 16 horas. Para el establecimiento del cultivo aséptico, los inóculos fueron lavados con agua y jabón, se desinfectaron por inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos. Posteriormente son sumergidos en solución de hipoclorito de calcio al 15% más dos gotas de tween 20 durante 15 minutos; se le dan tres enjuagadas con agua esterilizada, a intervalos de 5 minutos por enjuagada. Después de la desinfección, el material vegetativo se seccionó en trozos de 1 cm y se procedió a realizar la siembra en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar.

Los inóculos se sembraron en frascos tipo gerber con 20 ml. del medio Murashige y Skoog que fue suplementado con BA en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 y en combinación con 0.1 y 1.0 mg/l de ANA o AIB.

Los mejores resultados se obtuvieron en la combinación de BA (0.1, 1.0 y 2.0 mg/l) con 0.1 mg/l de ANA; sin embargo, el tratamiento de 2.0 mg/l de BA + 0.1 mg/l de ANA resultó ser el

mejor al obtenerse un promedio de 64.4 plántulas por inóculo; en el tratamiento 1.0 de BA+ 0.1mg/l de ANA se lograron 11.8 plántulas por inóculo (en promedio) y en el tratamiento con 0.5 mg/l de BA + 0.1mg/l de ANA se produjeron 9.6 plántulas por inóculo. En la combinación de BA y AIB, el tratamiento con 1.0 mg/l de BA y 1.0 mg/l de AIB produjo un promedio de 22.6 plántulas por inóculo y el tratamiento con 3.0mg/l de BA más 1.0 mg/l de AIB se obtuvo un promedio de 11.2 plántulas por inóculo.

INTRODUCCION

En México, la floricultura comercial es una actividad relativamente nueva que se ha desarrollado en forma acelerada en los últimos años, ya que la superficie dedicada a este renglón se incremento un 77% entre 1982 y 1989

En la actualidad se cuenta con cerca de 6,000 hectáreas destinadas al cultivo de flores, de estas solamente 700 has. se dedican a la exportación de los cuales del 45 al 50% se tienen en condiciones de invernadero

Las perspectivas para la floricultura han sido optimistas, ya que cada vez más, el sector oficial está tomando la producción de flores como una prioridad debido a su alto contenido de mano de obra, bajas necesidades de extensiones de terrenos, así como a la disposición de recursos agro climáticos, aunado a esto se dislumbra un desarrollo más amplio considerando la cercanía con el mercado norteamericano, que es el mayor consumidor de flores en el mundo

A nivel comercial la gloxinia (Sinningia speciosa) ocupa el segundo lugar en importancia después de la violeta africana, esto en cuanto a superficie cultivada. La gloxinia tiene una flor bella, esto hace que sea muy apreciada por los compradores; siendo demandada para decorar interiores de casas, oficinas, etc.

Usualmente, la producción comercial de gloxinia es por medio de semilla, aunque también pueda propagarse vegetativamente a través de tubérculos y esquejes de hoja; pero en la actualidad con los avances en la biotecnología es posible la propagación in vitro de

esta planta, siendo el propósito fundamental, obtener una gran cantidad de plantas sanas a partir de un segmento vegetativo y en forma continua durante todo el año.

Actualmente se han realizado trabajos con esta técnica propagándose la gloxinia a partir de hipocótilo y segmentos de cotiledón.

Por lo anterior en la presente investigación se plantean los objetivos siguientes

Objetivo general

1. Establecer la metodología para el cultivo *in vitro* de *Sinningia speciosa*

Objetivo específico.

1. Conocer el efecto organogénico del tejido foliar ante la presencia de dos auxinas (ANA) y (AIB) y una citocinina (BA)

Para este trabajo se plantean las hipótesis siguientes

- 1) Una mayor concentración de citocininas podrá estimular la brotación en los núcleos utilizados a partir de una relación citocininas-auxinas.
- 2) La zona de la nervadura es la más adecuada para estimular la organogénesis.
- 3) El proceso de enraizamiento se da con el nivel endógeno de las auxinas presentes en las plantas.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sinningia speciosa

Quando Conrad Loddiges, el encargado del vivero, imaginó a la nueva planta del Brasil como Gloxina speciosa en su obra "Gabinete botánico" en 1817, apenas podía imaginar que el nombre de la gloxinia llegaría a ser tan firmemente ligada a la horticultura y principalmente a la Sinningia speciosa o que iba a ser el progenitor de una de las plantas ornamentales más coloridas o vanadas actualmente. Probablemente ningún otro miembro de las Gesneraceas tenga una interesante y completa historia que este particular grupo de cultivo (1, 2).

2.1.1. Hábitat y distribución geográfica

El género Sinningia abarca cerca de 75 especies y es originaria de Brasil en donde existe la mayor cantidad de especies. Se distribuye desde el sur de México hasta Perú, Uruguay y el norte de Argentina (1, 2).

2.1.2 Descripción botánica

La gloxinia es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia Gesneraceae (2, 3). Son plantas herbáceas que llegan alcanzar una altura de 20 cm ; sus hojas son de forma ovalada, arqueada, opuestas y con bordes ondulados poblando la base del tallo. Tanto el envés como el haz están cubiertos de finos pelos; el color de la hoja varía de un tono verde claro a un intenso (5, 7).

