

MICROPROPAGACION DE GLOXINIA
(Sinningia speciosa): UNA ALTERNATIVA
A LA PROPAGACION POR SEMILLA

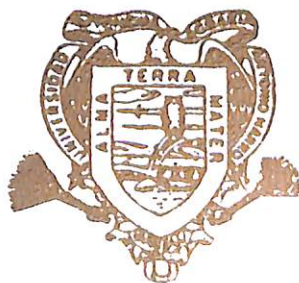
ALICIA CADENAS RAMIREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN TECNOLOGIA DE SEMILLAS



BIBLIOTECA
EGIDIO G. REBONATO
BANCO DE TESIS
U.A.A.A.N.



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

OCTUBRE DE 1999

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

MICROPROPAGACION DE GLOXINIA (*Sinningia speciosa*):
UNA ALTERNATIVA A LA PROPAGACION POR SEMILLA

TESIS

POR

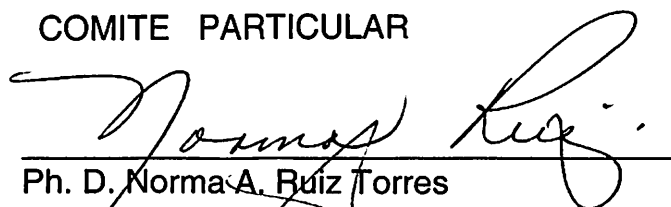
ALICIA CADENAS RAMIREZ

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN TECNOLOGIA DE SEMILLAS

COMITE PARTICULAR

Asesor principal:


Ph. D. Norma A. Ruiz Torres

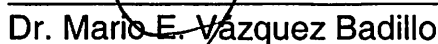
Asesor:


Ph. D. Marco A. Bustamante García

Asesor:

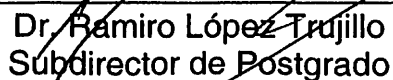

Ph. D. Froylán Rincón Sánchez

Asesor:


Dr. Mario E. Vázquez Badillo

Asesor:


M. Sc. Leticia A. Bustamante García


Dr. Ramiro López-Trujillo
Subdirector de Postgrado



Buenavista, Saltillo, Coahuila, Octubre de 1999

BIBLIOTECA
EGIDIO G. RIVERA
BANCO DE TIEMPO
U.A.A.A.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la maestría.

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" y al Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas por haberme brindado la valiosa oportunidad de superarme profesionalmente.

A la Dra. Norma Angélica Ruiz Torres por su gentileza, dedicación y al apoyo constante en la investigación.

Al Dr. Marco A. Bustamante García por sus sugerencias durante la investigación

Al Dr. Froylán Rincón Sánchez por su gran apoyo en los aspectos estadísticos de la investigación.

Al Dr. Mario E. Vázquez Badillo por sus sugerencias y apoyo en los análisis de calidad.

A la M.Sc. Leticia A. Bustamante García por su intervención como jurado examinador.

A la Dra. Jana Sandala Carrum Cedillo por motivarme, e inculcarme el amor a la vida.

Al M.C. Humberto de León Castillo y Al M.C. Luis A. Muñoz Romero por su amistad y apoyo durante la estancia en esta Universidad.

A mis amigos Carmen, Emilio, José Antonio, Chablé, Paulino, Luis y Salvador Ocegueda por su gran amistad, así como a mis compañeros de maestría con quienes tuve una agradable convivencia.

A todos los maestros del CCDTS, quienes lograron infundir en mi el deseo constante de superación.

A TLQ. Laura Durón Ochoa por su valiosa colaboración en este trabajo de investigación.

Al Sr. Gil Cabrera Villa y familia por su gran amistad y apoyo durante mi estancia en Saltillo y a todas las personas que de alguna manera colaboraron para que mi estancia en Saltillo fuera agradable.

DEDICATORIA

A DIOS:

Por estar presente en todo momento y hace sentir en mí esa gran fuerza interior que me impulsa cada día a seguir adelante.

A MIS PADRES:

Urbano Cadenas Neri y Columba Ramírez Mendez.

A quienes con respeto y gran cariño les dedico este trabajo, por el apoyo, orientación que en todo momento me han brindado.

A MIS HERMANOS:

Luis Ramón, Oscar, Jorge y Edith por el cariño y armonía familiar que nos une.

A todas aquellas personas que han depositado en mí su amistad y confianza.

MIL GRACIAS.

COMPENDIO

Micropropagación de Gloxinia (*Sinningia speciosa*): Una alternativa a la propagación por semilla.

POR

ALICIA CADENAS RAMÍREZ

MAESTRIA

TECNOLOGIA DE SEMILLAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE 1999.

- Asesor - Dra. Norma A. Ruiz Torres.

Palabras claves: gloxinia, reguladores del crecimiento, micropropagación, calidad de semilla, germinación, latencia.

Los objetivos del presente trabajo fueron: Establecer un protocolo para propagar gloxinia *in vitro*; Determinar si existen diferencias entre genotipos en su

respuesta al cultivo *in vitro*; Determinar si existen diferencias entre tipos de explantes y Determinar la calidad fisiológica de la semilla importada.

El trabajo consistió de dos fases: 1) Establecimiento de un protocolo para propagar gloxinia *in vitro* y 2) El análisis y estudio de calidad fisiológica de semilla, en ambos estudios se utilizaron los genotipos de gloxinia "Red mix" y "Pin mix". La fase de micropropagación consistió de cuatro etapas: Establecimiento del cultivo en un medio MS sin sacarosa; Multiplicación de tallos, en medio MS con 30 gL⁻¹ sacarosa y con una combinación de tratamientos de AIA (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mgL⁻¹) y Cinetina (0.0, 5.0, 10 mgL⁻¹) o BAP (0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mgL⁻¹); Enraizamiento, los tallos generados en la etapa anterior fueron transferidos a un medio 1/2 MS suplementado con AIA o AIB (1.0, 0.1, 0.5, y 1.0 mgL⁻¹); Etapa de aclimatación, las plántulas generadas se transfirieron a sustrato. En todos los casos se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial.

Los resultados del estudio de micropropagación mostrando diferencias significativas entre variedades, tratamientos y días de muestreo para las variables número y longitud de brotes, indicando que las variedades respondieron de manera diferente a los tratamientos evaluados a través de los diferentes días de muestreo. El tratamiento 10 (0.8 mgL⁻¹ AIA + 1.4 mgL⁻¹ BAP) produjo el mayor número de brotes/explante y de mayor longitud, mostrando el mejor comportamiento el genotipo "pink mix".

El análisis de varianza para la etapa de enraizamiento detectó diferencias significativas para las fuentes de variación variedades, días de muestreo y tratamientos, para las variables número y longitud de raíces. Mientras que los análisis por variedad muestran únicamente diferencias significativas para la fuente de variación días de muestreo. Mostrando que los tratamientos evaluados tuvieron un efecto similar en la iniciación de raíces y desarrollo.

En la etapa de aclimatación se logró un 100 por ciento de sobrevivencia de plántulas de gloxinia.

El genotipo Pink mix mostró mejor desarrollo y adaptación durante la etapa de aclimatación.

En el estudio y análisis de semilla se evaluaron dieciocho tratamientos para incrementar el porcentaje de germinación y eliminar latencia, siendo el tratamiento ocho que corresponde a ácido giberelico a 600 ppm por dos minutos y Biozyme concentrado los que dieron mejores resultados.

ABSTRACT

Micropropagation of Gloxinia (*Sinningia speciosa*): The alternative of seed propagation.

BY:

ALICIA CADENAS RAMIREZ

MASTER OF SCIENCE

SEED TECHNOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTOBER 1999.

Dra. Norma A. Ruiz Torres - Advisor -

Keys words: gloxinia, regulators of growth, micropropagation, quality of seed, germination, dormancy.

The gloxinia (*Sinningia speciosa*), an excellent house plant, has great marketing characteristics like: small plant size, attractive flower size and color, besides it grows under low light intensities. It is mainly grown from seed,

although it has low germination rates. The objectives of this study were: to establish a method to propagate gloxinia *in vitro*, to determine if there are differences between genotypes in their response to the *in vitro* propagation, to identify the best type of explant and to determine if gloxinia seed presents low viability or dormancy.

After evaluating eleven treatments in both genotypes to induce shoot formation in explants, it was determined as the best treatment a combination of IAA and BAP (0.8 mgL^{-1} and 1.4 mgL^{-1} , respectively). To induce root formation seven treatments were evaluated, and no significant differences were found among them.

There were found significant differences between genotypes in their response to the *in vitro* propagation, being the pink genotype the best performing. The explant that responded the best consisted of leaf segments with vein.

During the acclimatization step a one hundred percent survival was obtained in both genotypes.

Seed analysis, detected seed dormancy, find out as the bests treatments to break it to be gibberelic acid at 600 ppm for two minutes (treatment eight) and Bozyme (treatment 17).

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xv
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	6
Generalidades de la Gloxinia.....	6
Reguladores del Crecimiento.....	9
Auxinas.....	10
Citocininas.....	12
Micropropagación.....	14
Organogénesis directa.....	15
Propagación <i>in vitro</i> de ornamentales.....	16
Calidad de las semillas.....	23
Componentes de la calidad de semillas.....	23
Germinación estándar.....	26
Latencia de semillas.....	28
Métodos para romper latencia.....	33
MATERIALES Y METODOS.....	37
Micropropagación.....	37
Etapa de Iniciación o Establecimiento del cultivo.....	38
Desinfestación del Material Vegetativo (Explantes).....	39

Siembra.....	39
Incubación.....	40
Etapa de multiplicación de tallos.....	40
Etapa de enraizamiento.....	42
Etapa de aclimatación de la planta.....	43
Estudio de calidad de la semilla.....	44
Material experimental.....	44
Peso de mil semillas.....	45
Capacidad de germinación.....	46
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	49
Análisis de varianza.....	50
Experimentos con mediciones repetidas.....	51
Análisis de regresión.....	52
RESULTADOS Y DISCUSION.....	53
Etapa de Iniciación o establecimiento del cultivo.....	53
Etapa de multiplicación.....	55
Etapa de enraizamiento.....	72
Etapa de aclimatación.....	80
Calidad de la semilla de gloxinia.....	83
Peso de mil semillas.....	83
Capacidad de germinación.....	83
CONCLUSIONES.....	89
LITERATURA CITADA.....	90
APENDICE.....	96

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
3.1.	Tratamientos utilizados para inducir formación de tallos en explantes de gloxinia.....	41
3.2.	Tratamientos utilizados para inducir enraizamiento en tallos de gloxinia generados <i>in vitro</i>	43
3.3.	Tratamientos para inducir germinación evaluados en laboratorio en semilla de gloxinia.....	48
4.1.	Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables evaluadas <i>in vitro</i> durante la etapa de multiplicación de tallos.....	55
4.2.	Medias de número de brotes obtenidos a diferentes fechas de muestreo en gloxinia cultivada <i>in vitro</i>	57
4.3.	Medias para las variables número de brotes y longitud de brote en la etapa de multiplicación de tallos de gloxinia cultivados <i>in vitro</i> a diferentes días.....	59
4.4.	Medias de tratamientos utilizados para las variables evaluadas en la etapa de multiplicación de tallos de gloxinia cultivados <i>in vitro</i>	61
4.5.	Cuadrados medios del análisis de varianza para un modelo con mediciones repetidas para la etapa de multiplicación de tallos en la variedad roja.....	63
4.6.	Cuadrados medios del análisis de varianza para un modelo con mediciones repetidas para la etapa de multiplicación de tallos en la variedad rosa.....	68
4.7.	Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables evaluadas en la etapa de enraizamiento.....	72

4.8.	Medias de variedades, días y tratamientos para las variables en estudio en la etapa de enraizamiento.....	74
4.9.	Cuadrados medios del análisis de varianza para número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR) de la variedad roja en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i>	77
4.10.	Cuadrados medios del análisis de varianza para número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR) de la variedad rosa en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i>	78
4.11.	Cuadrados medios del análisis de varianza y coeficientes de variación de las variables de calidad fisiológica evaluadas en la semilla de gloxinia.....	85
4.12.	Medias de tratamientos de la variable plántulas normales (PN) en dos variedades de semilla de gloxinia.....	86

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
4.1.	Etapa de Iniciación o Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de gloxinia.....	54
4.2.	Influencia de los reguladores del crecimiento en la multiplicación de tallos en la variedad roja.....	58
4.3.	Multiplicación de tallos en la variedad rosa a los 45 días después de la siembra <i>in vitro</i>	58
4.4.	Comportamiento de los tratamientos sobre la variable número de brotes en la variedad roja.....	66
4.5.	Efecto de tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la variedad roja.....	67
4.6.	Comportamiento de auxinas y citocininas a través del tiempo sobre la variable número de brotes (NB) en la variedad rosa...	70
4.7.	Efecto de los días sobre los tratamientos en la variable longitud de brotes (LB) en la variedad rosa.....	71
4.8.	Enraizamiento de tallos de gloxinia, variedad rosa, a 80 días <i>in vitro</i>	79
4.9.	Tallos enraizados a los 90 días después de la siembra en la variedad rosa.....	79
4.10.	Aclimatación de tallos de gloxinia, a los 105 días de cultivo <i>in vitro</i>	81
4.11.	Transferencia de plantulas de gloxinia a maceta individual a los 30 días de aclimatación.....	82
4.12.	Planta de gloxinia en la fase de floración, después de 180 días a partir de la siembra <i>in vitro</i>	82
4.13.	Prueba de germinación de la semilla de gloxinia.....	84
4.14.	Comportamiento de las variables fisiológicas en la variedad roja y rosa.....	84

INTRODUCCION

Inicialmente la floricultura sólo fue importante como una actividad humana más y como tal tomó una tendencia de crecimiento progresivo hasta llegar a convertirse en una actividad por demás lucrativa.

Durante las décadas de los 60's y los 70's, la actividad ornamental se limitaba a la producción de plantas de ornato para jardinería a nivel local, o bien a la producción de flor de corte en áreas con clima adecuado para el mercado nacional. A partir de esta época y debido a los adelantos tecnológicos de mercadeo y por influencia de países consumidores, México se inicia en la producción y exportación de plantas ornamentales.

Durante los 80's se presenta un gran crecimiento de esta actividad, pero desafortunadamente también una fuerte caída a finales de esta misma década por falta de políticas de mercadeo. Esta situación crea una diferente forma de ver el mercado de las ornamentales tanto en el ámbito nacional como de exportación. Esto trajo consigo un desarrollo tecnológico más formal de otras actividades de este sector como es el viverismo o bien la propagación de material vegetativo.

El negocio de plantas ornamentales en México, principalmente plantas de maceta es una industria próspera, ya que existe una gran demanda dentro del mercado nacional e internacional, además es un medio factible para introducir divisas al país. Actualmente la floricultura tiene gran importancia por el aumento progresivo de microempresas que se dedican a la producción de flores de corte, plantas de maceta, semillas, rizomas, bulbos y otros que se ofrecen en el mercado.

Entre las especies ornamentales de mayor interés se encuentra la gloxinia (*Sinningia speciosa*), la cual en los últimos años ha tenido una gran demanda debido principalmente a sus flores de gran colorido, facilidad de manejo, poco espacio para desarrollarse y adaptación a condiciones de interior (temperatura y humedad), que en general viene a ser el ambiente más común en los hogares. Su principal función es de tipo decorativo, esto le ha valido el gusto y preferencia de las amas de casa que son sus principales y más importantes consumidores.

La gloxinia se propaga principalmente por semilla, esta forma de propagación presenta problemas entre los que se pueden citar: bajos porcentajes de viabilidad y germinación, costo elevado de la semilla, permiso de importación, sanidad y el tiempo requerido para obtener una planta comercial que fluctúa entre siete y ocho meses.

Es importante mencionar que en nuestro país existen laboratorios de cultivo de tejidos que producen un gran número de especies de ornato que se regeneran *in vitro*, por ejemplo orquídea, crisantemo, violeta africana, gerbera, rosa, etc., de alta calidad.

El futuro de la propagación *in vitro* es sumamente promisorio, el desarrollo de esta nueva tecnología ha dado grandes resultados, entre los que destacan: producción masiva de material libre de virus, mayor vigor y homogeneidad genética, lo cual ha permitido incrementar la productividad y calidad de especies leguminosas, forestales, frutales, papa, cereales y flores de ornato de gran valor estético y comercial.

Nuestro país tiene gran vocación florícola, lamentablemente ha faltado mucha educación al respecto, pero al igual que en muchas otras áreas de la agricultura, la floricultura presenta serias carencias en cuanto al desarrollo de tecnologías nacionales que ayuden a mejorar los procesos de producción que actualmente tienen que ser importados o adaptados de tecnologías extranjeras.

La justificación del presente trabajo radica en la necesidad de establecer un protocolo para propagar gloxinia con la finalidad de acortar el periodo de producción, producir plantas libre de enfermedades y generar tecnología, con ello evitar la fuga de divisas, provocado por la compra de

semilla a altos precios, por lo que se propone la alternativa de propagar la gloxinia a través del cultivo de tejidos.

El presente estudio fue realizado bajo los siguientes objetivos e hipótesis.

Objetivos

- ◆ Establecer un protocolo para propagar gloxinia *in vitro*.
- ◆ Determinar si existen diferencias entre genotipos en su respuesta al cultivo *in vitro*.
- ◆ Determinar si existen diferencias entre tipos de explantes.
- ◆ Determinar la calidad fisiológica de la semilla importada utilizada en la propagación convencional.

Hipótesis

- ♣ La gloxinia puede ser propagada mediante el cultivo de tejidos.

- ♣ Existen diferencias entre genotipos en su respuesta al cultivo *in vitro*.

- ♣ La respuesta a la propagación *in vitro* depende del tipo de explante.

- ♣ La semilla de gloxinia presenta baja viabilidad y/o latencia.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades de la Gloxinia

La gloxinia es originaria del Brasil y pertenece a la familia Gesneriáceae, la cual incluye 125 géneros y más de 2000 especies. De esta cantidad solamente se han cultivado unas 300 especies (Burt, 1967). Para el floricultor comercial los dos miembros más importantes de las Gesneriáceas son la *Sinningia speciosa* y *Saintpaulia ionantha*.

La *Sinningia speciosa* fue inicialmente llamada *Gloxinia speciosa* por Conrad Loddiges en 1817. Este personaje fue un viverista inglés que dedicó gran parte de su vida a estudiar esta planta originaria del Brasil. La mayoría de las gloxinias del florista son de la variedad conjunta *fyfiana*, cuyo nombre se origina de la cruce *gloxinia* x *fyfiana* (Moore, 1957).

La planta fue introducida a los Estados Unidos a fines de 1950 y desde entonces ha ocupado un lugar muy importante (Shalit, 1976).

La gloxinia es una planta herbácea, perenne, tuberorrizomatosa, de tubérculo gris oscuro. Acaulescente, tiene uno o más tallos con hojas en pares.

La lámina de la hoja es de un matiz brillante, grande, ovalada, aterciopelada, carnosa y extremadamente vulnerable. Las flores varían de las que tienen una ligera forma de campana hasta las que tienen una forma alargada tubular o cilíndrica, bellas y de gran colorido. Existen variedades matizadas, estriadas o con manchas de diferentes colores. La planta alcanza de 10 a 15 cm de altura, aunque el tamaño puede variar (Moore, 1957)

A través de la hibridación y la selección, las gloxinias pueden ser de flores dobles o sencillas, de colores que varían del blanco al rosa hasta el púrpura oscuro. Las variedades sencillas incluyen "Improved red velvet" con grandes flores rojas cardenal rizadas, "White velvet", de color blanco, "Pink velvet", de color rosa pálido con un centro de color más oscuro y "Royal velvet" de color púrpura oscuro; las variedades de flores dobles son "Royal red" de color rojo oscuro, "Royal frosted red" de color rojo oscuro con orilla blanca, "Royal pink", de color rosa pálido y "Royal frosted white" de color blanco (Kimmins, 1988).

La gloxinia puede propagarse principalmente de dos formas: sexual y vegetativa (AGGS, 1997). La propagación sexual o por semilla mediante la cual se logran nuevas plantas individuales con características que reflejan la contribución genética de ambos progenitores, ha sido la forma de reproducción de esta especie por años (Hartmann y Kester, 1995).

Una gran cantidad de especies de la familia Gesneriáceas, especialmente la gloxinia produce semilla muy pequeña, poco disponible y con problemas durante la germinación. Todos estos factores hacen que este método de propagación no sea el ideal para los viveristas, ya que pierden un gran número de plántulas. Al utilizar semilla se requiere de siete a ocho meses para lograr una planta con una sola cabezuela de tamaño óptimo con valor comercial (Michigan State University, 1997).

Los viveristas enfrentan los problemas antes mencionados y además el sistema toma tiempo para producir plantas o variedades comerciales. La semilla se siembra en un medio sin suelo, utilizando vermiculita perlita, turba o musgo turboso bien drenado, la semilla por ser muy pequeña, no debe enterrarse, solo presionar sobre la tierra con una tablilla. En el invernadero, o en el local donde se coloquen las macetas, debe estar muy iluminado, la temperatura no debe ser inferior a 18°C. Deben regarse frecuentemente en forma de lluvia. (Kimmins, 1988; Hartmann y Kester, 1995).

La otra alternativa es la multiplicación vegetativa por cortes de hojas y tallos, con esta técnica, las características propias de cada planta individual se conservan en la descendencia (AGGS, 1997).

Otra técnica que ha tenido éxito en la propagación de ornamentales es la propagación *in vitro*, existiendo un solo trabajo reportado en México para

gloxinias (Serrano *et al.*, 1998). En otras partes del mundo, son muy pocos los trabajos reportados de propagación *in vitro* de gloxinia. Sin embargo, se han hecho varios estudios de propagación *in vitro* en violeta africana, estos estudios pueden ser utilizados como modelo para generar un sistema de propagación para gloxinia que considere la combinación de diferentes reguladores del crecimiento para inducir organogénesis.

Reguladores del Crecimiento

Los reguladores del crecimiento utilizados en el cultivo *in vitro* de plantas son de vital importancia, sobre todo las auxinas y las citocininas. La necesidad de incluir reguladores al medio depende del objetivo del trabajo, tipo de explante y la especie de la planta (Pierik, 1987).

El termino "regulador", se aplica a cualquier material que pueda modificar los procesos fisiológicos de cualquier planta. Reguladores de las plantas son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier otro modo el proceso fisiológico en las plantas (Devlin, 1982; Weaver, 1990).

Existen evidencias suficientes para considerar a los reguladores del crecimiento en dos hechos fundamentales: a) no actúan a nivel organismo, sino de la célula (mitosis y alargamiento celular) de modo que sus efectos se hacen

sentir en todo los fenómenos fisiológicos que se basan en los fenómenos citológicos y b) la acción básica de los reguladores ocurre sobre los ácidos nucleicos a nivel de transcripción del mensaje (ADN→ARN) o de su traducción (ARN→proteínas) (Rojas y Ramírez, 1993).

Auxinas.

Rojas y Ramírez (1987) designan a las auxinas como un grupo de reguladores del crecimiento, donde el ácido indolacético (AIA) es la única auxina natural. Su síntesis se realiza en los meristemas de las plantas. El AIA es transportado como AIA-inositol principalmente, se transporta en forma basipétalo.

Es una característica de las auxinas que a concentraciones bajas estimulen el metabolismo y desarrollo, y a concentraciones altas lo depriman como lo mostró hace años Thimann (Rojas y Ramírez, 1987). Estos mismos autores mencionan que el principal efecto auxínico es la estimulación del alargamiento celular o su depresión según la concentración del producto.

Una de las primeras teorías, de que la auxina incrementa la plasticidad de las paredes celulares, sigue siendo la más satisfactoria. Cuando se incrementa la flexibilidad de las paredes, disminuye la presión de esta alrededor de la célula y la presión de turgencia causada por las fuerzas

osmóticas en la savia vacuolar, hace que el agua entre a las células, provocando su expansión promoviendo la división celular (formación de callo), la formación de raíces adventicias y frecuentemente embriogénesis en cultivos en suspensión (Krikorian, 1991a).

Bidwell (1990) señala que el AIA y otras auxinas naturales no se acumulan en grandes cantidades en las células, debido a que existen procesos naturales de inactivación y destrucción de éstas, que son menos eficientes con las auxinas sintéticas, lo que les permite acumularse y tener un período activo relativamente largo al aplicarlas exógenamente, pues tales auxinas quizá son más estables debido a que existen pocos sistemas enzimáticos que las ataquen fácilmente, por lo que tienden a acumularse, al punto de llegar a ser tóxicas.

Hurtado y Merino (1987) mencionan que las auxinas son esenciales para el crecimiento de las raíces, incrementando significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Entre los estimuladores del enraizamiento que comúnmente se utilizan, están el ácido indolbutírico (AIB) el cual tiene una actividad auxínica débil y por lo tanto los sistemas de enzimas destructoras de auxinas la destruyen en forma relativamente lenta. Debido a que el AIB se desplaza muy poco y se retiene cerca del sitio de aplicación produce un sistema de raíces fuertes y fibrosas (Weaver, 1990).

Las sustancias promotoras del enraizamiento son a menudo más eficaces cuando se utilizan en combinación (Krikorian, 1991a) lo anterior debido a que varias auxinas parecen tener diferentes sitios de acción.

Citocininas

El nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivados de la adenina. El descubrimiento de estos reguladores del crecimiento proviene de los trabajos realizados por Haberlandt, quien demostró, cultivando embriones y tejidos *in vitro*, que existía un factor difusible, el cual afectaba a las células parenquimatosas de la papa, que eran revertidas a un estado organizado meristemático (Hurtado y Merino, 1987).

La cinetina, una de las citocininas más usadas, actúan en el retraso de la senescencia, en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que puede inducir yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo (Pierik, 1987; Rojas y Ramírez, 1987).

Las citocininas, combinadas con auxinas, estimulan la división celular en plantas, interactuando en la determinación de la ruta que seguirá la diferenciación celular. Su máxima concentración predomina en las raíces, que

parece ser la fuente principal de citocininas de las plantas, desde las cuales son enviadas hacia los brotes (Hurtado y Merino, 1987).

Devlin (1982) hace referencia a los trabajos realizados que trataban directa o indirectamente, de la capacidad de la cinetina para estimular la división y el alargamiento celular. Los primeros en observar la estimulación de la división celular en cultivos de tejidos vegetales provocados por el efecto de la cinetina fueron Miller *et al.* (1956) y Skoog y Miller (1957). En los cultivos de médula de tabaco empleados por estos investigadores se observó que además de la cinetina se necesitaba AIA para obtener un crecimiento continuo. Aunque ambos reguladores usados por separado producen una pequeña respuesta, ésta no es continua y disminuye después de un período de tiempo relativamente corto. Sin embargo, cuando se aplican AIA y cinetina conjuntamente en proporciones convenientes, los resultados son espectaculares y el crecimiento del cultivo puede ser mantenido de forma indefinida.

Hurtado y Merino (1987) señalan que si las proporciones de auxina - citocinina son variadas en el cultivo *in vitro*, el patrón de formación meristemática se modifica. Cuando la proporción de auxina-citocinina es relativamente alta, existe diferenciación de las células hacia primordios radicales. De lo contrario una alta concentración de citocininas con respecto a las auxinas causa la formación de brotes. Por lo tanto, si se provocan

pequeños cambios en la proporción de citocininas-auxinas puede obtenerse el inicio de meristemas, tanto radicales como apicales, pudiendo controlarse así la morfogénesis *in vitro* en gran variedad de tejidos. Es importante mencionar que los procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más complejos, ya que éstos están influenciados por otros factores no hormonales, tales como los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos que son agregados al medio, efectos físicos como la luz, temperatura, consistencia del medio, y aun por la calidad y tipo de tejido empleado. La inducción *in vitro* de órganos por las citocininas está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción citocinínica alta con respecto a las auxinas.

Micropropagación

Micropropagación se puede definir como una multiplicación clonal masiva *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991).

Krikorian (1991b), Villalobos y Thorpe (1991) y Hartmann y Kester (1995) mencionan que existen varias vías para realizar la micropropagación:

- a) Multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. El punto de inicio puede estar en los meristemas, las puntas de los brotes, las yemas, los nudos o los brotes de las yemas en las raíces.

- b) Organogénesis directa. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el explante de un órgano o en alguna parte escindida de la planta.

- c) Organogénesis indirecta. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el callo.

- d) Embriogénesis somática. Los embriones somáticos o embrioides pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido.

Organogénesis Directa

Se induce en explantes que contienen yemas rudimentarias o que tienen potencial para la producción de meristemas adventicios.

Diferenciación de Brotes (Tallos) Adventicios

La diferenciación de brotes adventicios permite la formación de nuevas estructuras unipolares; se puede inducir directamente en segmentos de hojas, raíces y en otros órganos de plantas intactas con altas tasas de éxito (Villalobos y Thorpe, 1991). El procedimiento no solo es útil para la micropropagación de plantas que tradicionalmente se multiplican por brotes

adventicios como la violeta africana, sino también en una alta diversidad de especies (Hartmann y Kester, 1995).

Propagación *in vitro* de Plantas Ornamentales

Toda micropropagación empieza por la excisión de una pequeña porción de planta. La parte de la planta que se usa para iniciar el proceso se llama explante, siendo la unidad básica en la propagación por cultivo de tejidos. Los nuevos brotes o callos que producen este explante por proliferación son divididos en propágulos, que se vuelven a cultivar para su multiplicación. Finalmente se desarrollan de manera que se obtienen nuevas plantas (Mroginski y Roca, 1991).

Start y Cummings (1976) encontraron una máxima inducción de tallos en segmentos de hoja de violeta africana sembrados y cultivados en medio MS complementado con 5.0 mgL^{-1} de BA y con sulfato de adenina (12.5 mgL^{-1}). En contraste Kukuczanka y Suszynska (1972) determinaron como medio óptimo el MS suplementado con 2.0 mgL^{-1} de cinetina.

Hussey (1977) reporta un estudio realizado sobre micropropagación *in vitro* de algunas liliáceas, iridáceas y amarilidáceas, utilizando un medio con mezclas de sales básicas de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mgL^{-1} de mio-inositol, 0.5 mgL^{-1} de tiamina y diferentes reguladores del

crecimiento [ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP)], incubando a una temperatura de 20 a 30°C y de 3000 a 4000 lux de luminosidad por 16 hr/día. Se encontró que *Gladiolus*, *Freesia* e *Iris* formaron yemas axilares precoces con BAP; *Lilium*, *Narcissus* e *Hyacinthus*, produjeron brotes axilares y adventicios con BAP y ANA. Señala además que puede ser inducida la formación de brotes adventicios con ANA solo o combinado con BAP en las regiones meristemáticas en hojas y tallo, incluso pueden obtenerse callos genéticamente estables de *Freesia* y de algunos cultivares de *Lilium*.

Bilkey *et al.* (1978) evaluaron diferentes combinaciones de los reguladores ANA y BA, con la finalidad de propagar violetas africanas a nivel comercial de la variedad "Tomi Lou", reportada por viveristas como difícil de propagar. Sembraron segmentos de hojas en un medio MS complementado con 0.1 mgL⁻¹ de ANA y con 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mgL⁻¹ de BA. Los cultivos se mantuvieron a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas. Determinaron como el mejor tratamiento 0.1 mgL⁻¹ de ANA + 0.01 mgL⁻¹ de BA ya que generaron un promedio de treinta y dos plántulas por cultivo.

Vázquez y Short (1978) establecieron un protocolo para propagar violeta africana "Blue Rhapsody". Utilizaron como explante segmentos de pétalos, sépalos y ovarios, establecidos en un medio MS complementado con BAP (0.2, 0.4, 1.0 mgL⁻¹) y ANA (0.2 y 1.0 mgL⁻¹). Los cultivos se mantuvieron

a 25°C con un fotoperiodo de 16 h. La formación de tallos se observó a los 30 días, determinando como mejor tratamiento 1.0 mgL⁻¹ de BAP + 1.0 mgL⁻¹ de ANA, donde se obtuvieron un promedio de 26 tallos en explantes de pétalos, 22 en explantes de sépalos y 13.5 en explantes de ovario. Para inducir formación de raíces se utilizó una combinación de cinetina (0.2, 0.5 y 1.0 mgL⁻¹) y ANA (0.5, 1.0 mgL⁻¹) resultando como mejor tratamiento 1.0 mgL⁻¹ de cinetina + 0.5 mgL⁻¹ de ANA.

Smith y Norris (1983) desarrollaron un método para propagar *in vitro* tres variedades de violeta africana (Marge Winters, Bold Dance y Calico Kitten). Los explantes fueron cultivados en un medio MS suplementado con 100 mgL⁻¹ de inositol, 0.4 mgL⁻¹ de tiamina HCl, 170 mgL⁻¹ NaH₂PO₄, 2 mgL⁻¹ kinetina y 80 mgL⁻¹ sulfato de adenina. De la variedad "Calico Kitten" en diez meses obtuvieron de diez explantes 80 tallos simples, los cuales fueron transferidos a un medio MS complementado con 0.4 mgL⁻¹ tiamina-HCl y 100 mgL⁻¹ mio-inositol. Al cabo de seis meses se obtuvieron 350 tallos simples, los cuales fueron transferidos a vermiculita. De las variedades Marge Winters y Bold Dance de veinte y diez explantes respectivamente se obtuvieron 792 plantas de la primera y 100 de la segunda. Las plantas obtenidas fueron idénticas a los progenitores en un 95 por ciento.

García y Carballo (1987) establecieron un protocolo para propagar violeta africana *in vitro* en forma masiva cultivando segmentos de hoja.

Establecieron explantes de hoja de aproximadamente 1.2 cm² sobre medio MS, complementado con 1.0 mgL⁻¹ de AIA y 10 mgL⁻¹ de cinetina e incubaron a 25 ± 2°C con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad de 1400 lux. A los 30 días de la siembra, en los bordes de los explantes se observaron innumerables tallos diminutos. Después de 45 días de incubación se transfirieron al mismo medio de cultivo, con las sales diluidas al 50 por ciento y sin reguladores de crecimiento. A los 60 días se obtuvieron 70 plantas por frasco sembrado, lo que se traduce en 2800 plantas por litro de medio de cultivo.

Johnson (1978) reportó un método *in vitro* para propagar gloxinias utilizando explantes de hoja, de 1 cm², cultivados en un medio MS complementado con cinetina (0.3 mgL⁻¹ y 0.7 mgL⁻¹) y AIA (1.6-1.8 mgL⁻¹). Obteniendo fácilmente la brotación. Brotes con un cm de longitud fueron transferidos a medio MS complementado con 0.2 mgL⁻¹ de cinetina y AIA para inducir raíces. Brotes enraizados fueron transferidos a sustrato. Esta técnica le permitió obtener de uno a diez plantas por explante y una simple hoja puede proveer cerca de 100 explantes.

Paek y Hank (1988) propagaron gloxinia (Red y White Edge) *in vitro* en un medio MS complementado con diferentes concentraciones de cinetina, AIA, NaH₂PO₄.H₂O, sulfato de adenina y carbón activado. Se obtuvo una rápida multiplicación de tallos con 10 mgL⁻¹ de cinetina, 0.1 mgL⁻¹ de AIA, 50-100 mgL⁻¹ de NaH₂PO₄.H₂O y sulfato de adenina 40 mgL⁻¹. Al incrementarse la cantidad

de carbón activado se redujo el número de tallos, pero se incrementó el peso de los mismos. El enraizamiento se logró con 1 a 3 mgL⁻¹ de AIB.

Muangkaewngam y Chato (1992) cultivaron *in vitro* gloxinias con la finalidad de establecer un método de propagación. Cultivaron explantes en un medio MS complementado con AIA (1 mgL⁻¹) y cinetina (5 mgL⁻¹), obteniendo desarrollo múltiple de tallos en tres semanas. El 96.1 por ciento de los explantes produjeron un promedio de 25 tallos. Un total de 97 por ciento de tallos desarrollaron raíces en un medio MS al cincuenta por ciento sin reguladores de crecimiento.

Serrano *et al.* (1998) en un estudio realizado sobre micropropagación de gloxinia observó que se pueden obtener entre siete y ocho brotes en explantes de peciolo, utilizando reguladores de crecimiento BAP (0.3-0.5 mgL⁻¹) y AIB o AIA (0.1-0.2 mgL⁻¹) para enraizamiento.

Ramírez (1996) reporta un estudio de micropropagación en Anturio (*Anthurium andreanun*). El medio utilizado fue el de Murashige y Skoog, al 50 por ciento en su concentración de sales, conteniendo bencilaminopurina (BAP) en tres concentraciones y combinadas éstas, de manera independiente, con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido indolacético (AIA), ambos a una concentración de 1.0 mgL⁻¹. Los mejores resultados se obtuvieron en la

combinación BAP (0.8 y 1.0 mgL⁻¹) con AIA (1.0 mgL⁻¹), donde se generaron de 15 a 50 brotes por explante.

Gutiérrez y Morales (1998) establecieron un sistema de micropropagación para gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus), utilizando inflorescencias inmaduras sembradas en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50 por ciento complementado con 100 mgL⁻¹ de mioinositol, 0.1 mgL⁻¹ de AIA y 1.0 mgL⁻¹ de BAP, incubando durante cuatro semanas a 25°C ± 3°C. Los propágulos obtenidos se subcultivaron varias veces en un medio para inducción de brotes múltiples, se utilizó el mismo medio MS, incrementándose únicamente la concentración de BAP de 1.0 a 2.0 mgL⁻¹, manteniéndose en incubación por ocho semanas. Los brotes obtenidos se colocaron en medio MS al 50 por ciento sin reguladores de crecimiento, se mantuvieron en el área de incubación por tres semanas, a los 15 días, el 100 por ciento de los brotes ya habían enraizado. Las plantas con raíz se transplantaron a un sustrato adecuado y se mantuvieron en el área de aclimatación durante treinta días, con lo que se logró el 95 por ciento de sobrevivencia.

Manzo *et al.* (1998) establecieron un medio de cultivo *in vitro* para propagar nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) utilizando el medio MS suplementado con citocininas como BA, 2ip (dimetilalilamino purina) y kinetina, en concentraciones de 0 a 10 mgL⁻¹, las cuales permitieron obtener yemas adventicias en cantidades de 0-30 yemas/explante. El enraizamiento de

propágulos se logró en quince a veinte días utilizando AIB en concentraciones de 0 a 1 mgL⁻¹.