Las flores se disponen a lo largo de la parte superior del tallo en un racimo lateral, las flores pueden ser erectas o inclinadas y en su forma pura pueden ser de color blanco, rojo, violeta y moradas, y que al ser cruzadas entre sí se obtienen flores bicoloreadas. Cuando

más de una flor aparece bajo la axila de una hoja, los pedicelos vellosos se unen en la base de un corto pedúnculo (9, 10)

El cáliz tiene una base tubular, redondeada, angulosa o atada, y 5 frondosos lóbulos anchos, y finos al igual que 5 ovarios tipo boquilla (6, 9)

La corola es un tubo largo que varía desde la forma acampanada a cilíndrica que se va ensanchando y expandiendo de 5 lóbulos redondeados. Presenta 4 estambres fértiles que tienen finos filamentos en la base del tubo de la corola. Las anteras están unidas en círculo, de 2 a 5 glándulas componen el disco alrededor del ovario medio inferior. El estilo alargado continúa hacia la parte superior con un estigma que generalmente tiene forma de boca. Cuando el fruto madura resulta ser una cápsula seca que se abre de 2 a 4 aberturas en la punta liberando semillas muy pequeñas y separadas (9, 10)

2.1.3. Importancia

Sinningia speciosa es una de las especies más estudiadas de la familia de las Gesneriaceae, en los E U, es tal su interés, que se ha creado la Sociedad Americana de la Gesneria y la Sociedad Americana de la gloxinia, con miles de socios (7)

La gran mayoría de las gloxinias actuales pertenecen al "Grupo Fitiana", las cuales tienen flores erectas en gran número de colores y estilos. Son exhibidas en muchos escaparates de tiendas floristas, por lo cual se ha incrementado su cultivo en los invernaderos (6, 7).

En Europa fue donde se empezaron a realizar investigaciones mucho antes del año 1900, y han continuado hasta hoy en día, por lo tanto para completar una lista de todos los

extravagantes nombres de cultivos, y para trazar su evolución se requeriría mucho tiempo y muchas páginas (2).

Los catálogos europeos y americanos contienen listas de cultivos desarrollados antes de 1900, entre estos, están "Defiance", "Emperador", "Frederick", "E. William", "Rey fuego", "Monte blanco", "Roides Rouges", etc (2, 31).

En Europa se enistan distorsiones bajo el erróneo nombre de gloxinia híbrida como *G. erecta*, *G. gigantea*, *G. grandiflora*.

Existe un creciente interés hoy en día en los E.U con la hibridación de las gloxinias, lográndose los híbridos H. Antonelli, H. Buell, H. de Smail, estos han llegado hacer frases familiares entre los americanos (2)

En México es una especie relativamente nueva debido a la poca divulgación ya que existen pocos productores que la conocen y por consecuencia no tienen datos estadísticos en ninguna institución tales como INEGI, SNIM o BCE (11)

2.2 Multiplicación asexual

La multiplicación vegetativa se caracteriza por la propagación de individuos genéticamente idénticos a la planta madre. Este tipo de propagación es posible debido a que cada una de las células de la planta contienen todos los genes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la misma, por lo la reconstitución de un individuo por ésta vía a partir de una célula o de un pequeño número de células se le conoce como "totipotencia celular" (12 , 11).

2.2.1. Técnicas convencionales de propagación de Sinningia speciosa.

Las gloxinias son plantas que se pueden propagar por vía sexual y asexual.

a) Propagación sexual Se efectúa por semilla y es la vía más utilizada para la producción comercial. La germinación se realiza en sustrato compuesto por turba de pantano, arena, perlita y vermiculita (11, 15, 19)

b) Propagación asexual Generalmente este género se propaga mediante tubérculo y esquejes de hoja. El tubérculo requiere de calor para favorecer la brotación, de tal manera que el calor se elimina cuando esta en crecimiento y a menos que sea invierno, ya que la gloxinia reacciona favorablemente en una atmósfera fresca. En cuanto al esqueje de hoja, se emplean hojas jóvenes que conservan el pedúnculo. El esqueje se siembra en un sustrato compuesto por arena y agrolita cubriendo hasta la mitad del pedúnculo. Por cada esqueje se obtiene una planta joven y vigorosa (11, 15).

2.3 Cultivo in vitro

2.3.1. Generalidades

Desde el año de 1860, aproximadamente, se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células, en las investigaciones de fisiología vegetal, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz, y de tallo, segmentos de hoja, órganos de tallo, primordios de hojas y flores, y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (20, 24, 8).

Podemos pensar que desde los primeros ensayos, tentativas, avances y logros en la obtención de los componentes más adecuados del medio de cultivo y condiciones ambientales, se enfocó especialmente a la obtención de plantas libres de patógenos y enfermedades y la propagación masiva de algunas especies de interés económico y

biológico. De acuerdo a éste último punto, para utilizar la técnica de cultivo *in vitro* se requieren algunos factores de importancia, como son: que la especie a propagar sea rentable económicamente, el uso de un medio nutritivo específico de acuerdo a la especie, las condiciones físico ambientales en que se van a incubar y adaptar el invernadero (10, 20, 8). En ésta última fase, es indispensable reducir la concentración de sales inorgánicas y carbohidratos para provocar que la planta, los fotosintetice por sí misma (9, 25, 30).

Muchas plantas de interiores como helechos, bromeliáceas, gesneráceas, plantas de follaje y ciertas especies de arbustos han sido propagadas por cultivo de tejidos (13,17)

Cabe mencionar que el número de especies de dicotiledóneas es relativamente mayor con 56 especies cultivadas, que el número de especies de las monocotiledóneas con solo 9 especies (14, 24)

La principal diferencia si es que existe, podría provenir de la tendencia hallada hacia la formación acelerada de meristemas radiculares y a su desorganización en callos que presentan las monocotiledóneas, todo lo contrario a las dicotiledóneas. En cuanto a la nutrición mineral y a los reguladores de crecimiento, parecen ser comparables con las dicotiledóneas (19, 24, 30).