Gutiérrez *et al.* (1998) en un trabajo realizado de micropropagación en *Alstroemeria*, evaluaron distintas concentraciones de Thidiazuron (TDZ), Bencil-aminopurina (BAP) y una combinación de éstos. Para el establecimiento utilizaron brotes y rizomas que desinfectaron y sembraron en un medio MS, se incubaron a 20°C y 15 horas luz, evaluándose calidad de explantes a seis semanas con una escala subjetiva. Determinaron como el mejor tratamiento BAP + TDZ (2.5 mgL⁻¹ + 0.2 mgL⁻¹, respectivamente).

Vences (1998) realizó un trabajo con *Phalaenopsis amabilis* var. White Grull, usando como explantes yemas de tallo floral, yema axilar vegetativa, hoja y ápice de raíz de plantas generadas *in vitro* a partir de plantas adultas. Estos explantes fueron cultivados y proliferados sobre el medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con varias concentraciones de BAP. La producción de 1.37 brotes por yema de tallo floral cultivada ocurrió a los 55 días de cultivo en un medio suplementado con 4.0 mgL⁻¹ de BAP. El suplementado con 12.5 mgL⁻¹ de BAP y 9.0 mgL⁻¹ de sulfato de adenina (SA) fue el más efectivo en la siembra de segmentos de hoja con la formación de 15 protocormos en 120 días de cultivo. La producción de 1.75 brotes por yema axilar cultivada ocurrió en 60 días en un medio suplementado con 1.5 mgL⁻¹ de BAP.

Calidad de las Semillas

Burbano (1991); Garay (1991), menciona que la calidad de cualquier producto en su sentido amplio, es un conjunto de características que el consumidor evalúa para decidir si satisface sus expectativas. En el contexto de las semillas, estas se agrupan en cuatro componentes básicos (calidad genética, sanitaria, fisiológica y física). Para estos autores, la calidad de la semilla estará en su máximo nivel cuando en la semilla estén contenidos todos y cada uno de los componentes a su máximo nivel.

Bustamante (1998) define calidad de semilla como el conjunto de características o cualidades deseables en la semilla que la hace útil para la siembra y se encuentra comprendida en cuatro componentes básicos.

Componentes de Calidad de Semillas

Calidad Genética

La importancia de este componente de la calidad, ha motivado programas de fitomejoramiento, el cual se manifiesta a través del rendimiento, resistencia, adaptación, calidad del producto y pureza varietal. La calidad genética viene determinada por el genotipo de la variedad o híbrido (Bustamante, 1998).

Calidad Sanitaria

Se refiere a la sanidad de la semilla, principalmente a la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades que puedan transmitirse por medio de la misma, o portarse internamente, superficialmente o como materia inerte, pero también pueden estar involucradas condiciones fisiológicas, tales como deficiencias de microelementos (Moreno, 1996).

Para Garay (1991) en algunos cultivos la calidad sanitaria puede ser la más importante, aún en variedades no mejoradas, con el solo hecho de producir semilla sana se puede obtener una mejora notable en su capacidad productiva.

Calidad Fisiológica

El conjunto de atributos que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables, y se manifiesta por medio de la viabilidad, germinación, vigor, latencia, composición química, madurez, peso, tamaño. La calidad fisiológica depende de muchos factores y puede ser muy fácilmente dañada en cualquiera de sus etapas (Moreno, 1996; Bustamante, 1998).

Calidad Física

Típicamente se asocia con la presencia o ausencia de cualquier contaminante distinto a la semilla, estos pueden ser materiales inertes, semillas de malezas comunes y nocivas, semillas de otros cultivos, insectos, quistes de nemátodos. En algunos casos, la semilla de otras variedades puede también ser consideradas como contaminantes. La calidad física es uno de los mecanismos claves para evitar la diseminación de malezas. Aspectos como color, tamaño, fracturas, daños diversos, brillantez, uniformidad, contenido de humedad, por ser visibles, tienen un alto valor a la vista del agricultor. Los atributos visibles dan la presentación al producto y con frecuencia son los factores que reciben mayor peso en la decisión del agricultor (Garay, 1991)

El método de cosecha, secado, daño mecánico durante el manejo, procesamiento, contenido de humedad, condiciones de almacenamiento, son otros factores que demeritan la calidad (Thomson, 1979).

El peso de la semilla puede ser afectado por factores ambientales como la temperatura, bajando la calidad de la semilla, otro factor es el contenido de humedad que incide en el manejo y conservación de la semilla, esto en cierta forma influye en la pérdida de vigor y viabilidad (Bustamante, 1998).

Germinación Estándar

De acuerdo con la AOSA (1981) para el fisiólogo de semillas la germinación se define como la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla. Para el analista de semillas, es la emergencia de la radícula y el desarrollo en el embrión de aquellas estructuras, que son indicativas de la habilidad de producir bajo condiciones favorables, una planta normal.

Duffus (1985) define la germinación como el cambio de una pequeña estructura inactiva viviendo con abastecimiento mínimo, a una planta que crece activamente, destinada a llegar a la autosuficiencia antes de que los materiales de reserva de la semilla se terminen.

Para Camacho (1994), la germinación es el proceso mediante el que un embrión adquiere el metabolismo necesario para reiniciar el crecimiento y transcribir las porciones del programa genético que lo convertirá en una planta adulta.

Copeland y McDonald (1985) afirman que la capacidad de germinación es el criterio comúnmente usado para determinar la viabilidad o calidad de la semilla y que es universalmente aceptado que la germinación y la viabilidad de la semilla se consideran términos sinónimos por los semillistas.

Estos autores definen la germinación como la emergencia y desarrollo a partir del embrión de aquellas estructuras esenciales, que por el tipo de semillas de que se trate, son indicadoras de su habilidad para producir una plántula normal bajo condiciones favorables.

Según la ISTA (1995) la germinación en el laboratorio es el desarrollo de las estructuras esenciales del embrión a un grado tal de desarrollo que manifiestan la habilidad para continuar un desarrollo normal bajo condiciones óptimas. El objetivo de la prueba estándar de germinación es obtener información con respecto a la capacidad de las semillas para producir plántulas normales y hacer comparaciones del poder germinativo entre diferentes lotes de semilla de la misma especie.

Para Hartmann y Kester (1995), una semilla consiste de un embrión y su provisión de alimento almacenado, rodeados por las cubiertas protectoras. En la época en que se separan de la planta madre, la mayoría de las semillas tienen un contenido de humedad bajo, su metabolismo se encuentra a un nivel reducido y no ocurre actividad aparente de crecimiento.

La iniciación de la germinación requiere de tres condiciones:

- La semilla debe ser viable, el embrión debe estar vivo y ser capaz de germinar.

- La semilla no debe estar en letargo ni el embrión quiescente. No debe existir barreras fisiológicas o físicas que induzcan letargo ni barreras químicas para la germinación.
- La semilla debe estar expuesta a las condiciones ambientales apropiadas: disponibilidad de agua, temperaturas adecuadas, provisión de oxígeno y en ocasiones luz. Debido a las complejas interacciones entre el ambiente y condiciones específicas de letargo, dichas exigencias pueden cambiar con el tiempo y los métodos de manejo de las semillas.

La germinación de una muestra de semillas se realiza dentro de un intervalo que puede abarcar desde un determinado número de horas, hasta varias semanas, según sean las condiciones ambientales y la especie (Morales y Camacho, 1994)

Latencia de Semillas

Camacho (1994) menciona que han utilizado varios términos como dormancia, dormición, latencia, letargo, reposo, y vida latente para referirse a la ausencia o inhibición del crecimiento vegetal y en particular de la germinación. El término latencia de acuerdo con Salisbury y Ross (1978) lo define como un estado de la semilla viable sin germinar, aunque disponga de suficiente humedad, aireación en el suelo bien ventilado y una temperatura que se encuentre entre 10 y 30°C.

Copeland y McDonald (1985) y Delouche (1964) coinciden en definir latencia de la semilla, como la no germinación de semillas viables, cuando se encuentran en un medio natural o artificial que proporciona condiciones favorables de luz, humedad, aire y temperatura.

Otra causa es la presencia de inhibidores del desarrollo en la testa o bien la carencia de estimulantes o reguladores de crecimiento. Cuando la semilla se coloca en medio húmedo absorbe agua y se hincha; las células del embrión entran en actividad y se forman las giberelinas que determinan la síntesis de la enzima amilasa y ésta, a su vez, induce el paso del almidón de reserva en la semilla a azúcar para poder ser respirado y obtener su energía. Otros mecanismos químicos empiezan a sintetizar citocininas e inician la división celular creciendo la plúmula y la radícula. Por último se forman auxinas que hacen alargarse a las células dando lugar al gran crecimiento de la planta (Rojas y Vázquez, 1995).

De acuerdo con Hartmann y Kester (1995), a la latencia, se le atribuyen algunas ventajas, puesto que esta se adquirió en las especies a través del proceso evolutivo de la población ante la necesidad de sobrevivir y perpetuar la especie bajo condiciones adversas, después de la diseminación de las semillas. Sin embargo también presenta desventajas, puesto que se desconoce la calidad fisiológica de la semilla, al no obtenerse el porcentaje de plántulas normales en lotes de semillas, cuando se ensaya para germinación

estándar, así mismo el grado de latencia varía dentro de lote de semillas lo que crea dificultades en el ensayo de emergencia, el establecimiento del cultivo no es uniforme. La latencia, es un problema en el manejo de pastizales, control de malezas, floricultura y especies forestales. Las siguientes categorías de letargo se basan en diferencias tanto fisiológicas como morfológicas, tomando como base la clasificación de Nikolaeva (1977).

Letargo por Cubiertas de las Semillas

Letargo Físico

La latencia puede ser causada por una cubierta o testa de la semilla muy dura, en cuyo caso hay que debilitarlo por medios mecánicos o químicos. El embrión está quiescente (no aletargado), pero se encuentra encerrado dentro de una cubierta impermeable que puede preservar las semillas con bajo contenido de humedad durante varios años, aun a temperaturas elevadas. La dureza de las semillas depende de la especie y de las condiciones ambientales existentes durante la maduración de las semillas y de las condiciones ambientales durante su almacenamiento.

Letargo Mecánico

Esta categoría comprende la situación en que las cubiertas de las semillas son demasiado duras para permitir que el embrión se expanda durante la germinación.

Letargo Químico

De varias partes de las plantas se han extraído e identificado sustancias químicas que actúan como inhibidoras de la germinación. Estas sustancias se producen y se acumulan en el fruto así como en las cubiertas de las semillas.

Letargo Morfológico

Este letargo se presenta en familias de plantas cuyas semillas, de manera características en el embrión, no se ha desarrollado por completo en la época de maduración. Dentro de esta categoría hay dos grupos:

Embriones Rudimentarios: Son semillas cuyos embriones son apenas más que un proembrión embebido en un endospermo en la época de la maduración del fruto como en la magnolia; orquídea.

Embriones no Desarrollados. Algunas semillas en la madurez del fruto tienen embriones poco desarrollados, con forma de torpedos, que pueden alcanzar un tamaño de hasta la mitad de la cavidad de la semilla. El crecimiento posterior del embrión se efectúa antes de la germinación.

Letargo Interno

En varias especies de semillas el letargo es controlado en el interior de sus tejidos vivientes y se presenta en dos clases. En el control interno de la germinación están implicados dos fenómenos separados. El primero es el control ejercido por la semipermeabilidad de las cubiertas de las semillas. El segundo es un letargo presente dentro del embrión.

Letargo Fisiológico

En la mayoría de las semillas de las especies cultivadas de cereales, pastos, hortalizas y flores, el período de letargo puede durar de uno a seis meses, pero con los procedimientos normales de manejo desaparece con el almacenamiento en seco. Las semillas de lechuga y algunos cultivos florales, requieren luz para germinar, mientras que otras necesitan oscuridad.

Letargo Interno Intermedio

Otro tipo de letargo es inducido principalmente por las cubiertas de las semillas y los tejidos de almacenamiento circundante. Este tipo de letargo se caracteriza además por el hecho de que el enfriamiento puede no ser un requerimiento absoluto de germinación, pero acelera bastante la tasa de germinación.

Letargo del Embrión

Se caracteriza principalmente por que para llegar a la germinación se requiere un período de enfriamiento en húmedo y por la incapacidad del embrión separado de germinar con normalidad.

Métodos para Romper la Latencia

Algunos autores, como Copeland y McDonald (1985); la ISTA (1995). Hartmann y Kester (1995) han descrito diferentes tratamientos para vencer la latencia.

Escarificación Química

Es usada igualmente para el tratamiento de semillas duras. Generalmente se usa ácido sulfúrico. La semilla se remoja en una solución concentrada por períodos de tiempo que varían para cada especie, de pocos minutos a horas. El tiempo óptimo de escarificación, es importante determinarlo para cada especie, para evitar daños al embrión.

Tratamiento de Almacenamiento en Seco

Las semillas recién cosechadas de algunas plantas forrajeras, cereales y hortalizas, pueden perder latencia de postcosecha, si se deja secar por algunas semanas antes de su germinación.

Tratamiento de Enfriamiento en Húmedo

Las semillas con requerimiento de frío deben ser puestas en un sustrato húmedo, a una temperatura de 5 a 10°C durante tiempo variable, antes de ser puestas en ensayos de germinación. La provisión de frío favorecerá el balance adecuado de inhibidores – promotores de la germinación, permitiendo así, la reanudación del crecimiento del embrión.

Tratamiento Químico

El uso de hormonas y otros compuestos, como el ácido giberélico, ácido abscisico, citocininas, etileno, nitrato de potasio, hipoclorito de sodio y cloroformo, pueden promover la germinación.

Giberelinas

Las giberelinas (GA_3) son reguladores de crecimiento implicadas en el control y el estímulo de la germinación de las semillas. Se usan para romper la latencia fisiológica ocasionada por requerimientos de luz y temperatura. Estos compuestos se presentan en concentraciones relativamente altas en las semillas en desarrollo, pero de ordinario se reduce a una concentración menor en semillas maduras en letargo, en particular en plantas dicotiledóneas. La aplicación de las giberelinas puede funcionar para superar muchos tipos de letargo, incluyendo al fisiológico, al fotoletargo y al termoletargo. Al parecer las giberelinas desempeña un papel en dos etapas diferentes de germinación. En la etapa de activación, se ha sugerido que las giberelinas actúan en la etapa inicial de la inducción de enzimas al ser transcriptas de los cromosomas. Una etapa posterior en la que es efectiva la giberelina es la activación de enzimas que intervienen en la movilización del sistema de alimentos (Hartmann y Kester, 1995).

Nitrato de Potasio.

El uso de nitrato de potasio ha sido un tratamiento de semillas importantes en los laboratorios de ensayo de semillas durante años, sin una buena explicación de su acción (Hartmann y Kester, 1995).

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Horticultura, en el laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación de Desarrollo de Tecnología de Semillas (C.C.D.T.S.) y el invernadero de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Este trabajo se llevó a cabo en dos partes: la primera consistió en micropropagación *in vitro* y la segunda parte correspondió al estudio de calidad de la semilla de gloxinia.

Micropropagación

Se utilizaron dos genotipos de gloxinia (*Sinningia speciosa*) "Red mix" y "Pink mix". Se usaron plantas comerciales como plantas madres, de las cuales se obtuvieron explantes. Se usaron como explantes segmentos de pecíolo, de hoja con nervadura y hoja sin nervadura.

El protocolo general se desarrollo en cuatro etapas que incluyen: iniciación o establecimiento del cultivo, multiplicación, enraizamiento y aclimatación de la planta.

Etapa de Iniciación o Establecimiento del Cultivo

Al inicio de esta etapa se caracterizó la planta en cuanto a tamaño y color de hoja, esto es importante ya que las plantas generadas a través del cultivo *in vitro* deben ser idénticas a la planta madre.

Para tener mayor control en la etapa inicial, se utilizó un medio de iniciación el cual consistió en sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) macronutrientes, micronutrientes, cloruro de calcio, sulfato ferroso, agar y sin sacarosa (Cuadro A.1.). Una vez disueltas las sales minerales, hormonas, azúcares y vitaminas, se ajustó el pH a 5.7, esto con la ayuda de NaOH a una concentración del 50 por ciento para subir el pH y con HCl para bajar el pH, enseguida se agregó sacarosa, se diluyó completamente, y posteriormente se procedió agregar el agar, y a hervir el medio hasta tomar un color transparente.

Una vez preparado el medio se distribuyó en frascos de cristal tipo "Gerber" previamente esterilizados, 20 ml de medio por frasco, se esterilizaron en la autoclave junto con cajas petri, bisturíes, vasos deprecipitados, agua destilada y desionizada a una presión de 1.4 Kg/cm² a 121°C de temperatura por 20 minutos.

El medio esterilizado se dejó enfriar hasta que solidificó, pasando enseguida a la campana de flujo laminar, la cual fue previamente desinfectada con alcohol al 96 por ciento.

Desinfección del Material Vegetativo (Explantos)

Se utilizaron pecíolo y hojas como material vegetativo, se lavaron con jabón y agua corriente, posteriormente se lavaron con una solución de Tecto con Captan (0.5 gr de cada producto por litro de agua) y jabón para romper la tensión del agua, debido a la pubescencia de la hoja, el lavado se realizó en un vaso de precipitado agitándose por una hora, después se enjuagaron tres veces con agua destilada. Terminando este proceso, el resto de la desinfección se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar, las hojas fueron sumergidas por 30 segundos en una solución de etanol al 70 por ciento, después se pasaron a otra solución de hipoclorito de sodio al 1.0 por ciento durante cinco minutos, posteriormente se enjuagaron por cinco minutos con agua destilada previamente esterilizada.

Siembra

La siembra se llevó a cabo en campana de flujo laminar, en ambiente estéril ante una de flama de mechero de alcohol, con instrumentos esterilizados. Enseguida, con el bisturí y las pinzas estériles y flameadas se

cortó el borde de la hoja, se eliminó la nervadura principal y se seccionó en cortes de aproximadamente 1.5 cm², se colocaron dos explantes por frasco, en medio de iniciación. En cada corte, las pinzas, bisturíes y cajas petri se flamearon, los frascos se taparon y se sellaron con parafilm quedando listos para pasar a la cámara incubadora.

Incubación

Una vez efectuada la siembra *in vitro*, los frascos se pasaron al área de incubación permaneciendo durante ocho días, con las condiciones de fotoperíodo de 16 hr luz y temperatura controlada de 25°C ± 1, con luz fluorescente blanco frío, en una cámara incubadora Hoffman®.

Etapa de Multiplicación de Tallos

Una vez transcurridos ocho días, y reconocidos los explantes no contaminados se transfirieron a un nuevo medio MS (Cuadro A.1.), con 30 mgL⁻¹ de sacarosa y reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) incluyendo las combinaciones de tratamientos de AIA (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mgL⁻¹), Cinetina (0.0, 5.0, 10 mgL⁻¹) y BAP (0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mgL⁻¹) mencionados en el Cuadro 3.1. con la finalidad de iniciar la etapa de formación de brotes. Después de cada observación semanal se registro la fecha de emergencia de brotes, y se evaluaron las siguientes variables:

- a) **Número de Brotes por Explante.** Para esta variable, se realizaron cinco evaluaciones a lo largo de 50 días, se registró el número de brotes por cada explante a partir de los 30 días después de la siembra, con intervalo de cinco días (35, 40, 45, 50 días).
- b) **Longitud de Brote.** Esta variable se evaluó simultáneamente con el número de brotes por explante. Con una regla numérica se midió cada brote desde la base hasta el ápice, registrándose en milímetros. Las mediciones se hicieron a través del frasco de vidrio tipo "Gerber".

Cuadro 3.1. Tratamientos utilizados para inducir formación de tallos en explantes de gloxinia.

Tratamiento	AIA [†]	Cinetina
	mgL ⁻¹	
T1	0.5	5
T2	0.5	10
T3	1.0	5
T4	1.0	10
T5	1.5	5
T6	1.5	10
		BAP [‡]
T7	0.8	0.8
T8	0.8	1.0
T9	0.8	1.2
T10	0.8	1.4
T11	0	0

[†] AIA = Acido-3-indol acético.

[‡] BAP = 6-bencilamino purina.

Etapa de Enraizamiento

Tallos con al menos un cm de longitud fueron transferidos a un medio MS al cincuenta por ciento suplementado con AIA (0.0, 0.1, 0.5, 1.0 mgL⁻¹) en diferentes concentraciones, así mismo se utilizó ácido indol-3-butírico (AIB) con las mismas concentraciones del AIA mostradas en el (Cuadro 3.2.). Se realizó el mismo procedimiento para preparar medio, lo que cambió son las combinaciones de reguladores de crecimiento según la etapa en la que se encontraban. En cada frasco de cristal tipo "Gerber" se colocaron dos tallos. Se realizaron tres observaciones cada diez días para determinar las siguientes variables, la etapa duró treinta días:

- a) **Días de Iniciación de Enraizamiento:** Se tomó como el número de días, cuando al menos el 50 por ciento de los tallos presentaron raíces.
- b) **Número de Raíces por Tallo.** En cada frasco (repetición) se colocaron dos tallos para enraizamiento. Por cada tallo se contó el número de raíces presentes. Se realizaron tres evaluaciones cada 10 días a partir de la transferencia al medio enraizador.
- c) **Longitud de Raíces.** Esta variable se evaluó simultáneamente con el número de raíces por tallo, con una regla numérica se midió cada una de

las raíces del tallo, registrándose en milímetros. Se tomó las lecturas a través del frasco de vidrio.

Cuadro 3.2. Tratamientos utilizados para inducir enraizamiento en tallos de gloxinia generados *in vitro*.

Tratamiento	AIA mgL ^{-1†}
T1	0.0
T2	0.1
T3	0.5
T4	1.0
	AIB mgL ^{-1‡}
T5	0.1
T6	0.5
T7	1.0

†AIA = Acido-3-indol acético.

‡AIB= Acido indol-3-butírico.

Etapa de Aclimatación de la Planta

Las plántulas se sacaron del medio de cultivo con mucho cuidado, tratando de conservar la raíz intacta. Las plántulas fueron transferidas a un recipiente con agua tibia y el agar fue removido con mucho cuidado, posteriormente las plántulas fueron establecidas en suelo estéril (Premier,

Promix-Bx) contenido en macetas cubiertas con bolsa de plástico. La bolsa de plástico, se perforó cada tercer día, se mantuvo puesta por tres semanas. Lo anterior ayudó a la aclimatación de la planta. Se aplicó un riego cada 5 días con una solución nutritiva (Cuadro A.2.) que contiene macronutrientes, micronutrientes y solución de fierro. En esta etapa se observó y cuantificó sobrevivencia de la plántula.

- a) **Sobrevivencia.** Cien plántulas de cada genotipo se transfirieron a maceta con sustrato previamente esterilizado, a los 5 días se realizó el conteo y en base a estos datos se sacó el porcentaje de sobrevivencia

Estudio de Calidad de la Semilla

Material Experimental

Se utilizaron muestras de semilla de los genotipos de gloxinia (*Sinningia speciosa*) "Red Mix" y "Pink Mix" otorgadas por la Sociedad Americana de Gloxinias y Gesneriaceas.

Se realizó un estudio preliminar con la finalidad de determinar el sustrato a usar, capacidad de germinación, días a la germinación. Se evaluaron tres sustratos: papel filtro blanco, papel toalla secante y sustrato (Premier promix-Bx). La capacidad de germinación se evaluó en cuatro repeticiones de

10 semillas cada una en cajas petri a temperaturas alternas en un rango de 15 a 25°C y 16 hr luz, las cuales se mantuvieron en una cámara germinadora. Una vez determinadas los factores anteriores; la semilla se ensayó para su calidad en los siguientes parámetros:

Peso de Mil Semillas (PMS)

Se determinó al pesar ocho muestras de 100 semillas cada una, el peso se registró en g, el conteo de la semilla se hizo manualmente, se calculó la varianza, la desviación típica y el coeficiente de variación de la siguiente manera

$$S^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$$CV = \frac{S}{x} 100$$

Donde: S^2 = varianza, S = desviación típica, CV = coeficiente de variación, x_i = peso en gramos en cada repetición, n = número de repeticiones, Σ = sumatoria, \bar{x} = media del peso de 100 semillas.

El Peso de mil semillas se calculó multiplicando el promedio de las ocho repeticiones por diez expresado en g (Moreno, 1996).

Capacidad de Germinación (CG)

El objetivo de esta prueba fue obtener información con respecto a la capacidad de las semillas para producir plántulas normales, los resultados fueron expresados en por ciento. La semilla se depositó en cajas petri provistas de papel filtro humedecido con Captan (1gL^{-1} de agua) se colocaron 25 semillas en cada caja con cuatro repeticiones. Se aplicaron 18 tratamientos, los cuales se muestran en el Cuadro 3. 3.

Una vez aplicados los tratamientos correspondientes, las cajas fueron colocadas en una germinadora marca Hoffma® de tamaño 2.0 x 0.7 x 1.0 m a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ con 16 hr luz y 8 hr oscuridad. Las variables evaluadas fueron:

Días a la Germinación (DG)

El número de días a germinación se determinó como el número de días al inicio de la germinación y a la obtención del 50 por ciento.

Germinación Fisiológica (GF)

Se determinó como el número de semillas con emergencia de plúmula o radícula, expresado en por ciento. En la cual se evaluaron:

Germinación Normal (GN). Se consideraron plántulas normales aquellas que poseen estructuras esenciales: sistema radicular bien desarrollado, hipocótilo bien desarrollado e intacto, plúmula intacta.

Germinación Anormal (GA). Se consideraron plántulas anormales por tener una deficiencia en el desarrollo de sus estructuras esenciales.

Semillas Muertas (SM). Semilla que no germinaron, no clasificadas duras.

Semillas Duras (SD). Semillas viables que no germinaron. Semillas que permanecieron duras al final de la prueba de germinación, ya que no absorbieron agua por que tienen cubierta impermeable.

Cuadro 3.3. Tratamientos para inducir germinación evaluados en laboratorio en semilla de gloxinia.

No. Tratamiento	Tratamiento	Tiempo
1	Nitrato de Potasio 0.2%	1 minuto
2	Nitrato de potasio 0.2%	2 minutos
3	Nitrato de potasio 0.2%	3 minutos
4	Acido sulfúrico concentrado	1 minuto
5	Acido sulfúrico concentrado	2 minutos
6	Acido sulfúrico concentrado	3 minutos
7	Acido giberélico 600 ppm	1 minuto
8	Acido giberélico 600 ppm	2 minutos
9	Acido giberélico 600 ppm	3 minutos
10	Acido giberélico 800 ppm	1 minuto
11	Acido giberélico 800 ppm	2 minutos
12	Acido giberélico 800 ppm	3 minutos
13	Acido giberélico 1000 ppm	1 minuto
14	Acido giberélico 1000 ppm	2 minutos
15	Acido giberélico 1000 ppm	3 minutos
16	Temperaturas alternas 15-30°C	16 y 8 hrs
17	Biozyme concentrado	
18	Testigo	

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Diseño Experimental

La evaluación de los tratamientos en: micropropagación en la etapa de multiplicación de tallos se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos $2 \times 11 \times 5$ con diferente número de repeticiones por tratamiento. Los factores estuvieron representados por dos variedades (Var), 11 tratamientos (Trt) y cinco fechas de muestreo. La unidad experimental estuvo representada por un frasco de cristal tipo "gerber" con dos explantes.

En la etapa de enraizamiento de tallos se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos $2 \times 7 \times 3$ con diez repeticiones por tratamiento. Los factores estuvieron representados por dos variedades (Var), siete tratamientos (Trt) y tres fechas de muestreo. La unidad experimental estuvo representada por un frasco de cristal mencionado con dos tallos.

En la Etapa de aclimatación sólo se hizo un conteo visual, con el cual se sacó el porcentaje de sobrevivencia.

En el peso de mil semillas, los datos se procesaron manualmente, sacando una media, error estándar de la media y el coeficiente de variación

Con el propósito de determinar el efecto de los tratamientos sobre la calidad fisiológica de la semilla de gloxinia, se realizó una prueba de germinación estándar utilizando un diseño experimental completamente al azar, representada dos variedades (Var), 18 tratamientos (Trt).

Análisis de Varianza

En la etapa de multiplicación y enraizamiento para cada variable registrada se realizó un análisis de varianza mediante la metodología de un diseño completamente al azar con arreglo factorial usando el procedimiento GLM de SAS (SAS, 1990). En cada análisis de varianza se probaron los efectos de variedad (Var), tratamientos (Trt), días (D) para explorar la variación que generan cada uno de ellos, así como la forma en que interactúan. El modelo lineal utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + V_i + D_j + VD_{ij} + T_k + VT_{ik} + DT_{jk} + VDT_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} es la variable de respuesta; μ el efecto de la media general; V_i , D_j , T_k los efectos principales de variedades, días y tratamientos; VD_{ij} , VT_{ik} , DT_{jk} , VDT_{ijk} , los efectos de las interacciones entre los diferentes factores; y el E_{ijkl} el error experimental.

Donde:

$i = 1, 2$ $V =$ variedades (roja y rosa)

$j = 30, 35, 40, 45$ y 50 $D =$ días

$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$ $T =$ tratamientos.

Experimentos con Mediciones Repetidas

En experimentos donde se tiene que tomar mediciones repetidas, como es el caso de este estudio, es de gran interés conocer la variación en los tratamientos con respecto al tiempo. Es decir, interesa saber los efectos de las interacciones de los tratamientos por tiempo. La varianza entre las unidades experimentales será muy heterogénea con respecto al tiempo. En el análisis de varianza se supone que la correlación entre las observaciones para los diferentes factores de tratamiento es independiente. Sin embargo, en experimentos con mediciones repetidas los niveles del tiempo se ordenan y las observaciones obtenidas serán más correlacionadas con observaciones obtenidas de unidades experimentales separadas (Mead, 1988). Con la información obtenida en las variables en estudio se procedió a realizar un análisis estadístico con mediciones repetidas por cada variedad usando el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS, 1992) utilizando el siguiente modelo lineal.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_{k(i)} + D_j + TD_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$i=1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11$Tratamientos

$j= 30,35,40,45,50$ Días

y_{ijk} es la variable de respuesta; μ efecto de la media general; T_i , D_j y TD_{ij} , los parámetros de efectos fijos asociados a los tratamientos, días y la interacción tratamientos x días; $S_{k(\eta)}$ efecto aleatorio asociado al k-ésimo explante en el i-ésimo tratamiento; E_{ijk} el error experimental.

Análisis de Regresión

Los días después de la siembra es una variable cuantitativa por lo que se puede obtener un modelo en función del tiempo. La tendencia observada con respecto a los días después de la siembra proporcionan ecuaciones que pueden ser utilizadas para comparar y predecir los tratamientos usados en el estudio. Usando el modelo con repeticiones repetidas se procedió a obtener un análisis de regresión sobre los días después de la siembra utilizando el siguiente modelo lineal.

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_i + E_{ij}$$

Donde: y_{ij} = variable en estudio de un tratamiento en el i-ésimo muestreo, X_i = días después de la siembra en i-esimo muestreo, β_0 , β_1 intercepto y coeficiente de regresión respectivamente, E_{ij} = error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con la finalidad de determinar el efecto de los tratamientos en función de las variables evaluadas y con el objetivo de probar las hipótesis planteadas, se realizaron análisis de varianza de acuerdo al modelo estadístico del diseño utilizado, para analizar detalladamente la influencia que ejercen los reguladores del crecimiento (auxinas y citocininas) sobre los explantes de hoja de gloxinia. Los resultados analizados en forma conjunta conducen a situaciones complejas, por lo que se presenta y discute los siguientes resultados por etapas.

Etapas de Iniciación o Establecimiento del Cultivo

En esta etapa se comprobó que el tipo del explante influye en la sobrevivencia y producción de brotes *in vitro*, tomando en cuenta el estado y la edad de la planta madre. Se utilizaron tres tipos de explantes (pecíolo, hoja con nervadura, hoja sin nervadura), se encontró que los mejores resultados para la producción de brotes se obtuvieron con explantes de hoja con nervadura, además que fue el tejido que menos se oxidó; seguido por el explante de hoja sin nervadura observándose poca respuesta, con alto porcentaje de oxidación y el tercer explante que fue el pecíolo no hubo resultados debido a que se oxidó totalmente. Los explantes previamente desinfectados pasaron a un medio MS

sin reguladores donde permanecieron por ocho días, para asegurar su total limpieza como se aprecia en la Figura 4.1.

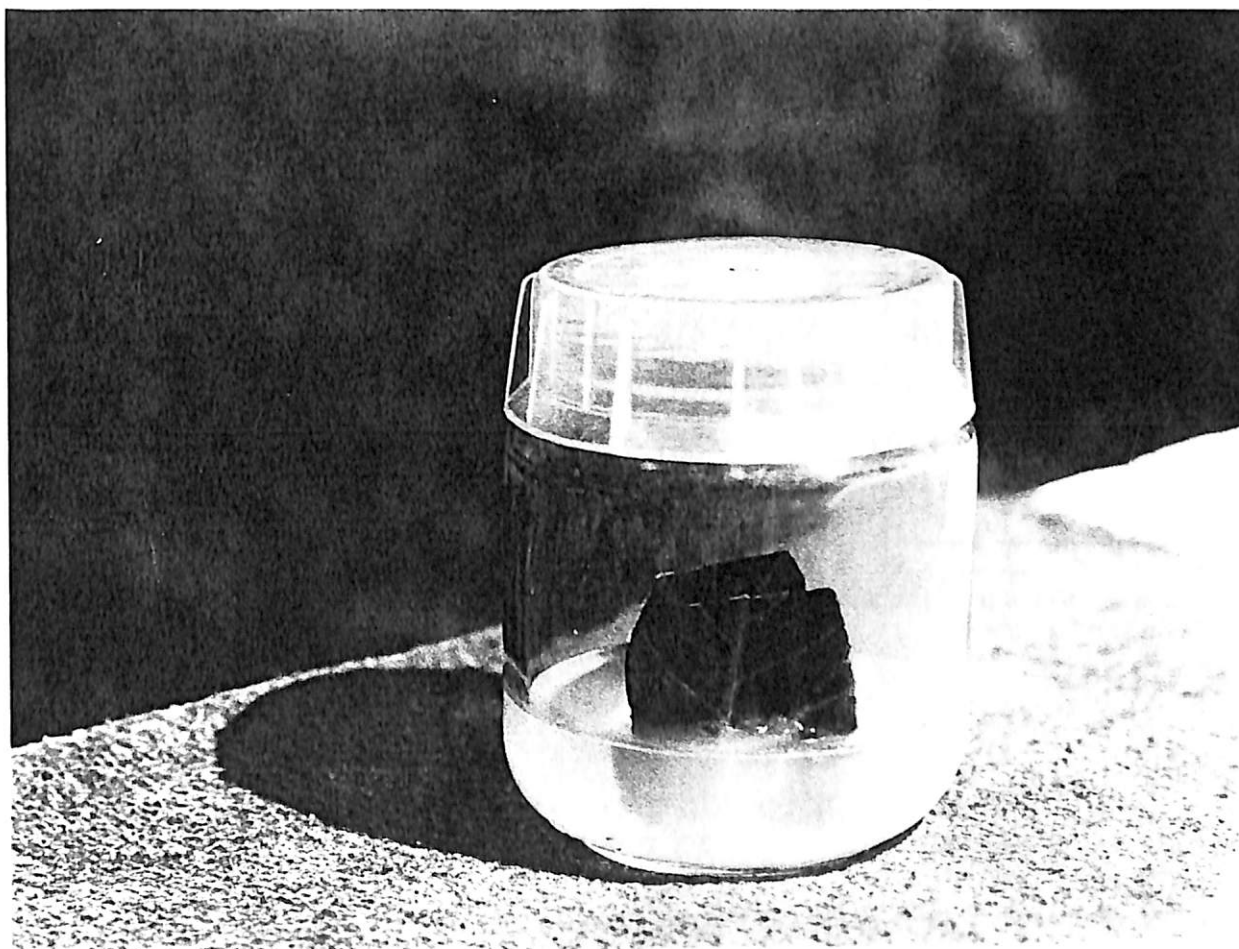


Figura 4.1. Etapa de iniciación o establecimiento del cultivo *in vitro* en gloxinia.

Etapa de Multiplicación de Tallos

En el Cuadro 4.1. se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza para el número de brotes (NB) y longitud de brote (LB).

Cuadro 4.1. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables evaluadas *in vitro*.

F.V.	gl	NB [†]	gl	LB [‡]
Var	1	16.222 **	1	22.928 **
Días	4	7.551 **	4	14.148 **
Var * Días	4	0.283 NS	4	0.093 NS
Trt	10	22.880 **	10	29.636 **
Var * Trt	10	2.131 **	10	3.567 **
Días * Trt	40	0.375 **	40	0.568 **
Var*Días*Trt	40	0.095 NS	40	0.192 NS
Error	1528	0.136	1526	0.180
C.V.(%)		32.1		33.9

[†]NB= número de brotes, [‡]LB= longitud de brote, datos transformados $\sqrt{x+0.5}$

** = significativo al 0.01 de probabilidad.

NS = no significativo.

En este análisis se presentan los cuadrados medios de un análisis factorial donde se prueban los efectos de variedades, días y tratamientos. Se observaron diferencias altamente significativas $P(\leq 0.01)$ para los efectos principales de Var, Días y Trt para NB y LB, así mismo para las interacciones dobles en las dos variables excepto para Var x Días con efectos no significativos. No se encontró diferencias estadísticas en los efectos

relacionados con la triple interacción Var x Días x Trt en ambas variables. Estas diferencias significativas indican que los tratamientos, días y variedades influyen directamente en el número de brotes y longitud de brote. No obstante el que resulte las interacciones de Var x Trt y Días x Trt altamente significativas, se hace necesario realizar un análisis de descomposición de dichas interacciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el número de brotes y longitud de brote están altamente influenciados por el tiempo y el genotipo (Cuadro 4.2). En este cuadro se observa que la variedad rosa mostró superioridad en ambas variables, con respecto a la variedad roja en las variables número de brotes (NB) y longitud de brotes (LB) durante las cinco fechas de muestreo consideradas en el trabajo. De acuerdo con los resultados obtenidos resulta evidente que a los 50 días después de la siembra el NB alcanza un promedio de 1.13 brotes/explante en la variedad roja, sin embargo la variedad rosa alcanza un promedio de 1.17 brotes/explante a los 35 días, incrementándose notablemente a los 50 días con un promedio de 2.21 brotes/explante. Para la evaluación de la variable longitud de brote (LB) en la variedad roja a los 50 días alcanzan una longitud notable de 2.0 cm, mientras que en la variedad rosa se incrementa alcanzando 2.91 cm.