2.3.2. Mecanismos de morfogénesis.

La morfogénesis es el estudio de los procesos involucrados entre un estado diferenciado como un proceso particular en la regeneración de las plantas y una forma no muy diferenciada, presentando dos mecanismos:

a) **Embriogénesis** Es el proceso mediante el cual una célula somática puede generar un embrión y posteriormente una plantula. En este caso, la formación del embrión no requiere de la participación de células huevo.

b) **Organogénesis** Es un proceso a través del cual diferencian órganos adventicios que son capaces de generar un individuo o planta completa.

Ambos mecanismos pueden ser inducidos directa o indirectamente. En el primer caso, la formación de tejidos (para la organogénesis) o embriones se forman sin la necesidad de proliferación de callo, en el segundo caso (indirecto) se requiere la participación de una proliferación celular (callo) a través de una diferenciación para producir estructuras vegetales (tejidos, órganos o embriones) (8, 10, 25, 30)

2.3.3. Propagación in vitro a partir de segmentos de hoja.

A pesar de que todos los cultivos de tejidos se originan de órganos o de sus secciones, la organización del progenitor no siempre se mantiene durante el desarrollo in vitro (24). Sin embargo, un cultivo de órganos tiene el objetivo de alcanzar a partir de una estructura organizada, la morfología y fisiología que la identifica con los órganos de su especie (8, 24)

Los primeros cultivos con los que se tuvo éxito fueron los de órganos. De esta forma Hanning logra tener de crucíferas por medio del cultivo de embriones obtenidos de frutos inmaduros (25).

Se han practicado, el cultivo in vitro de órganos muy inmaduros, como son las secciones de hojas, estos experimentos se han realizado en helechos y angiospermas. El objetivo de estos cultivos han sido el conocer hasta dónde se llega el desarrollo normal de dicho órgano en condiciones in vitro y que propiedades del medio contribuyen a su desarrollo (7, 20).

El cultivo de hojas se ha usado también en la propagación masiva, por ejemplo: en el café se emplean secciones de hojas con la finalidad de obtener embriones somáticos via formación de un tallo intermedio. También se han hecho experimentos con secciones de hoja de violeta africana para obtener brotes y posteriormente enraizarlos para una multiplicación clonal rápida (18, 25).

2.3.4. Factores que intervienen en el cultivo in vitro.

2.3.4.1. Selección del inóculo.

Se le conoce al inóculo o explante, a la pequeña área del tejido de la planta utilizada para iniciar un cultivo in vitro (11, 20).

La mayoría de las células vegetales tienen la capacidad de dividirse y crear un nuevo individuo completo y semejante al que se le tomó la muestra, a esta capacidad se le conoce como totipotencia celular (14, 15, 25).

Para elegir un explante adecuado se deben considerar los aspectos siguientes:

- a) El órgano que va a servir como fuente donadora del tejido.
- b) La edad y el estado fisiológico del órgano.
- c) La estación en la cual se obtendrá el inóculo.

- d) El tamaño del inoculo
- e) El origen y calidad de la planta de la cual se obtendrá el inóculo (20, 27)

2.3.4.2 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es importante en el establecimiento del inoculo in vitro. Cada tipo de tejido requiere de una formulación diferente, dependiendo del objetivo que se persiga. Los medios de cultivo están constituidos por un avance de macronutrientes requeridos en grandes cantidades por las plantas, como son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre, otros nutrientes son requeridos en pequeñas cantidades, llamados micronutrientes, siendo, el cloro, níquel, aluminio, hierro, entre otros (21, 25, 30).

La fórmula de Murashige y Skoog se empleará como ejemplo para los propósitos de esta investigación, pues se ha demostrado que es un medio adecuado para una gran variedad de especies así como para diferentes órganos de una planta (21, 22).

La sacarosa es la fuente carbohidratada de mayor uso en los cultivos, aunque en ciertos casos se recomiendan otros azúcares, como , la glucosa y la fructuosa. Esto depende del cultivo y la especie. Las vitaminas que se añaden a los medios pertenecen al complejo B (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, y el mio-inositol), de ellas la tiamina es esencial. Los aminoácidos son el otro grupo de sustancias orgánicas que algunos tejidos o células de ciertas especies requieren, a veces se agrega caseína hidrolizada o bien se agregan los isómeros-L de asparagina, glutamina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina, solos o combinados (21, 22, 25, 30).

Algunos productos naturales complejos suelen agregarse con la finalidad de enriquecer el medio de cultivo o favorecer una determinada respuesta en el inoculo, algunos de estos son: endosperma de coco, pulpa de plátano, jugo de tomate, de naranja y otros extractos de plantas, así como de levaduras. La pulpa de plátano y la emulsión de pescado se usan principalmente en los medios de cultivo de orquideas, mientras los primeros productos naturales tienen un uso más general (11, 22, 27)

2.3.4.3 Reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos a los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo, cualquier proceso fisiológico en las plantas. Pueden ser de naturaleza endógena, es decir que son sintetizados por el propio vegetal o sintéticos (exógenos) (14, 25, 28, 30)

La actividad de los reguladores de crecimiento exógenos dependen estrechamente de las condiciones de aplicación, el tipo y concentración que se utilice, del estado fisiológico de la planta tratada y de los fenómenos de interacción que entre ellos ocurra (14, 28)

La expresión actual de las investigaciones sobre la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta o secuencial de auxinas y citocininas. Consecuentemente para la multiplicación de brotes, la presencia de una auxina en el medio no es obligatoria, en la mayoría de los casos una citocinina sola es suficiente para inducir la multiplicación de los brotes (28, 30).