La variable LB es de carácter cuantitativo que permite determinar el grado de crecimiento vegetativo de la planta, esto no es más que la respuesta a acción de los reguladores de crecimiento, así como los nutrientes y características genéticas de la planta madre.

Cuadro 4.2. Medias del número de brotes obtenidos a diferentes fechas de muestreo, en gloxinia cultivada *in vitro*.

Variedad	Fechas de muestreo (d)					X
	30 [†]	35	40	45	50	
		Número	De	Brotos		
Roja	0.29	0.56	0.85	1.12	1.13	0.78 b [‡]
Rosa	0.61	1.17	1.51	2.04	2.21	1.51 a
		Longitud	De	brote (cm)		
Roja	0.24	0.77	1.02	1.57	2.00	1.12 b
Rosa	0.83	1.72	1.89	2.33	2.91	1.93 a

[†] días después de la siembra.

[‡] Diferencia mínima significativa ($\alpha=0.05$).

El tiempo más adecuado para realizar subcultivos y pasar a la siguiente etapa de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de gloxinia es a los 45 y 50 días, ya que se obtiene un número considerable de brotes por explante con buena longitud y de buena calidad, resulta muy evidente la superioridad del genotipo de la variedad rosa en ambas variables con respecto a la variedad roja como se aprecia en la Figura 4.2. y 4.3.

En relación a los resultados, Hurtado y Merino (1987) señalan que los procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más complejos, ya que éstos están influenciados por otros factores no hormonales tales como los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos, que son agregados al medio, efectos físicos como la luz, temperatura, consistencia del medio, la calidad y el tipo de tejido empleado como explante.

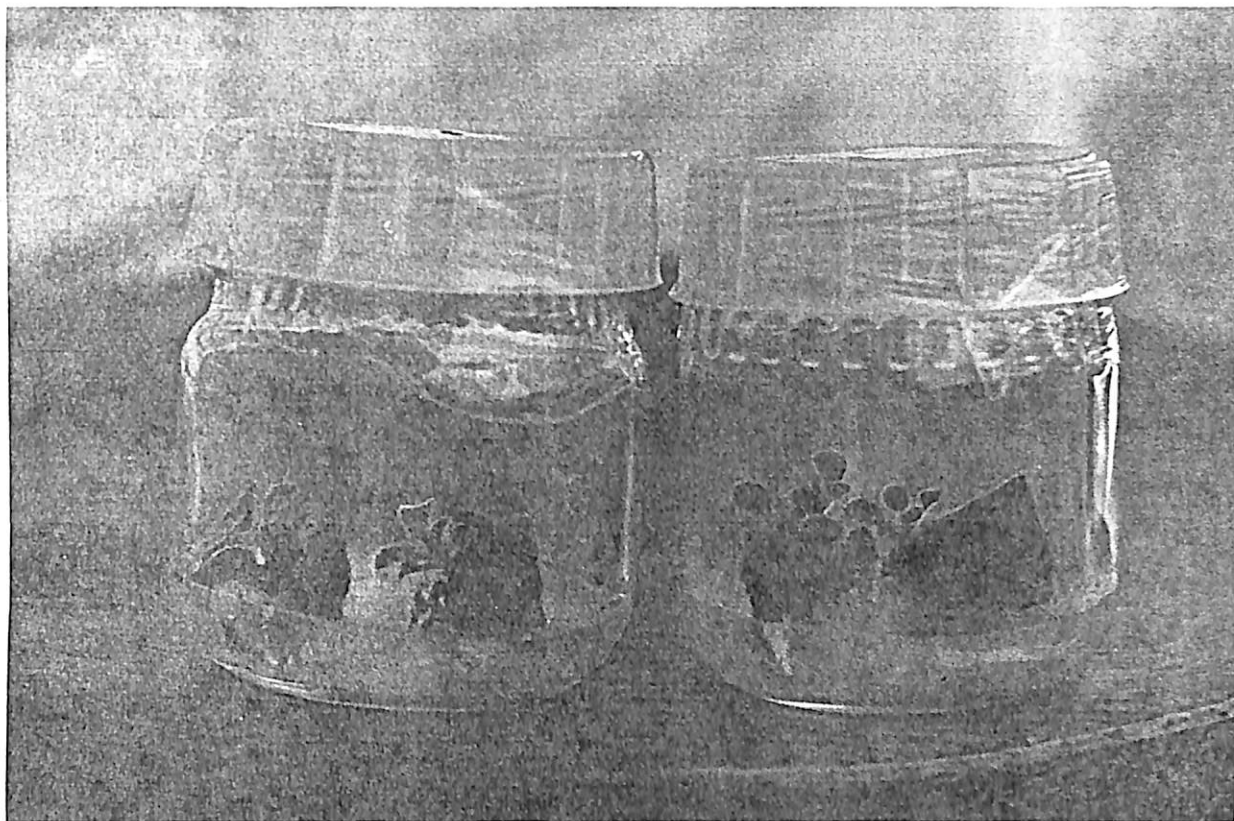


Fig.4.2. Influencia de los reguladores del crecimiento en la multiplicación de tallos en la variedad roja.

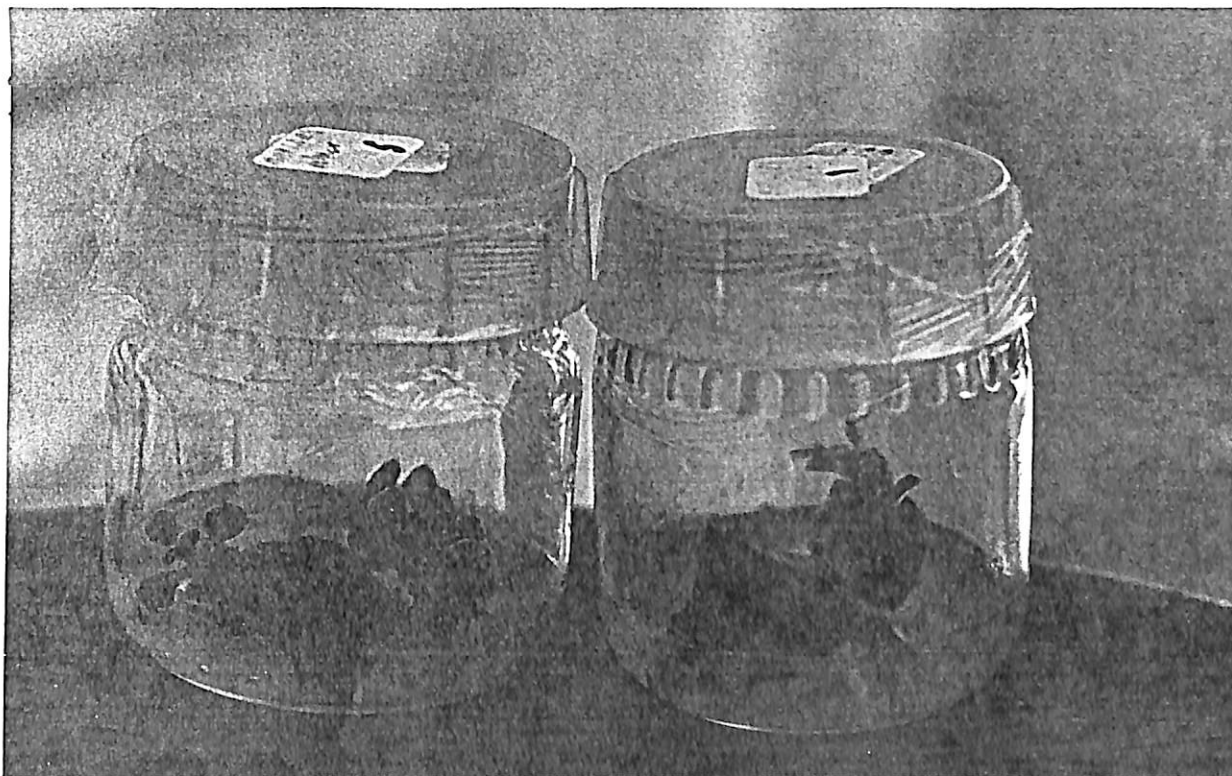


Fig.4.3. Multiplicación de tallos en la variedad rosa a los 45 días después de la siembra *in vitro*.

La significancia estadística de los efectos principales de días se analizó en relación al número de brotes y longitud de brotes en el Cuadro 4.3 donde a los 30 días de cultivo manifiestan un valor promedio de 0.45 brotes mismo que se incrementa hasta 1.66 a los 50 días de cultivo. Lo anterior indica que es importante considerar el factor tiempo para realizar el subcultivo ya que esto permitirá obtener el mayor número de brotes. Se encontró que el número de brotes a los 45 y 50 días es estadísticamente igual, lo cual para propósitos comerciales es más conveniente la producción de brotes a los 45 días. En lo que respecta a longitud de brote, en las diferentes fechas de muestreo se observó que este parámetro es también influenciado por el tiempo, en donde a los 30 días de cultivo manifestó un valor promedio de 0.53 cm de longitud mismo que se incremento hasta 2.45 cm a los 50 días de cultivo. Los resultados indican que es importante considerar un tiempo de al menos 45 días para realizar el subcultivo.

Cuadro 4.3. Medias para las variables número de brotes(NB) y longitud de brote (LB) en la etapa de multiplicación de tallos de gloxinia cultivada *in vitro* a diferentes días.

Días	Número de brotes	Longitud de brote (cm)
30	0.45 d [†]	0.53 d
35	0.87 c	1.26 c
40	1.19 b	1.47 c
45	1.57 a	1.95 b
50	1.66 a	2.45 a

[†] Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$). DMS= diferencia mínima significativa.

Para observar detalladamente el comportamiento de cada uno de los tratamientos sobre las variables NB y LB, se realizó una comparación múltiple de medias DMS $\alpha=0.05$ de todos los tratamientos para determinar cual fue superior (Cuadro 4.4). Los resultados muestran que el tratamiento diez donde se utilizó 0.8 mgL^{-1} AIA + 1.4 mgL^{-1} BAP fue el mejor para ambas variables NB y LB con un promedio de 2.82 brotes/explante y 3.34 cm de longitud, respectivamente. Siguieron los tratamientos ocho y nueve que estadísticamente son iguales, donde la concentración de BAP estuvo en un rango de 1.0 a 1.2 mgL^{-1} , mientras que la concentración de AIA se mantuvo con un valor constante de 0.8 mgL^{-1} . Sin embargo, para la variable LB, los tratamientos ocho, nueve y diez son estadísticamente iguales, representando una diferencia sólo en las unidades de BAP ($1.4, 1.2, 1.0 \text{ mgL}^{-1}$) como se observa en el Cuadro 4.4. Para el tratamiento 11 considerado testigo se obtuvo resultados no favorables, ya que fueron los promedios más bajos para ambas variables. Esto se debió principalmente a la ausencia de reguladores del crecimiento, es decir, que los reguladores de crecimiento influyen positivamente en la formación de brotes.

El número de brotes por explante es satisfactorio si consideramos, que propagar gloxinia en forma convencional, por cada semilla se obtiene una planta adulta a los 240 días.

Los resultados obtenidos concuerdan con un estudio realizado por Johnson (1978) en donde propagó gloxinias utilizando explantes de hoja cultivados en MS complementado con 1.6 mgL^{-1} de AIA + 0.7 mgL^{-1} de cinetina,

tratamiento que le permitió obtener de uno a diez plantas por explante. En el presente trabajo se utilizaron concentraciones de 0.5 a 1.5 mgL⁻¹ de AIA , 5.0 a 10 mgL⁻¹ de cinetina y 0.8 a 1.4 mgL⁻¹ de BAP obteniendo un promedio de 2 brotes/explante de buen tamaño y buena calidad.

Cuadro 4.4. Medias de tratamientos utilizados para las variables evaluadas en la etapa de multiplicación de tallos cultivados *in vitro* de gloxinia.

Tratamientos	Número de brotes		Longitud de brote (cm)	
1 (0.5 mgL ⁻¹ AIA + 5 mgL ⁻¹ C)	0.51	de [†]	0.92	c
2 (0.5 mgL ⁻¹ AIA + 10 mgL ⁻¹ C)	0.31	ef	0.50	de
3 (1.0 mgL ⁻¹ AIA + 5 mgL ⁻¹ C)	0.31	ef	0.57	d
4 (1.0 mgL ⁻¹ AIA + 10 mgL ⁻¹ C)	0.14	f	0.24	ef
5 (1.5 mgL ⁻¹ AIA + 5 mgL ⁻¹ C)	0.63	d	0.78	cd
6 (1.5 mgL ⁻¹ AIA + 10 mgL ⁻¹ C)	0.22	f	0.53	de
7 (0.8 mgL ⁻¹ AIA +0.8 mgL ⁻¹ BAP)	1.60	c	2.20	b
8 (0.8 mgL ⁻¹ AIA +1.0 mgL ⁻¹ BAP)	2.24	b	3.11	a
9 (0.8 mgL ⁻¹ AIA +1.2 mgL ⁻¹ BAP)	2.45	b	3.06	a
10 (0.8 mgL ⁻¹ AIA +1.4 mgL ⁻¹ BAP)	2.82	a	3.34	a
11 (0+0)	0.04	f	0.05	f

[†] Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$): DMS = Diferencia mínima significativa.

Hurtado y Merino (1987) mencionan que si la proporción de auxina-citocininas es relativamente alta, existe diferenciación de las células hacia primordios radicales, de lo contrario una alta concentración de citocininas con respecto a auxinas causan formación de brotes. De acuerdo con esto, el tratamiento diez resultó superior a todos en ambas variables, lo cual se debió a

una alta concentración de citocininas representada por BAP (1.4 mgL^{-1}) y con una reducción de auxinas a 0.8 mgL^{-1} de AIA. Sin embargo concentraciones excesivas de citocininas pueden llegar a reducir el número de brotes o inhibir el proceso de brotación como sucedió con el tratamiento 4 con 1.0 mgL^{-1} AIA + 10 mgL^{-1} Cinetina (Figura 4.4 y 4.5)

En otro estudio realizado en gloxinia por Muangkaewgam y Chato (1992) en donde cultivaron explantes en un medio MS suplementado con 1.0 mgL^{-1} de AIA y 5 mgL^{-1} de cinetina, obtuvieron desarrollo de tallos en tres semanas. Lo anterior confirma que las citocininas combinadas con auxinas estimulan la división celular (Hurtado y Merino, 1987).

Devlin (1982) menciona que la cinetina y el AIA son reguladores que usados en forma separada producen una pequeña respuesta, esta no es continua y disminuye después de un período de tiempo relativamente corto. Sin embargo, cuando se utiliza conjuntamente en proporciones convenientes, se pueden obtener resultados favorables.

Los resultados del análisis de varianza presentados en el Cuadro 4.1, en particular la significancia de los efectos de variedades y de la interacción Días x Trt, sugieren efectuar un análisis individual por cada variedad. De esta manera, se pretende obtener información sobre el comportamiento de los tratamientos a través del tiempo de muestreo (30 a 50 días), es decir, el análisis

de un modelo con mediciones repetidas. Los cuadrados medios del análisis de varianza para la variedad roja se presentan en el Cuadro 4.5.

Cuadro 4.5. Cuadrados medios del análisis de varianza para un modelo con mediciones repetidas en la variedad roja.

F.V.	gl	NB [†]	LB [†]
Trt	10	7.847 **	11.569 **
Explante/ Trt	11	0.150	0.384
Días	4	2.600 **	6.802 **
Trt x Días	40	0.199 **	0.449 **
Error	753	0.107	0.158
C.V. (%)		31.8	35.5

[†] número de brotes y longitud de brote, datos transformados $\sqrt{x+0.5}$.

** significativo al 0.01 de probabilidad.

Examinando los cuadrados medios para la variedad roja (Cuadro 4.5.) se detectaron diferencias altamente significativas para Tratamientos, Días, así como la interacción de Trt x Días, tanto para el número de brotes como la longitud de brotes. Estas diferencias indican que las variables NB y LB están altamente influenciados por la diferentes concentraciones de auxinas y citocininas evaluadas y el factor tiempo. El número de brotes por explante es una variable a evaluar muy importante ya que de esta dependerá en gran medida el éxito de la producción de plantas obtenidas *in vitro* a partir de explantes de hoja.

Krikorian (1991a) señala que las auxinas producen el agrandamiento y alargamiento celular además de promover la división celular (formación de

callo). Una de las teorías menciona que las auxinas incrementan la flexibilidad de las paredes, disminuyendo la presión de esta alrededor de la célula y la presión de la turgencia causada por las fuerzas osmóticas. en la savia vacuolar, hacen que el agua entre a las células, provocando su expansión, resultando en alargamiento de las células.

La cinetina, es una de las citocininas más usadas, tienen efecto sobre la división celular, alargamiento celular y tiene un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* a partir de fragmentos de hojas (Pierik, 1987; Rojas y Ramírez, 1987).

Combinando los efectos de las auxinas y las citocininas se pudieron detectar diferencias en las variables NB y LB.

Gamborg *et al.* (1976) mencionan que el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección de los nutrientes del medio de cultivo e indican que las células de muchas especies de plantas pueden crecer en medios completamente definidos. Tal es el caso de la gloxinia, que produjo más tallos con una combinación de 0.8 mgL^{-1} AIA + 1.4 mgL^{-1} BAP.

Al contar el número de brotes originados en el explante de hoja con nervadura de la variedad roja como se aprecia en la Figura 4.4. El tratamiento ocho a los 30 días presentó brotación alcanzando a los 50 días un promedio de 3 brotes/explante, los tratamientos diez y nueve alcanzaron un promedio 2.5

brotos/explante a los 50 días, mientras que el testigo se mantuvo sin brotes desde los 30 a 50 días durante la etapa de multiplicación.

En la Figura 4.5 se observó claramente la influencia de los días sobre las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento, el tratamiento nueve fue el que presentó mayor longitud de brote alcanzando un promedio de cinco cm a los 50 días, sin embargo, este mismo tratamiento no fue el mejor para número de brotes. La diferencia relativa en el comportamiento de los tratamientos en las Figuras 4.4 y 4.5 se debe a la interacción Var x Trt (Cuadro 4.1).

Observando las Figuras 4.4 y 4.5, los tres mejores tratamientos diez, nueve y ocho presentaron resultados favorables para la variedad roja en cuanto a número y longitud de brotes. Es claro que al comparar las dos citocininas (Cinetina y BAP) que se utilizaron en este trabajo, la que mostró los mejores resultados halagadores fue BAP a diferentes concentraciones, para ambas variables en los dos genotipos.