Los reguladores de crecimiento presentan características que en ocasiones suelen ser comunes; actúan en bajas concentraciones, pues en altas resultan tóxicos, solo interactúan

con otros reguladores. Los reguladores endógenos son metabolizados por la maquinaria celular, y son controlados rápidamente o eliminados, mientras los exógenos actúan solo interactúan con otros reguladores. Los reguladores endógenos son metabolizados por la maquinaria celular y son controlados rápidamente o eliminados, mientras, que los exógenos actúan durante más tiempo. Los reguladores más importantes en el cultivo *in vitro* son las auxinas y las citocininas (25, 28).

Auxinas. Es muy importante la elección de la auxina estando supeditada al objetivo del cultivo. Las auxinas más ampliamente usadas en el cultivo *in vitro* son: el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido B-naftoxiacético (NOA), y el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), consideradas auxinas fuertes (14, 25, 28).

Las principales funciones de las auxinas en el desarrollo de tejidos *in vitro* son el alargamiento celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callos), acción rizogénica, inhibición de la formación de vastagos axilares y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (14, 25).

Citocininas. Las citocininas más empleadas en cultivo *in vitro* son: la benzilamino purina (BA), cinetina (K), ambas sintéticas e isopentamilo adenina (2ip) y la zeatina de origen natural. La benzilamino purina y cinetina son las que se emplean con más frecuencia debido a su gran actividad y bajo costo (18, 25). Las citocininas han permitido grandes avances en la multiplicación vegetativa, ya que mantienen con vida a la célula, estimula la división celular, promueve la orientación de las células en la vía de la dediferenciación promoviendo la organogénesis, en la que brindan estimulación considerable a la formación

de brotes axilares debido a que disminuyen la dominancia apical, son antagónicas en la rizogénesis (25, 28, 30).

2.3.4.4. Condiciones de cultivo.

Los principales factores del medio ambiente son la luz y la temperatura, con respecto a la luz hay que considerar la intensidad lumínica comunmente de 3000 a 5000 Lux y con una duración de 15 a 18 h/día, generalmente proporcionada por tubos de Luz fluorescente blanca. La temperatura se establece entre los 22 y 23 grados centigrados, pero debe tomarse en cuenta si la especie en estudio es proveniente de clima templado o tropical, porque entonces se recomiendan temperaturas de 20 a 25 °C $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Existen algunos trabajos en los que se demuestran que a ciertas longitudes de onda, pueden activar ciertos fitocromos y que estos pueden inducir respuestas morfogénéticas (29, 30).

Los problemas de una mala gelificación se deben principalmente al empleo de un PH bajo, cuando el gel queda muy firme se debe a un PH elevado o a una excesiva cantidad de agar, generalmente el PH se ajusta entre 5.7 a 5.8 (29, 39).

3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Embriogénesis del Centro de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Chapingo, Estado de México.

3.1. Establecimiento del cultivo aséptico.

3.1.1. Obtención del inóculo.

Para la realización del trabajo se emplearon como inóculo hojas de plantas cultivadas en invernadero.

3.1.2. Medio de cultivo.

Para la elaboración del medio de cultivo de los experimentos realizados, se tomaron como base las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (1962), vitaminas, aminoácidos y cuya composición se observa en el cuadro 1. Además fue suplementado con 30 g/L de sacarosa; el pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl al 0.1 N. El medio fue solidificado con 7.5 g/L de agar. La esterilización del medio de cultivo se realizó a 121°C y a 1.14 Kg/cm² de presión durante 15 minutos y se distribuyó el medio con una jeringa dosificadora.

3.1.3. Desinfección y siembra.

A partir de la desinfección del material biológico hasta la siembra del mismo se realiza dentro de la cámara de flujo laminar. Las hojas fueron cortadas del tallo y lavadas con jabón con la ayuda de un cepillo de cerdas suaves y agua potable y se desinfectaron por inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos y posteriormente fueron sumergidas en

una solución de hipoclorito de calcio al 1.5% con dos gotas de Tween 20 durante 15 minutos; se enjuagaron con agua esterilizada (3 veces), a intervalos de 5 minutos por enjuagada.

Teniendo el material vegetativo desinfectado se corta en segmentos de un 1 cm y se procedió a realizar la siembra. Los inoculos se sembraron en frascos tipo gerber que contenían 20 ml. del medio de cultivo. A partir de la desinfección del material biológico hasta la siembra del mismo se realiza dentro de la cámara de flujo laminar

Los frascos con los inoculos se colocaron en un cuarto de incubación, con una intensidad de iluminación de 5000 lux proporcionadas por lámparas de luz blanca fluorescente en forma continua y con temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.1.4. Respuesta a los reguladores del crecimiento

Para el establecimiento del inóculo se efectuaron dos experimentos en los cuales se emplearon diferentes reguladores del crecimiento.

Experimento 1.

Para este experimento, al medio básico (MS) se le agregó ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.1 y 1.0 mg/L solo o en combinación con 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/L de benciladenina (BA). El experimento constó de 15 tratamientos, cada uno con 5 repeticiones (Cuadro 2).

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

SALES INORGANICAS			
MACROELEMENTOS	(Mg/L)	MICROELEMENTOS	(Mg/L)
KNO ₃	1900	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	KL	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Na ₂ -EDTA	74.50	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	55.60	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025

COMPUESTOS ORGANICOS			
Ac. nicotínico	0.5 mg/L	Mio-inositol	100 mg/L
Glicina	2.0 mg/L	Tiamina HCL	0.1 mg/L
Pinidoxina	0.5 mg/L	Sacarosa	30 g/L
Agar	7.5 g/L		

Cuadro 2. Combinación BA y ANA adicionadas al medio de cultivo.