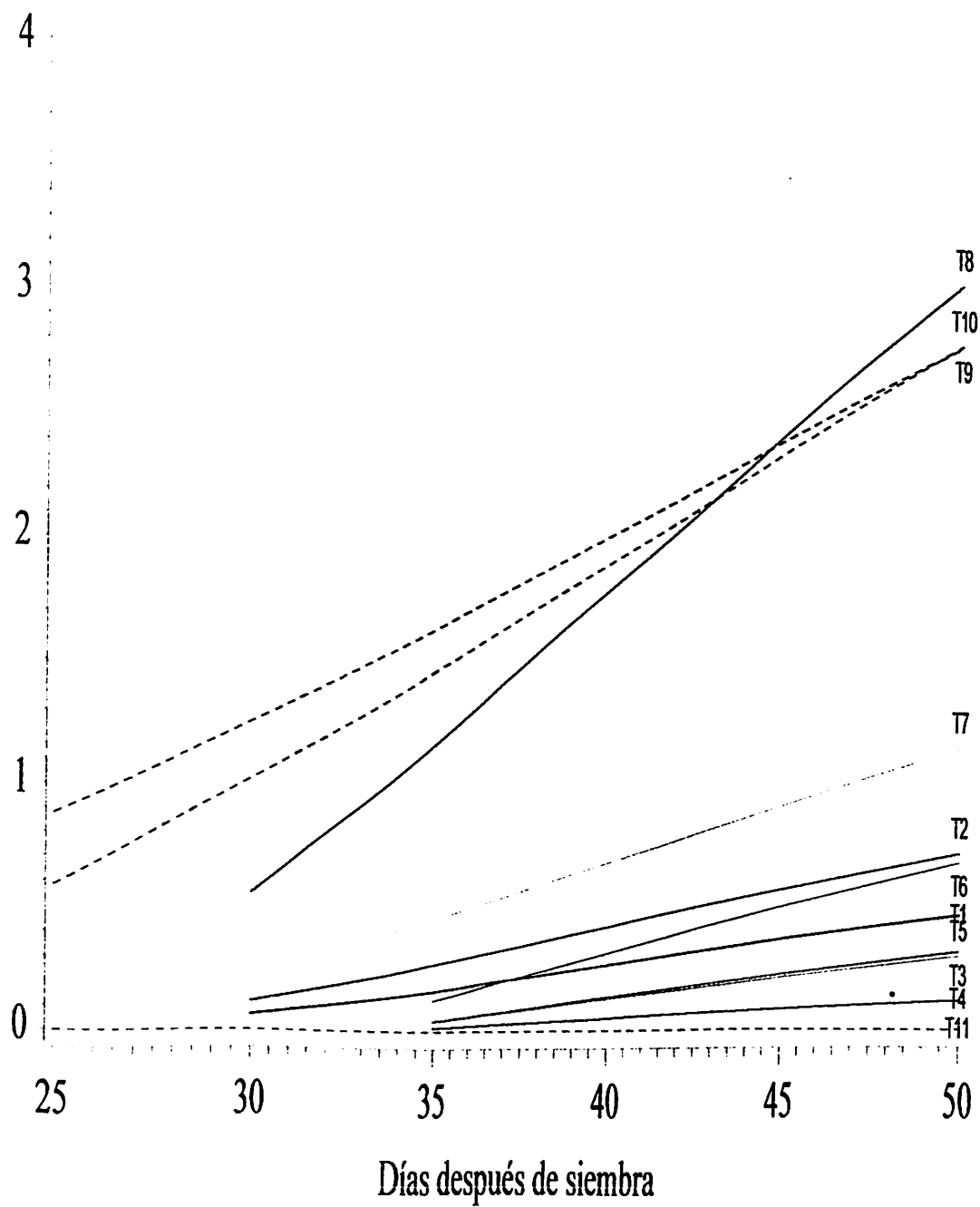


Figura 4.4. Comportamiento de los tratamientos sobre la variable número de brotes en la variedad roja.

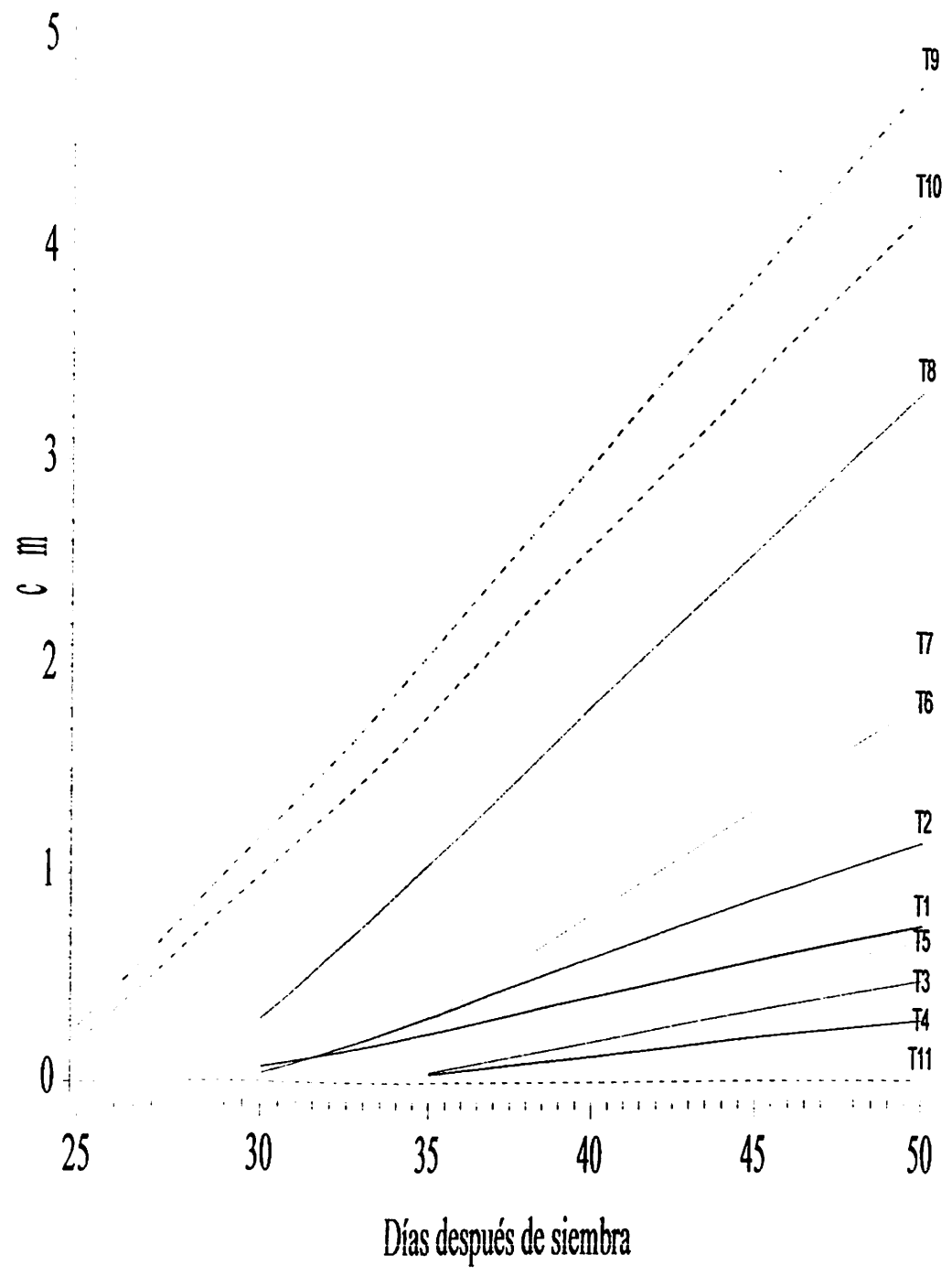


Figura 4.5. Efecto de tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la variedad roja.

En el Cuadro 4.6 se analizan los cuadrados medios de análisis de varianza para la variedad rosa.

Cuadro 4.6. Cuadrados medios del análisis de varianza para un modelo con mediciones repetidas en la variedad rosa.

F.V.	gl	NB [†]	gl	LB [†]
Trt	10	17.313 **	10	22.263 **
Explante/ Trt	11	0.577	11	0.255
Días	4	5.158 **	4	7.403 **
Trt x Días	40	0.270 **	40	0.314 *
Error	753	0.158	751	0.199
Total	818		816	
C.V. (%)		31.5		32.2

[†] Número de brotes (NB) y Longitud de brotes (LB), datos transformados $\sqrt{x + 0.5}$
*, ** significativo al 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente.

Analizando los cuadrados medios para la variedad rosa (Cuadro 4.6.) se detectó diferencias altamente significativas para Tratamientos, Días y la interacción Trt x Días para ambas variables excepto la interacción Trt x Días en longitud de brotes con significancia al 0.05 de probabilidad. Estos resultados son muy similares a los que se muestran en la variedad roja (Cuadro 4.5).

En la Figura 4.6 se observa la tendencia de los tratamientos en la variedad rosa con respecto al número de brotes, donde el tratamiento diez (0.8 mgL⁻¹ AIA + 1.4 mgL⁻¹ BAP) fue superior a los demás tratamientos, y el tratamiento 11 considerado como testigo se mantuvo sin resultados.

Se observó la tendencia de los tratamientos en la variedad rosa con respecto a la variable longitud de brotes (Figura 4.7). El tratamiento ocho fue el mejor para inducir longitud de brotes no así para número de brotes donde se colocó como el tercer tratamiento (Figura 4.6). Enseguida fue el tratamiento diez y siete que se colocaron dentro de los tres mejores tratamientos que respondieron favorablemente, estas diferencias indican que las variables en estudio están influenciadas por las concentraciones de auxinas, citocininas y el genotipo. Al igual que en la variedad roja, la diferencia relativa en el comportamiento de los tratamientos se debe a la interacción Var x Trt (Cuadro 4.1).

Comparando ambos genotipos, los mejores resultados se encontraron en la variedad rosa y con las concentraciones de AIA + BAP. El tratamiento 11 se mantuvo sin resultados para ambas variables y para ambos genotipos.

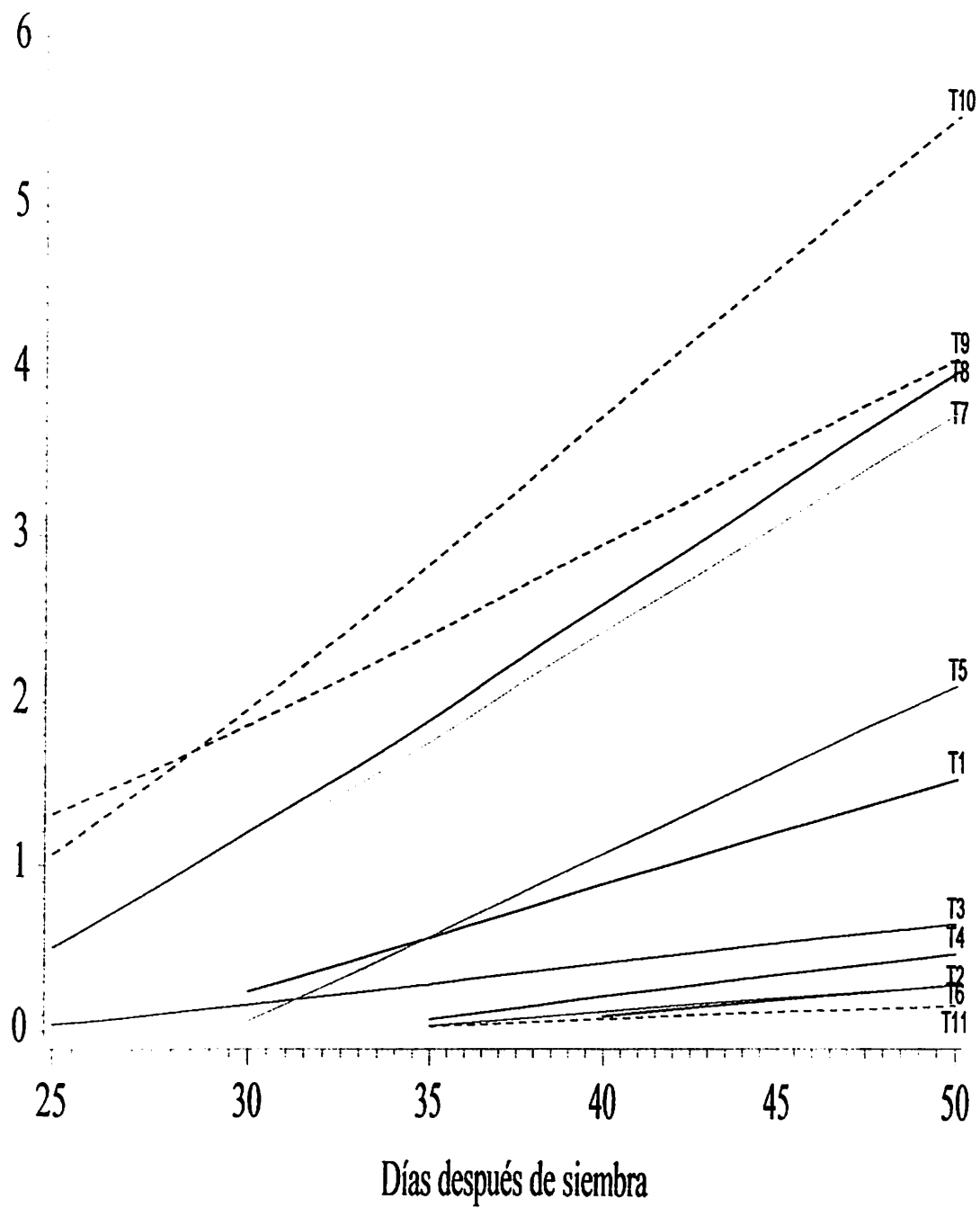


Figura 4.6. Comportamiento de las auxinas y citocininas a través del tiempo sobre la variable número de brotes (NB) en la variedad rosa.

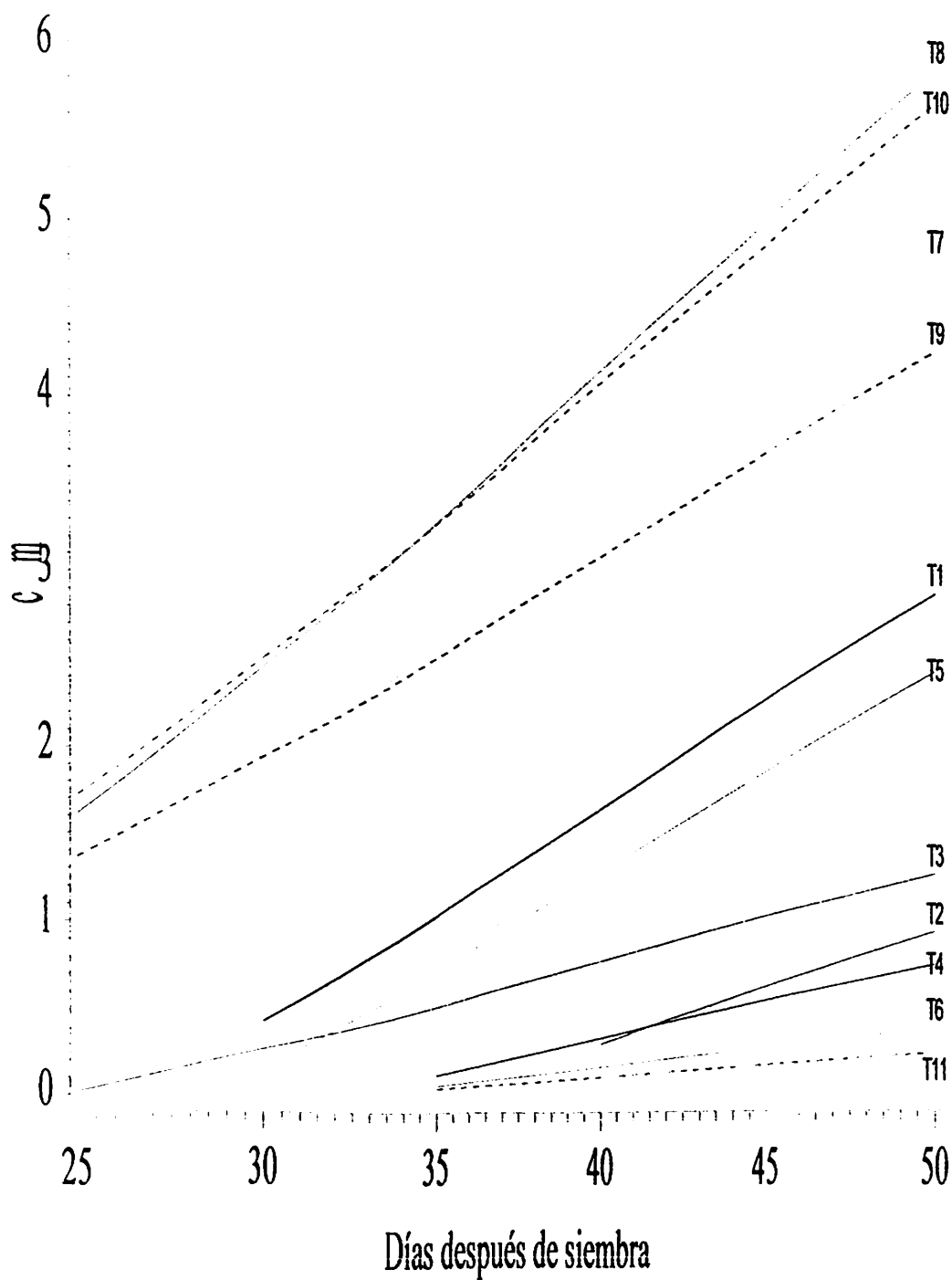


Figura 4.7. Efecto de los días sobre los tratamientos en la variable longitud de brotes (LB) en la variedad rosa.

Etapa de Enraizamiento

El enraizamiento es una etapa importante en la micropropagación por que permite asegurar la transferencia de las plantas cultivadas *in vitro* a suelo. El número y longitud de raíces que produce un tallo define la calidad final de la planta, debido a que, mientras mayor número de raíces presente mayor capacidad de exploración, la longitud de raíces no influye directamente en el prendimiento o sobrevivencia de la planta. En el Cuadro 4.7 se muestran los cuadrados medios para las variables número de raíces y longitud de raíces, así como su significancia estadística y coeficientes de variación.

Cuadro 4.7. Cuadrados medios del análisis de varianza, para las variables evaluadas en la etapa de enraizamiento.

F.V.	gl	NR [†]		LR [‡]	
Var	1	2.352	**	4.853	**
Días	2	78.945	**	65.599	**
Var*Días	2	0.157	NS	1.034	*
Trt	6	1.100	**	0.866	*
Var*Trt	6	1.425	**	0.399	NS
Días*Trt	12	0.216	NS	0.425	NS
Var*Días*Trt	12	0.156	NS	0.375	NS
Error	679	0.301		0.311	
C.V.(%)		34.90		35.71	

[†]NR= número de raíces, [‡]LB= Longitud de raíces, datos transformados $(\sqrt{x + 0.5})$
 * ** significativo al 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente.
 NS, no significativo.

Se detectaron diferencias altamente significativas ($\alpha=0.01$) para las variables número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR) dentro del factor Variedad, Días y Tratamientos, excepto en la longitud de raíz donde se encontró una diferencia significativa al ($\alpha=0.05$). Respecto a la fuente de variación en las interacciones Var x Días se observó significancia ($\alpha=0.05$) en LR, en tanto que para el NR no se encontró diferencia significativa. En la interacción Var x Trt la variable número de raíces (NR) fue altamente significativa, mientras que para longitud de raíces (LR) no se encontró efectos significativos. En la interacción Días x Trt no se encontró diferencias significativas para ambas variables, sucediendo lo mismo para la triple interacción Var x Días x Trt. Lo anterior indica sólo las diferencias en los efectos principales para Variedad, Días y Tratamientos, tanto en el número como en la longitud de raíces. La información del Cuadro 4.7 muestra que sólo en el número de raíces se encontró una respuesta diferencial de las dos variedades a los tratamientos.