BA	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
ANA					
0.0	1	2	3	4	5
0.1	6	7	8	9	10
1.0	11	12	13	14	15

Experimento 2.

En este experimento se empleo el ácido indolbutínico en concentraciones de 0.0, 0.1 y 1.0 mg./L que se incorporó al medio básico (MS) sólo o en combinación con 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg./L de benciladenina. En estas condiciones, el experimento constó de 15 tratamientos, cada uno con 5 repeticiones (Cuadro 3).

Cuadro 3 Combinación BA y AIB adicionadas al medio de cultivo.

BA	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
AIB					
0.0	1	2	3	4	5
0.1	6	7	8	9	10
1.0	11	12	13	14	15

3.2. Multiplicación del inoculo.

Para la fase de multiplicación del inoculo se emplearon las mismas concentraciones de bencilamino purina, indolbutínico y ácido naltaleneacético que se usaron para el establecimiento del inóculo (Cuadro 3). Los inóculos se sembraron en frascos tipo gerber que contenían 20 ml del medio.

La brotación inicial empezó en el tratamiento con 1.0 mg/L de BA y 1.0 mg/L de AIB a las 4 semanas después de sembrado el inóculo; en los tratamientos de 0.5 mg/L y 1.0 mg/L de BA en combinación con 0.1 mg/L de ANA la brotación se inició a las 5 semanas después de la siembra del inóculo. En los restantes tratamientos, la brotación apareció en el intervalo de 6 a 9 semanas.

3.3. Enraizamiento de brotes.

Para esta fase se empleó el mismo medio para multiplicación (0.1mg/L de ANA + 2.0 mg/L de BA), por lo que no fue necesario utilizar un medio inductor (mayor concentración de auxina) para la formación de raíz en las plántulas de 1 a 2 meses.

3.4. Análisis estadístico.

3.4.1. Toma de datos.

La toma de datos se realizaron cada dos semanas, tomándose los parámetros siguientes:

a) Tiempo de inicio de brotación. Dicha variable se midió en semanas a partir de la siembra del inoculo hasta la brotación.

b) Número de brotes. El conteo de los brotes generados por repetición se realizó de cuando las plántulas tuvieron un tamaño de 1 cm.

c) Longitud de brotes. Esta variable se midió a partir del momento en que las plántulas tenían de 2 a 4 cm antes de transferirse a la fase de adaptación al suelo.

3.4.2. Diseño experimental.

El diseño experimental que se utilizó fue el completamente al azar, teniendo dos experimentos; en el experimento uno se probaron BA y ANA con 15 tratamientos y 5 repeticiones por cada uno y en el experimento dos se probaron BA y AIB con igual número de tratamientos y repeticiones. Con las medias obtenidas en ambos experimentos se empleo la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Establecimiento del cultivo aséptico

4.1.1. Desinfección y medio de cultivo

El porcentaje de desinfección del inoculo fue efectivo en un 90% en los dos experimentos realizados y se tuvo un 95% de sobrevivencia del inoculo.

El medio (MS) empleado resultó satisfactorio en el establecimiento, inducción y crecimiento de brotes, multiplicación así como en la formación de raíz. Los resultados anteriores son similares al 92% de aséptica que se menciona por otro investigadores (20)

4.1.2 Respuesta del inóculo a reguladores del crecimiento.

En el establecimiento del inóculo, se observó que los tejidos provenientes de la parte central de la hoja, raquis o nervadura principal, tuvieron mejores respuesta a los reguladores que los de la periferia, además, además se observó que las hojas maduras tienen mayor respuesta tanto a la desinfección, sobrevivencia como a la generación de brotes (figura 1).

Efecto de relación ANA y BA

Las diferentes concentraciones en que se aplicó la BA en combinación con el ANA , mostró una acción preponderante sobre la relación en donde se combinó el BA con el AIB. La combinación BA/ANA mostró una elevada respuesta en la formación de brotes en los tratamientos 7 con 0.5/ 0.1 mg/L, 8 con 1.0/ 0.1 mg/L, 9 con 2.0/ 0.1 mg/L y 15 con 3.0/1.0 mg/L con valores promedio de 9.6, 11.8, 64.4 y 8.6, respectivamente (figura 2).

Figuras 1 y 2



Figura 1. Establecimiento del inóculo (hoja) en segmentos de 1 cm de tallo de banana suplementado con diferentes concentraciones de BA/ANA o BA/ABP.



Figura 2. Segmentos de hoja (inoculo) mostraron la formación de brotes.

Los tratamientos 4 con 2.0 mg/L y 5 con 3.0 mg/L de la citocinina dieron datos de 4.2 y 4.0 brotes promedio, respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos, en todos los tratamientos la concentración de la citocinina es mayor que la auxina lo que se refleja en la formación y multiplicación de los brotes (cuadro 8).

Efecto de la relación BA/AiB

La combinación BA/AiB fue muy irregular en todos sus tratamientos, excepto, en los tratamientos fueron 13 con 1.0/1.0 mg/L y el 15 con 3.0/1.0 mg/L, en los cuales se obtuvo un promedio de brotes de 22.6 y 11.2, respectivamente y con una altura promedio de 4cm. y en un tiempo de brotación de 3 a 4 semanas.

Otros tratamientos en los cuales se obtuvieron brotación fueron el 13 con 1.0 mg/L de BA, el 10 con 3.0 mg/L de BA y 0.1 mg/L de AiB y el 11 con 1.0 mg/L de AiB. Los datos promedios de brotación fueron 4.6, 5.0, 4.6, respectivamente. Con la excepción de del tratamiento 11, en los dos restantes, la relación hormona-brotación se comporta de acuerdo a lo esperado, concentración mayor de la citocinina que la auxina induce la formación de brotes(cuadro 9).

Aún cuando en este trabajo no estudiamos el efecto de cinetina (K) la capacidad de inducir brotación es más alta con la relación BA-ANA, y comparativamente la relación BA/AiB es mejor si comparamos los datos obtenidos en trabajos donde utilizó la combinación K-AiB, y cuyo promedio fue de 1 a 10 brotes (20).

4.2. Multiplicación del inóculo

4.2.1. tiempo de brotación

A partir de la siembra del inóculo y pasadas dos semanas se pudo apreciar que un aumento de volúmen y un ligero enrollamiento de la lámina foliar de la penferia hacia el centro del inóculo en ambas condiciones hormonales

El tratamiento 13 de la combinación BA/AIB presentó brotación en la cuarta semana de iniciado el cultivo y posteriormente le siguieron los tratamientos 7, 8, 9 y 15 de la combinación BA/ANA que tardaron de 5 a 6 semanas, siendo, éstos los que tuvieron una respuesta favorable a los reguladores de crecimiento. Los tratamientos restantes comenzaron su brotación a partir de la séptima semana, como se observa en los cuadros 8 y 9.

Hasta donde sabemos ninguno de los investigadores de los que han trabajado con esta especie han mencionado el tiempo de iniciación y formación de brotes como sucede sin embargo, en ninguno de los trabajos existentes se señala información sobre el tiempo de brotación(13,19,30).

4.2.2. Número de brotes producidos.

El análisis estadístico (ANDEVA) presentó diferencias altamente significativos en relación BA/ANA y combinación BA/AIB.

En los promedios comparados de relación BA/ANA (cuadro 8) se observó que el tratamiento de 2.0 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA) fue significativamente superior a los

Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable número de brotes de inóculo sembrado en medio suplementado con BA/ANA.

F.V	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft
Trats	14	4735.48	338.248	7.111	3.18
Error	60	2854.00	47.566		
Total	74	7589.48			

Cuadro 5. Prueba de Tukey

Tratamiento	Promedio	Tratamiento	Promedio
9	64.4	6	2.0
8	11.8	2	1.4
7	9.6	13	1.2
15	8.6	10	1.0
14	4.8	1	0.6
4	4.2	12	0.0
5	4.0	3	0.0
11	2.2		

Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable número de brotes de inóculo sembrado en medio suplementado con BAJAIB.

F.V	G.L	S.C.	C.M.	Fc	Ft
Trats	14	2490.187	177.870	13.059	3.18
Error	60	817.2	13.62		
Total	74	3307.387			

Cuadro 7. Prueba de Tukey

Tratamiento	Promedio	Tratamiento	Promedio
28	22.6	22	0.6
30	11.2	16	0.8
25	5.0	29	0.6
26	4.6	20	0.6
18	4.6	24	0.4
17	2.4	21	0.4
19	1.6	27	0.2
23	1.4		

Cuadro 8. Respuesta de los inoculos de *Sinzingia speciosa* , promedios de número y longitud de brotes, cultivados en el medio MS adicionado con la combinación BA con ANA.

TRATAMIENTOS	BA	ANA	TIEMPO DE BROTACION	NUMERO DE BROTES GENERADOS (X)	LONGITUD PROMEDIO DE PLANTULAS (CM)
1	0.0	0.0	8	0.6	1.9
2	0.5	0.0	9	1.4	2.0
3	1.0	0.0	8	0.0	2.5
4	2.0	0.0	7	4.2	2.3
5	3.0	0.0	8	4.0	2.0
6	0.0	0.1	8	2.0	2.4
7	0.5	0.1	5	9.6	2.2
8	1.0	0.1	5	11.8	2.5
9	2.0	0.1	6	64.4	4.1
10	3.0	0.1	7	1.0	2.6
11	0.0	1.0	8	2.2	2.0
12	0.5	1.0	9	0.0	1.9
13	1.0	1.0	7	1.2	2.1
14	2.0	1.0	8	4.8	2.6
15	3.0	1.0	6	8.6	2.8

demás tratamientos con un promedio de 64.4 brotes (figura 3), siguiéndole el tratamiento de 1.0 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA con un promedio de 11.8 brotes, y el tratamiento de 0.5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA con un promedio de 9.6 brotes, y el resto no presentó una diferencia significativa, manteniéndose dentro de un intervalo bajo de brotación.

La comparación de promedios realizados en la combinación BA/AIB (cuadro 9) mostró que el tratamiento de 1.0 mg/L de BA y 1.0 mg/L de AIB fue estadísticamente superior a los demás tratamientos con un promedio de 22.6 brotes; el tratamiento de 3.0 mg/L de BA y 1.0 mg/L de AIB con un promedio de brotación de 11.2 fue segundo más importante y el resto de los tratamientos mostró una diferencia significativa baja.

De acuerdo a lo anterior, se observa que el tratamiento 9 fue muy superior en promedio al resto de los tratamientos, incluyendo al tratamiento 13 del experimento dos, sin embargo, se observó que los brotes del primero fueron de color verde-claro con tallos raquíticos; mientras que los brotes del tratamiento 13 experimento dos presentaron color verde oscuro y tallos más vigorosos.