Para discutir más detalladamente los efectos de las auxinas sobre el proceso de enraizamiento, en el Cuadro 4.8 se muestran las medias de variedades, días y tratamientos donde se utilizó reguladores del crecimiento (AIA y AIB).

La variedad rosa mostró superioridad a la variedad roja en las dos variables evaluadas (Cuadro 4.8). A los diez días se inicia el enraizamiento, sin embargo la mejor respuesta se obtuvo a los 30 días después de transferir a

medio enraizador, en todas las variables estudiadas, el promedio de número de raíces fue de 4.10 raíces/tallo, y el promedio de longitud de raíz fue de 3.83 cm.

Cuadro 4.8. Medias de variedades, días y tratamientos para las variables en estudios en la etapa de enraizamiento.

Fuente		Número de raíces (NR)	Longitud de raíces (LR) cm
Var	Rosa	2.67 a [†]	2.69 a
	Roja	2.32 b	2.18 b
Días	10	0.61 c	0.75 c
	20	2.80 b	2.75 b
	30	4.10 a	3.83 a
Trt	1 (0.0)	2.47 b	2.51 a
	2 (0.1) AIA	2.25 b	2.33 ab
	3 (0.5) AIA	2.17 b	1.93 b
	4 (1.0) AIA	2.54 ab	2.70 a
	5 (0.1) AIB	2.37 b	2.39 ab
	6 (0.5) AIB	2.63 ab	2.70 a
	7 (1.0) AIB	3.04 a	2.52 a

[†] Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$): DMS= Diferencia mínima significativa.

En la comparación de los tratamientos no existe un patrón definido en relación a la producción y longitud de raíces. Con respecto al número de raíces, el tratamiento siete obtuvo el valor promedio más alto de 3.04, sin embargo, estadísticamente es similar a los efectos de los tratamientos seis y cuatro. Por otro lado se encontró que los resultados del testigo fueron estadísticamente iguales a los tratamientos dos, tres, cuatro, cinco y seis, indicando que en el

presente estudio no se pudo diferenciar claramente los efectos del AIA y AIB en el número de raíces en las dos variedades de gloxinia. Con respecto a la longitud de raíces, no se detectaron diferencias estadísticas como respuesta de la aplicación de los tratamientos debido a que todos los tratamientos incluyendo el testigo fueron estadísticamente iguales excepto el tratamiento tres con una concentración de 0.5 mgL^{-1} AIA que presentó resultados poco favorables para ambas variables ya que registró los valores promedios más bajos de todos los tratamientos (Cuadro 4.8). Lo anterior confirma lo expuesto por García y Carballo (1987); Muangkaewngam y Chato (1992) el no utilizar reguladores del crecimiento en la etapa de enraizamiento. .

García y Carballo (1987) establecieron un protocolo para propagar violeta africana *in vitro*, para inducir enraizamiento utilizaron MS con las sales diluidas al 50 por ciento y sin reguladores de crecimiento, logrando el enraizamiento a los 60 días después de la siembra. Este protocolo coincide con este trabajo, ya que se utilizó el mismo procedimiento iniciando el enraizamiento a los 70 días y el testigo (sin reguladores del crecimiento) produjo número y tamaño de raíces similares a los tratamientos.

Otras investigaciones realizadas por Muangkaewngam y Chato (1992) presentaron resultados similares, ya que utilizaron MS al 50 por ciento sin reguladores de crecimiento, teniendo éxito en la etapa de enraizamiento.

Sin embargo, Paek y Han (1988) propagaron gloxinia, logrando enraizamiento con 1 a 3 mgL⁻¹ de AIB.

Las citocininas son innecesarias para la iniciación radical incluso en los niveles más bajos de concentración y las auxinas son las más importantes para la inducción de raíces. Aunque algunos trabajos antes mencionados reportaron la no utilización de reguladores de crecimiento para la proliferación de raíces.

Para propósitos comerciales es más conveniente no utilizar AIA y AIB en esta etapa, debido a que los tallos de gloxinia responden favorablemente al enraizamiento sin auxinas, ya que de acuerdo al presente trabajo se desarrollaron raíces sin la presencia de reguladores del crecimiento.

Los resultados del análisis de varianza presentados en el Cuadro 4.7 en particular la significancia presentada en Variedades, Tratamiento y Días, además de la información presentada en el Cuadro 4.8 sugieren analizar estos efectos por variedad. En el Cuadro 4.9 se presenta un análisis individual para la variedad roja, para obtener información más detallada del efecto del tiempo sobre los tratamientos, en el cual se aprecia que los tratamientos aplicados a cada variedad no mostraron diferencias estadísticas.

Cuadro 4.9. Cuadrados medios del análisis de varianza para número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR) de la variedad roja en la etapa de enraizamiento *in vitro*.

F.V.	Gl	NR [†]	LR [†]
Trt	6	0.822 NS	0.575 NS
Tallos/Trt	7	0.356	0.435
Días	2	34.426 **	34.116 **
Trt x Días	12	0.196 NS	0.342 NS
Error	320	0.300	0.281
C.V. (%)		36.1	35.8

[†]NR= número de raíces, LR= longitud de raíces, datos transformados ($\sqrt{x+0.5}$).
 *, ** significativo al 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente.
 NS= no significativo.

Observando el análisis de varianza del Cuadro 4.9 se detectó alta significancia para la fuente de variación Días en las variables número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR), es decir, el tiempo influye positivamente en el crecimiento y desarrollo de raíces. Sin embargo, en los tratamientos, los efectos no fueron significativos para ambas variables, al igual que para la interacción Trt x Días.

En forma similar a la variedad roja, los cuadrados medios del análisis de varianza para Tratamientos, Días, así como su interacción y el coeficiente de variación de la variedad rosa se presentan en el Cuadro 4.10.

Cuadro 4.10. Cuadrados medios del análisis de varianza para número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR) de la variedad rosa en la etapa de enraizamiento.

F.V.	gl	NR [†]	LR [†]
Trt	6	1.650 NS	0.670 NS
Tallos/Trt	7	0.632	0.905
Días	2	42.915 **	32.443 **
Trt x Días	12	0.183 NS	0.452 NS
Error	345	0.293	0.324
C.V. (%)		33.4	34.8

[†]NR= número de raíces, LR= longitud de raíces, datos transformados ($\sqrt{x + 0.5}$).

*,** significativo al 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente.

NS= no significativo.

Se detectaron diferencias altamente significativas ($\alpha=0.01$) para la fuente de variación Días en las variables NR y LR, sin embargo para Trt y la interacción Trt x Días resultó no significativo para las variables en estudio. Se obtuvieron coeficientes de variación de 33.4 y 34.8 por ciento respectivamente. Los análisis de varianza presentados en los Cuadros 4.9 y 4.10 indican sólo la importancia relativa de las etapas de muestreo, no así para la comparación entre tratamientos que resultaron ser estadísticamente similares para ambas variables. La interacción Trt x Días resultó ser no significativa en ambos análisis lo que indica que no hay efecto de los tratamientos con respecto a los muestreos. Los resultados obtenidos por cada variedad (Cuadro 4.9 y 4.10) justifican los resultados y discusión en relación del Cuadro 4.8, indicando la confusión de efectos y la dificultad de la interpretación cuando se analiza la información en forma global.

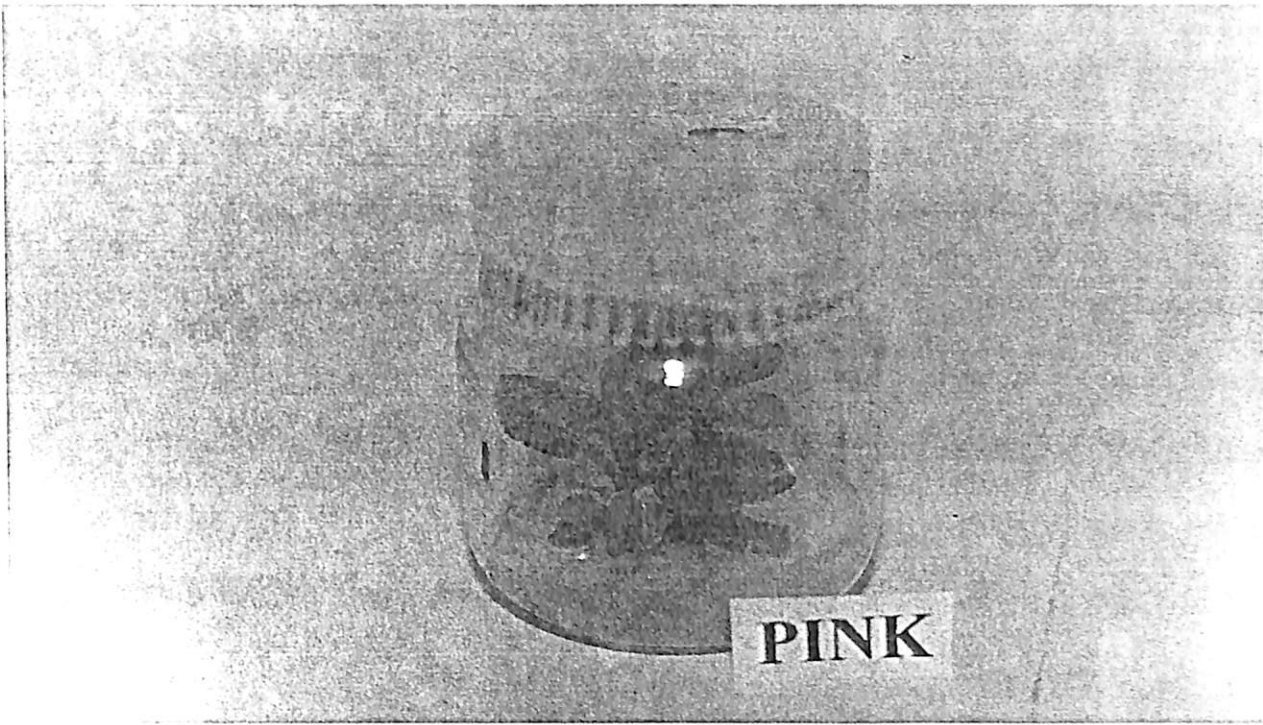


Figura 4.8. Enraizamiento de tallos de gloxinia, variedad rosa, a 80 días *in vitro*.

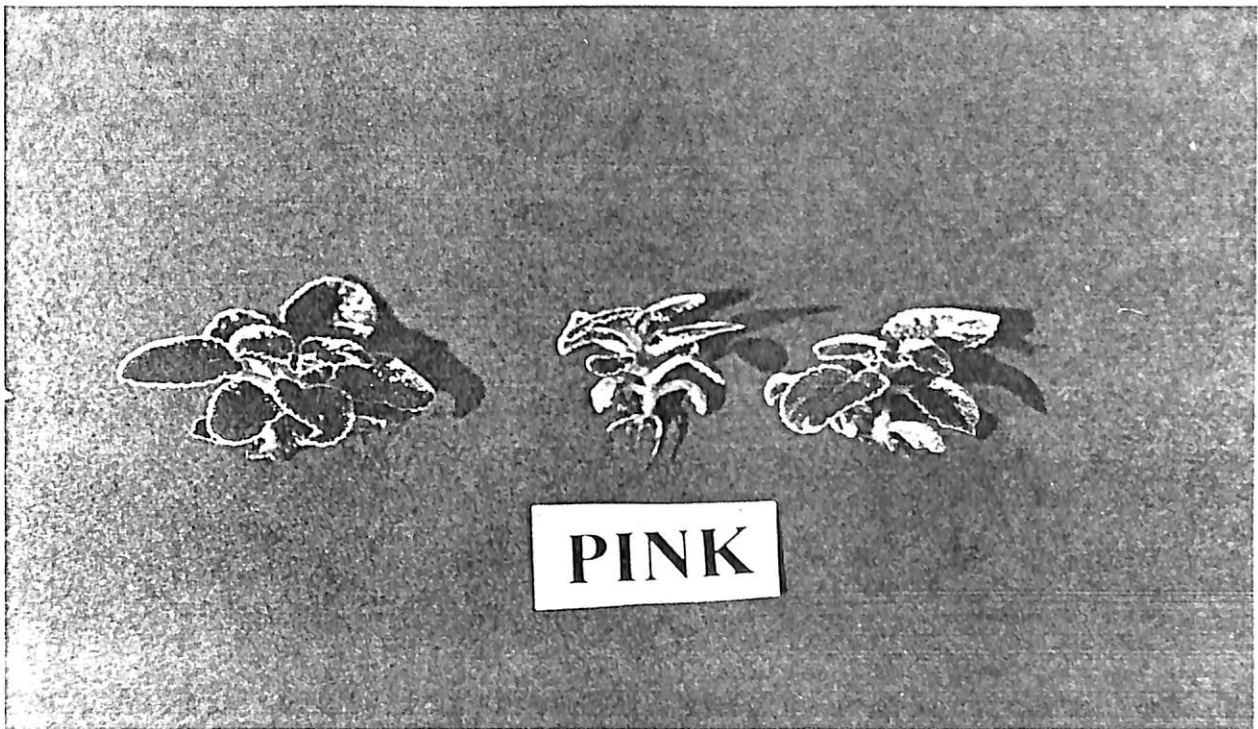


Figura 4.9. Tallos enraizados a los 90 días después de la siembra en la variedad rosa.

Etapa de Aclimatación.

La aclimatación de la planta obtenida se efectúa lavando cuidadosamente las raíces para eliminar los restos del medio de cultivo y se replantan en charolas con suelo artificial previamente esterilizado con vapor de agua. Una vez efectuado la etapa de aclimatación, las plantas son colocadas en el invernadero con un buen sistema de drenaje y aireación para evitar el desarrollo de hongos y bacterias.

Al realizar la fase de aclimatación los resultados obtenidos fueron satisfactorios, de las cien plántulas de cada genotipo aclimatadas, se realizó el conteo a los 5 días, teniendo un 100 por ciento de sobrevivencia, esto reflejó el prendimiento de las plantulas en sustrato. La gloxinia presenta en la parte basal un bulbo donde acumula las reservas, tal vez sea por esta característica el número y longitud de raíces no influye directamente en la etapa de aclimatación
Figura 4.10.

Hurtado y Merino (1987) mencionó que durante la etapa de aclimatación los cultivos deberán ser colocados durante dos semanas bajo un ambiente controlado, donde la humedad relativa sea cerca del cien por ciento.

Las plántulas con mayor número de raíces, se observó que éstas rápidamente se aclimataron presentando hojas vigorosas, con una coloración verde intenso, en cambio las plántulas con pocas raíces presentaron una

coloración verde limonado. Sin embargo, a 30 días después de su aclimatación todas las plántulas tomaron una apariencia vigorosa con un color verde brillante, debido que a partir de los cinco días se aplicó riegos con solución nutritiva (Cuadro 2.A.) que contiene macronutrientes, micronutrientes y solución de hierro a intervalos de 10 días, esta solución nutritiva influyó en la apariencia uniforme de las plantas de gloxinia (Figura 4.11). A los 180 días estas plantas iniciaron la fase de floración (Figura 4.12).



Figura 4.10 Aclimatación de tallos de gloxinia, a los 105 días de cultivo *in vitro*.



Figura 4.11. Transferencia de plántulas de gloxinia a maceta individual a los 30 días de aclimatación.



Figura 4.12. Planta de gloxinia en la fase de floración, después de 180 días a partir de la siembra *in vitro*.

Calidad de la Semilla de Gloxinia

La calidad de la semilla es el conjunto de características ó cualidades deseables en la semilla que la hace útil para la siembra y se encuentra comprendida en cuatro componentes básicos: genético, sanitario, fisiológico y físico (Bustamante, 1998).

Peso de Mil Semillas.

El peso de mil semillas nos da una idea de cuan pequeña es la semilla, los cálculos se hicieron manualmente reportándose en g. La variedad roja presentó una media de 2.81×10^{-3} g, un error estándar de la media de 3.27×10^{-5} y un coeficiente de variación de 3.52 por ciento. En la variedad rosa presentó una media de 2.82×10^{-3} g, un error estándar de la media de 3.13×10^{-5} y un coeficiente de variación de 3.13 por ciento. Estos valores indican que la semilla es uniforme y en peso no existe diferencia entre ambos genotipos.

Capacidad de Germinación

Cabe mencionar que debido a la nula información que existe sobre germinación de semilla de gloxinia, se realizó un estudio preliminar, donde el sustrato de papel filtro blanco fue el mejor, posteriormente sobre este sustrato se realizó la prueba de germinación, empezando la semilla a germinar a los 30 días con una temperatura de 25°C y 16 hr luz en una cámara germinadora. La

gloxinia es una dicotiledónea presenta una germinación epigea, es decir, los cotiledones y la yema apical son llevados por encima del nivel del suelo por alargamiento del hipocótilo (Figura 4.13).

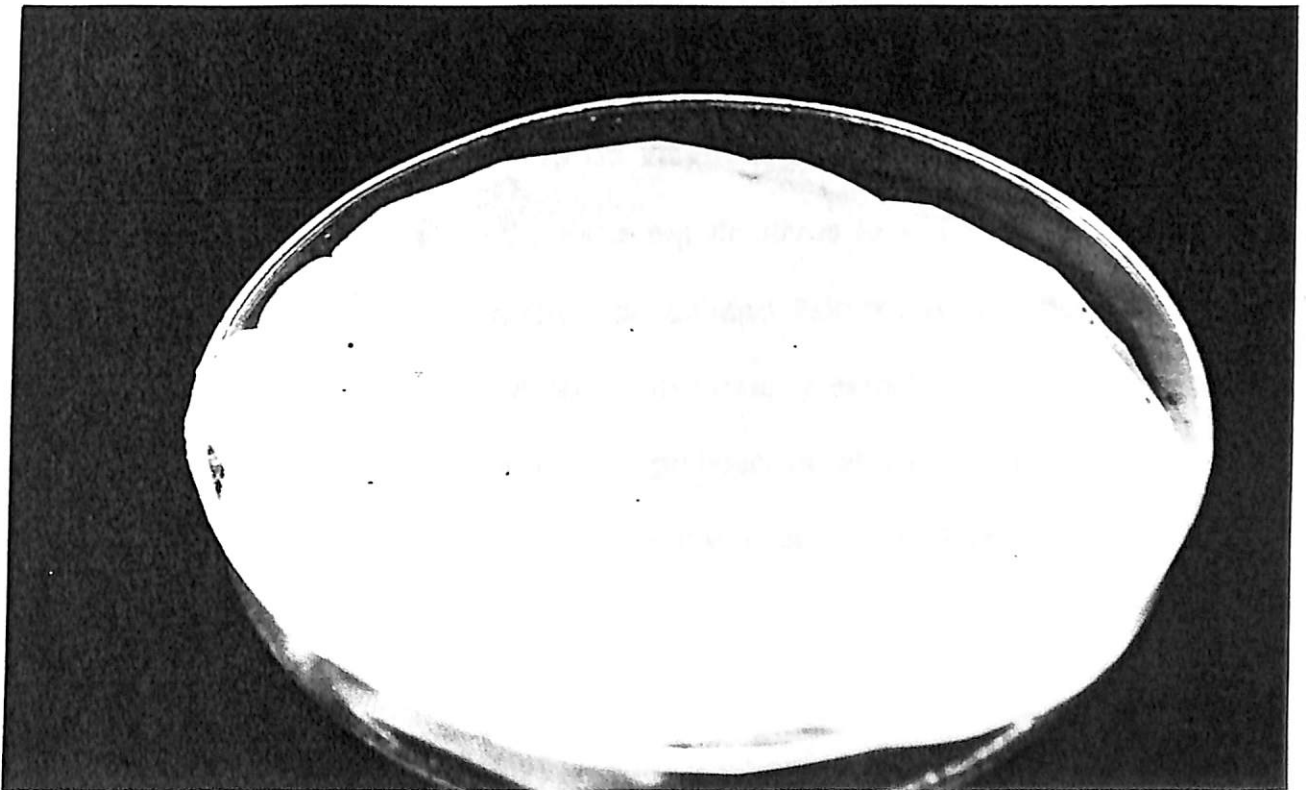


Figura 4.13. Prueba de germinación de la semilla de gloxinia.