Gloxinia se ha propagado usando como inóculo hoja y utilizando como reguladores a la cinetina y al AIB, en dos tratamientos, y los resultados señalan que tratamiento con 0.5 de K y 2.0 mg/L de AIB se obtuvo un promedio de 7 a 10 brotes (13, 20, 30), promedio que fue menor al obtenido en el presente trabajo. Desafortunadamente éste es, hasta donde sabemos, el único trabajo en la literatura de gloxinia in vitro con el cual se trata de establecer y definir la capacidad morfogénica de esta especie. Aparentemente esta respuesta es menor que otras especies de la misma familia, como sucede con violeta

africana que en algunos trabajos mencionan alto número de plántulas (en promedio 45 por inóculo) inducidas a partir de segmentos de hoja (11).

Cuadro 9. Respuesta de los inoculos de *Sinningia speciosa*, promedios de número y longitud de brotes, cultivados en el medio MS adicionados con BA y AIB.

TRATAMIENTOS NÚMEROS	BA	AIB	TIEMPO DE BROTACION (SEMANA)	NÚMERO DE BROTOS GENERADOS	ALTURA DE BROTOS (CM.)
1	0.0	0.0	6	0.8	1.8
2	0.5	0.0	5	2.4	2.4
3	1.0	0.0	7	4.6	2.3
4	2.0	0.0	8	1.6	2.0
5	3.0	0.0	6	0.6	1.9
6	0.0	0.1	7	0.4	2.0
7	0.5	0.1	5	0.8	2.1
8	1.0	0.1	9	1.4	1.8
9	2.0	0.1	6	0.4	2.2
10	3.0	0.1	7	5.0	2.4
11	0.0	1.0	5	4.6	2.7
12	0.5	1.0	6	0.2	2.4
13	1.0	1.0	4	22.6	2.8
14	2.0	1.0	7	0.6	2.5
15	3.0	1.0	8	11.2	2.4

4.2.3. Longitud de brotes.

Para ésta variable no se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) ya que casi todos los brotes de los tratamientos presentaron una longitud homogénea con las combinaciones hormonales que se emplearon en este trabajo , a excepción del tratamiento 9 de la combinación BAVANA el cual tuvo la mayor longitud (4.1 cm) en un tiempo de 4 a 5 meses (figura 4).

Los datos fueron tomados después de 16 a 20 semanas de iniciado el cultivo. La longitud promedio de los tratamientos se observa en los cuadros 8 y 9.

4.3 Enraizamiento de brotes

La formación de raíces se observó en medio para multiplicación adicionado con baja concentración de auxina (0.1mg/L) cuando las plántulas tenían de 1 a 2 meses(figura 5) Se obtuvo el 100% de plántulas enraizadas. Con la raíz formada la plántula pudo ser transfenda suelo (figura 6) para esperar a la floración (figura 7). No obstante, alrededor 60 de plántulas que se sembraron en medio sin de auxina, el 100% formaron raíz, esto nos hace pensar que auxina endógena que tiene la hoja ,estimula la rizogénesis,por lo que es posible pensar que, al menos esta especie, no requiere de un regulador de crecimiento para formar raíz.

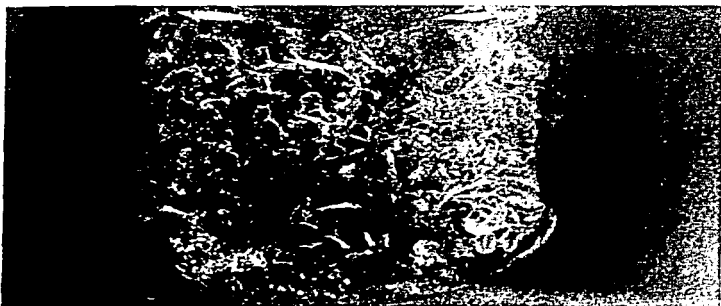


Figura 3. Inducción de proliferación de *Brotea* tras 10 días de cultivo en presencia de 0.1 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA.



Figura 4. Efecto de la proliferación de *Brotea* tras 10 días de cultivo en presencia de 0.1 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de BA.

Figura 5



Figura 5 Formación de raíz en plántulas transferidas a medio para enraizamiento

Figuras 6 y 7



Figura 6 Plántulas enraizadas transferidas a suelo para su adaptación.



Figura 7. El primer día de vida de las plántulas obtenidas in vitro.

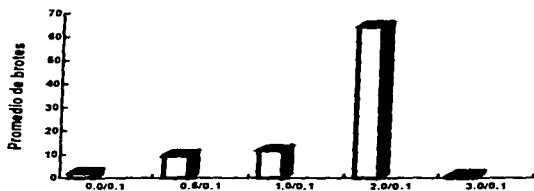


Figura 6. Efecto de la combinación de BA/ANA en la proliferación de brotes



Figura 7. Efecto en la proliferación de brotes de diferentes concentraciones de BA/ANA y BA/AIB.

CONCLUSIONES

1. Para estimular la formación de brotes se requiere de mayor concentración de cito-cinina que de auxina
2. El tratamiento 9 (2.0 mg/L de BA con 0.1 mg/L de ANA) se sugiere se utilice para la obtener alta brotación.
3. El tratamiento 13 (1 mg/L de BA con 1 mg/L de AIB) se recomienda sea utilizado para el vigor de las plántulas.
4. Para la formación de raíz no se requiere la utilización de un medio enraizador, ya que suponemos que la concentración endógena de auxinas presentes en el ino-culo fue suficiente para inducir la rizogénesis.
6. El empleo de tejido foliar como inóculo es una manera adecuada para la pro-pagación comercial de gloxinias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Annals of the Missouri botanical Garden. 65: 683-686
2. Arnold, P. 1975. The gesneriad register: *Sinningia*. The American gloxinia Gesneriad society 67 pp and 21 appendix.
3. Bancomext y Secofi, 1988 Sector agroindustrial: Flores de corte. Estudio elaborado para el gobierno de México por Booz Allen Hamilton e infotec, México, D. F. 69 pp
4. Clayberg C. D. 1968. Biosistematic studies in *Sinningia* and *Reichsteineria* (Gesneraceae). Amer. J. Bot. 55(7): 829-833.
5. Conger, B. U. 1980 Cloning Agricultural Plants via *in vitro* Techniques. C. R. C. Press, Inc Boca Raton, Florida, pp 709.
6. Chu, I Y. E. and Kutz, S L. 1990. Commercialization of plant micropropagation. In. Handbook of plant cell culture. Vol. 5 Ornamental species. pp 126-164
7. Del Cañizo, P. J. A. 1977. Plantas en el hogar, plantas de interiores, plantas en maceta al aire libre y flores cortadas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
8. Diaz, A.J. 1983. Producción comercial de plantas de ornato. foliajes. fondo de garantía y fomento para la agricultura, Ganadería y Avicultura. Mex pag. 70-71

9. Evans, D.A., Sharp, W.R. y Flick, C.E. 1981. Growth and behavior of all culture: Embriogénesis and organogénesis. In: Tissue culture, methods and aplications in agriculture Thorne, T.A (Eds) Academic Press, New York. pp 45-113.
10. Fischer, G. and Zimmer, K. 1987. Multiple Schoof formation from in vitro germinated seeds. Gartenbauwissenschaft. 52:3, 135-140.
11. Flick, C.E., Evans, D.A , Sharp, W.R. 1983. Organogénesis - In: Sharf, W.R., Ammirato, P.V. y Yamada, y (Eds). Macmillan Publishing New York pp 13-81.
12. Flores,H.E., Fierro, C.A. and Koo, F.K.S. 1976. Tissue culture of african violet (Saintpaulia ionantha Wendl.) Proc 24th Ann. Con. Am. Soc. Hort. Sci. Tropical Region. pp 449-454
13. Haramaki, C. 1971. Tissue culture of gloxinia. Com.Proc. Intl. Plant Propagation Soc. 21: 442
14. Harmann, H. T. y Kester D. E. 1988. Propagación de plantas. Pncipios y Prácticas. 4a. ed. Ed. CECSA. México 170p.
15. Hessayon, D. G. 1989. Plantas de interior: Manual de cultivo y Conservación. Ed. Blume, S.A. Madrid España pp. 190
16. Hughes, W.K. 1981. Ornamental Species. In: Cloning Agricultural Plants via in vitro techniques. Conger, B.V. (Eds). C. R. C. Press. pp. 5-52.
17. Hurtado, M.D. y Merino, M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. México. pp. 15-34.

18. Jacobi, K. 1982. *Plantas de interior, guía práctica*. Ed Reverté. España. pp. 120.
19. Jin, H. 1988. *Plantas de interior*. SUSAETA. Madrid. pp. 120
20. Johnson, B.B. 1978. In vitro propagation of gloxinia from leaf explants. *HortScience* 14. 605-605 .
21. Larson, R.A. (1988). *Introducción a la floricultura*. A. G. I. Editor, S A México, D.F. Págs. 259-262.
22. Lawrence, A.M. George (195). *toxonomy of, vascular planta* Macmillan Publishing Co. United. States of America.
23. Margara, J. 1988. *Multiplicación vegetal y cultivo in vitro. Los menstemos y las organogénesis*. Mundi-Prensa. Madrid 230p.
24. Miller. L.R. y Murashige, T. 1976. *Tissue culture propagation of tropical foliage plants*. *In vitro*. 12(12) 797-813.
25. Murashige, F. y Skoog, F. 1962. *A revised medium for rapid growth an bioassays with tabaco tissue cultures*. *Phys. Plant.* 15: 473-493
26. Murashige, T. 1974. *Plant propagation through tissue cultures* *Ann. Rev. Plant Phys.* 25. 135-166.
27. Murashige, T. 1978. *The impact of plant cell culture on agnculture*. In: *Fronters of Plant Tissue Culture*. Trevor, A. (Eds). Calgary Alberta, Canada pp. 15-26.

28. Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants From tissue cultures.
In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.
Reinert, J. y Bajaj Y.P.S. (eds). Springer-Verlag Berlin pp 179-245.
29. Pienk, R. L. M. 1990 Cultivo in vitro de las plantas superiores, Mundi-
Prensa. Madrid. 326
30. Raman, K. 1977. Rapid multiplication of Streptocarpus and gloxinia from
in vitro culture pedicel segments Z. Pflanzenphysiol 83 411-418.
31. Reinert, J., Bajaj, Y. P. S. y Zbell, B. 1973. Aspects organización Em-
briogénesis, cytodifferentiation. Plant tissue and cell culture 12(8) 20-24.
32. Sunset Books and sunset Magazine (1985) How to Grow African Violets.
Lance Publishing Co. Menlo Park, California, U S A pp 59-61.
33. Takeuchi, M. 1973. Método de cultivo de tejidos vegetales Colegio de
Postgraduados. U. A. CH. México.
34. Vidalie, H. 1983. Producción de flores y plantas ornamentales
Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 60-63.
35. Vidalie, H. 1986. Cultivo in vitro. Editorial científica México. 190 p.
36. Willis, V. L. 1988. A. Dictionary of the flowering plants ferns. 8th
ed. Cambridge University Press Great Britaire.