Los resultados obtenidos para las variables de calidad fisiológica y el coeficiente de variación se muestran en el Cuadro 4.11.

Cuadro 4.11. Cuadrados medios del análisis de varianza y coeficientes de variación de las variables de calidad fisiológica evaluadas en la semilla de gloxinia. UAAAN.1999.

F.V.	gl	Plántulas [†] Normales	Plántulas [†] Anormales	Semilla [†] Muerta	Semilla [†] Dura
Var	1	0.720 **	5.666 **	0.938 **	1.826 **
Trt	17	0.213 **	1.033 **	2.497 **	2.578 **
Var x Trt	17	0.213 **	0.210 NS	0.462 **	0.236 *
Error	108	0.026	0.147	0.087	0.118
C.V. (%)		20.99	30.36	14.65	16.29

[†] Datos transformados $\sqrt{x+0.5}$

*,** significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza para la calidad de semilla de gloxinia muestran diferencias altamente significativos ($\alpha=0.01$) para Variedad y Tratamientos en todas las variables de calidad fisiológica, así como para la interacción de Var x Trt para plántulas normales y semillas muertas, mientras que en semillas duras se encontró significancia al ($\alpha=0.05$), en plántulas anormales los efectos fueron no significativos, los coeficientes de variación oscilaron entre 30.06 y 14.65 por ciento.

En el Cuadro 4.12 se observan las medias en el número de semillas de tratamientos utilizados para inducir germinación en la semilla de dos variedades de gloxinia. Se encontró que en los tratamientos ocho (GA_3 600 ppm, 2 min) y

el 17 (Biozyme) se obtuvo un porcentaje de plántulas normales de 15 y 11.2 por ciento respectivamente, siendo estos estadísticamente iguales. En el resto de los tratamientos utilizados no se encontró respuesta satisfactoria.

Cuadro 4.12. Medias de tratamientos para plántulas normales (PN) en dos variedades de semilla de gloxinia.

Tratamiento		PN [†]	PA [†]		SM [†]		SD [†]	
1 KNO ₃ 0.2%	1 min	0.00 b	13.7	bcd	32.5	bcd	53.7	bcd
2 “	2 min	0.00 b	18.7	abcd	28.7	cde	52.5	bcde
3 “	3 min	0.00 b	11.2	cde	27.5	cde	61.2	b
4 H ₂ SO ₄ conc.	1 min	0.00 b	0.00	e	88.7	a	11.2	g
5 “	2 min	0.00 b	0.00	e	95.0	a	5.00	g
6 “	3 min	0.00 b	0.00	e	96.2	a	3.70	g
7 GA ₃ 600 ppm	1 min	2.50 b	18.7	abcd	42.5	b	36.20	f
8 GA ₃ 600 ppm	2 min	15.0 a	08.7	de	35.0	bcd	41.20	def
9 GA ₃ 600 ppm	3 min	3.70 b	11.2	cde	36.2	bc	48.70	bcd
10 GA ₃ 800 ppm	1 min	0.00 b	22.5	abc	21.2	e	56.20	bc
11 GA ₃ 800 ppm	2 min	0.00 b	23.7	ab	32.5	bcd	43.70	cde
12 GA ₃ 800 ppm	3 min	0.00 b	28.7	a	27.5	cde	43.70	cde
13 GA ₃ 1000 ppm	1 min	0.00 b	25.0	ab	20.0	e	55.00	bc
14 GA ₃ 1000 ppm	2 min	0.00 b	23.7	ab	25.0	e	51.20	bcde
15 GA ₃ 1000 ppm	3 min	0.00 b	16.2	bcd	37.5	bc	46.20	cdef
16 Temperaturas alternas		0.00 b	0.00	e	8.70	f	91.20	a
17 Biozyme		11.20 a	11.2	cde	37.5	bc	40.00	ef
18 Testigo		0.00 b	1.75	abcd	30.0	cde	52.50	bcde

[†] Valores con la misma letra son estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$). DMS= diferencia mínima significativa.

[†]PN= Plántulas normales, PA= Plántulas anormales, SM= semillas muertas, SD= semillas duras.

Analizando las variedades por separado, se observa claramente como la variedad rosa no mostró resultados en cuanto a plántulas normales, sin embargo para semillas muertas y semillas duras presenta 43.1 y 48.8 por ciento respectivamente. Es decir, la variedad rosa fue la que mostró un mayor grado de latencia. Sin embargo, la variedad roja presentando un valor promedio de 3.61 por ciento en plántulas normales como se observa en la Figura 4.14.

La explicación biológica de estos resultados se debe a que el ácido giberélico actúa en la etapa inicial de la inducción de enzimas al ser transcriptas de los cromosomas, y en otra etapa posterior al activar enzimas que intervienen en la movilización del sistema de alimentos. La aplicación de giberelinas funciona para superar muchos tipos de latencia, incluyendo la fisiológica (Hartmann y Kester, 1995).

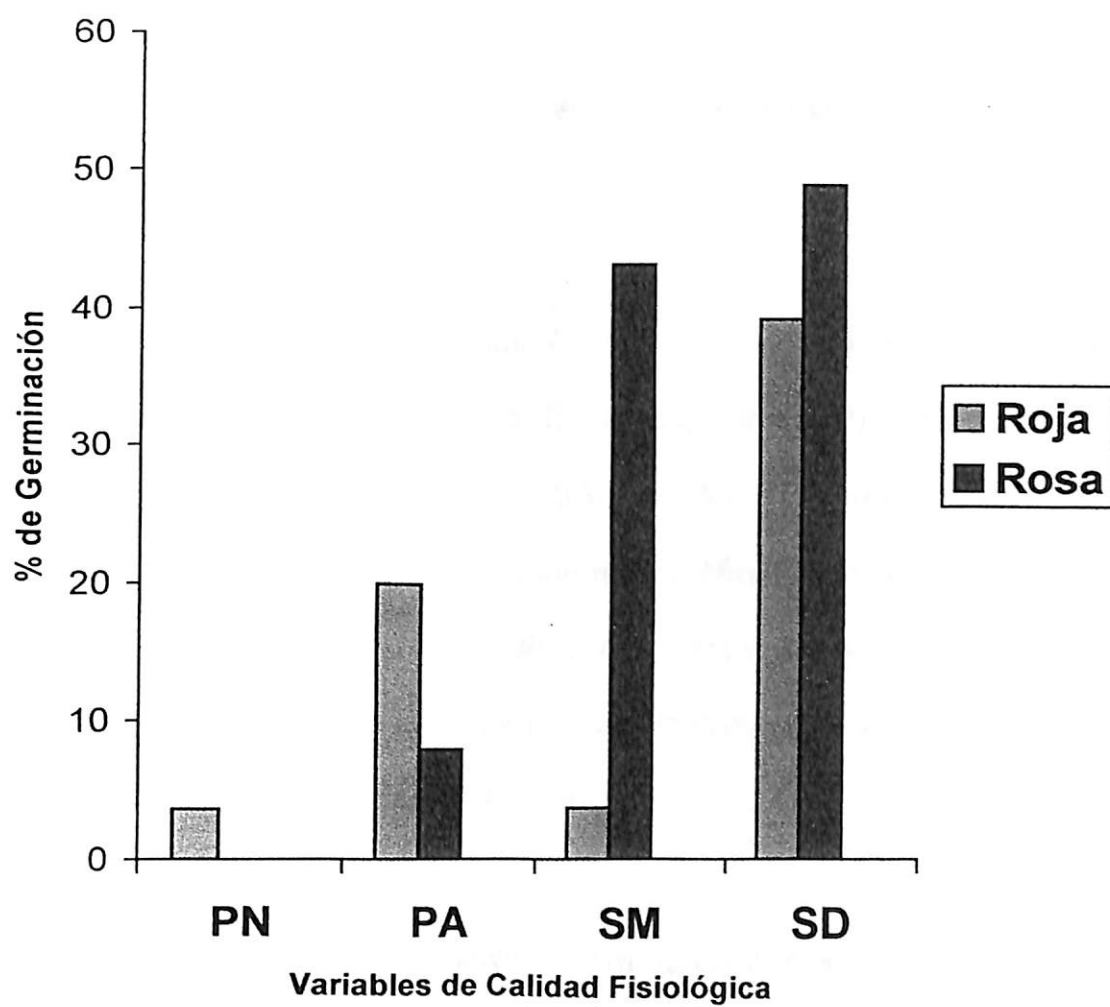


Figura 4.14. Comportamiento de las variables fisiológicas en la variedad roja y rosa.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- ◆ Los genotipos de gloxinia estudiados ("red mix" y "pink mix") respondieron positivamente a la propagación *in vitro*. En la etapa de multiplicación de tallos el tratamiento 10 (0.8 mgL^{-1} AIA + 1.4 mgL^{-1} BAP) produjo el mayor número y longitud de brotes en promedio de las dos variedades. Mientras que en la etapa de enraizamiento, no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos aplicados a cada variedad. En la etapa de aclimatación se logró un 100 por ciento de sobrevivencia de las plantulas de gloxinia.
- ◆ Se observaron diferencias significativas entre genotipos en su respuesta a la propagación *in vitro*. La variedad rosa produjo el mayor número y longitud de tallos y raíces.
- ◆ Se determinó como mejor explante a los segmentos de hojas con nervadura.
- ◆ El análisis fisiológico de semillas, detectó latencia y demostró que el mejor tratamiento para romperla consiste en ácido giberélico GA_3 600 ppm por dos minutos y Biozyme concentrado.

LITERATURA CITADA

The American Gloxinia and Gesneriad Society. AGGS. 1997. What is a gesneriad [online]. Available at <http://aggs.org>. (verified 4 oct.1997) p.1-4.

Association of Official Seed Analysts (AOSA). 1981. Seed vigor testing handbook, Contribution, USA. No.32 the Handbook on Seed Testing.

Bidwell, R.G. 1990. Fisiología vegetal. AGT Editor. México. p. 461-463.

Bilkey, P.C., B.H. McCown and A.C. Hikdebrandt. 1978. Micropropagation of african violets from petiole cross sections. HortScience 13(1):37-38.

Burbano, O.E. 1991. Calidad de semillas. CIAT. Cali, Colombia. p. 13-14.

Burt, B.L. 1967. Gesneriads as a family. Plants Gard. 23: 54-57.

Bustamante, G.L. 1998. Curso de control de calidad. UAAAN. Saltillo, Coah México.

Camacho, M.F. 1994. Dormición de semillas. Ed. Trillas. México. p. 9-20.

Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 1985. Principles of seed science and technology, Burgess Publishing Company. USA.

Delouche, J. 1964. Latencia de semillas. Seed technology Laboratory Mississippi State University. Mississippi. USA.

- Devlin, R.M. 1982. Fisiología vegetal. Ed. Omega. Barcelona. España. p.353-409.
- Duffus, C. 1985. Las semillas y sus usos. Ed. AGT, México. 88 p.
- Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A Thorpe and I.K.Vasil. 1976.Plant tissue culture media. *in vivo* 12:473-478.
- Garay, E.A. 1991. Control de calidad en el campo, beneficio y almacenamiento de semillas. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 2-11.
- García, V.A. y Q.A. Carballo. 1987. Propagación *in vitro* de variedades de violeta africana generadas por hibridación. Germen. Boletín de intercambio técnico y científico de la Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. p. 25-30.
- Gutiérrez, M.M.G. y O.A.V. Morales. 1998. Micropropagación de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook. Memorias del VI Congreso Nacional de Horticultura Ornamental.1998. Toluca de Lerdo, Edo. De México. 65 p.
- Gutiérrez, E.A., L.M. García y D.L. Cervantes. 1998. Establecimiento *in vitro* de *Astroemeria* cv Rosario. Memorias del VI Congreso Nacional de Horticultura Ornamental.1998. Toluca de Lerdo, Edo. De México. 40 p.
- Hartmann, H. y D.E. Kester 1995. Propagación de plantas. Editorial Continental. México. p. 130-165.
- Hussey, G.1977. *In vitro* propagation of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. John Innes Institute, United Kingdom. Acta Hort. 78: 303-309.
- Hurtado, M.D. y M.E Merino. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. México. p. 49-63.

- International Seed Testing Association (ISTA) 1995. International rules for seed testing. Seed and technology. The Netherlands. 13:299-335.
- Johnson, B.B. 1978. *In vitro* propagation of gloxinia from leaf explants. HortScience 13(2):149-150
- Kimmins, R.K. 1988. Gloxineas, violetas africanas y otras gesneriaceas. En: Larson (ed.) Introducción a la floricultura. p. 259-271. AGT Ed. Carolina del Norte.
- Krikorian, A.D. 1991a. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En W.M. Roca y L.A Mroginski (eds.). Cultivo de tejidos en la Agricultura Tropical. Cali. Colombia. p. 64-67.
- Krikorian, A.D. 1991b. Propagacion clonal *in vitro*. En W.M.Roca y L.A Mroginski (eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura Tropical. Cali. Colombia. p. 113-117.
- Kukuczanka, K. and G. Suszynska. 1972. Regenerative properties of *Saintpaulia ionantha* Wendl. leaves cultured *in vitro*. Acta Soc. Bot. Pol. 61:503-509.
- Manzo, G.A., J.L. Rodríguez de la O y J.M. Mejía M. 1998. Organogénesis en Nochebuena (*Euphorbia pulcherrina*). Memorias del VI Congreso Nacional De Horticultura Ornamental.1998. Toluca de lerdo, Edo. De México. 33 p.
- Mead, R. 1988. The desing of experiments. Statistical principles for practical aplications. Cambridge University Press. 620 pp.
- Michigan State University.1997. Gloxinia (*Sinningia speciosa*) VIII. [online].Available at [http:// www.mseu,msu. edu/son/mod/1000151html](http://www.mseu,msu. edu/son/mod/1000151html)
- Miller, C.O.; F. Skoog and F.S. Okumura. 1956. Isolation, structure and synthesis of kynetina, a substance promoting cell division. J. Am. Chem. Soc. 78:1375.

- Moore, H.E., Jr. 1957. "African violets, gloxinias and their relatives". McMillan, New York.
- Mroginski, L.A. y W.M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En:W.M.Roca y L.A. Mroginski (eds.) cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M y Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. p.19-40.
- Morales, V.G. y Camacho, M.F. 1994. Formato y recomendaciones para evaluar germinación. Publicación especial núm. 48. SARH. México. p. 123-138.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis físicos, biológicos de semillas agrícolas. 3a edición. Instituto de Biología. UNAM. México. p.113, 119, 259, 343.
- Muangkaewngam, A. and T. Chato. 1992. *In vitro* micropropagation of gloxinia. Faculty of Natural Resources, Princes of Songkla, Thailand. Khon Kaen Agriculture Journal.20(6), 336-342.
- Murahige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nikolaeva, M.G. 1977. Factors affecting the seed dormancy pattern. In: A.A. Khan (ed.) *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germinación*. Amsterdam: North-Holland Publising Co. p. 51-76
- Paek-Ky and Hank-KR. 1988. Micropropagation of gloxinia from hypocotyl and cotyledon segments of treatment with ethyl methanesulfonate and colchicine on regenerated shoot tips. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science.* 29(2): 126-135.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martines Nighoff Pub. The Netherlands. 67 p.

- Ramírez, Y.M. 1996. Producción *in vitro* de plantulas de *Anthurium andreanum*. Memorias del I Simposium Nacional la Biotecnología en la Horticultura Ornamental. Universidad Autónoma del Estado de México. México. p. 87-91.
- Rojas, G.M. y H. Ramírez. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Ed. Limusa. México. p. 20-32.
- Rojas, G.M. y H. Ramírez. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Fisiología- Tecnología- Experimentación. 2ª ed. Ed. Limusa. p. 20-27.
- Rojas, G.M. y R. Vázquez G. 1995. Manual de herbicidas y fitorreguladores. 3a edición. Editorial Limusa. México. p. 124-125.
- Salisbury F.B. and Ross, C.W. 1978 Plant physiology. Wadsworth. USA. 422p.
- SAS Institute Inc. 1990. SAS/ STAT User's guide. Versión 6, fourth edition, volumen 2. Cary, NC. SAS Institute Inc.
- SAS Institute Inc. 1992. SAS Technical Report p-229. SAS/ STAT Software: Changes and enhancements, Release 6.07. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Serrano, A., H.J.L. Maldonado, Z.R. Diego, y C.D. Orea. 1998. Producción de gloxinia *in vitro*. Memorias del VI Congreso Nacional de Horticultura Ornamental. 1998. Toluca de Lerdo, Edo. de México. 25 p.
- Shalit, P. 1976. *Sinningia pusilla*. Gloxinia. p. 12-26.
- Smith, R.H. and R.E. Norris. 1983. *In vitro* propagation of African violets. Chimeras. HortScience 18(4): 436-437.
- Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.

- Start, N.D. and B.G. Cummings. 1976. *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. HortScience. 11:204-206.
- Thomson, J.R. 1979. An introduction to seed technology. Thompson Leonard.Hill. Great Britain. p. 1-15.
- Vazquez, M.A. and K.C. Short. 1978. Morphogenesis in cultured floral parts of african violet. Jour. Exp. Bot. 29(112): 1265-1270.
- Vences, C.C. 1998. Micropropagación de *Phalaenopsis amabilis* var. White Grull. Memorias del VI Congreso Nacional de Horticultura Ornamental. 1998. Toluca de Lerdo, Edo. De México. 27 p.
- Villalobos, V. M. y T.A. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: W.M. Roca y L:A. Mroginski (eds.) cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali Colombia. p. 127-142.
- Weaver, R.J. 1990. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas. México. p. 113-155.

APENDICE

Cuadro 1.A. Composición del medio Murashige y Skoog[†].

Componentes	mgL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ .PO ₄	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
Fe ₂ EDTA	37.30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Glicina	2.0
Tiamina. HCl	0.1
Piridoxina.HCl	0.5
Acido Nicotínico	0.5
Inositol	100.0
Sacarosa	30,000
Agar	0.8%
PH	5.7

[†] Murashige y Skoog, 1962.

Cuadro A.2. Solución nutritiva usada para riego de plantas transferidas a maceta.

Fuente	Solución stock gL ⁻¹	Solución final ml
Macronutrientes		
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 M	1.0
KNO ₃	1 M	6.0
Ca (NO ₃) ₂ 4 H ₂ O	1 M	4.0
Mg SO ₄ .7H ₂ O	1 M	2.0
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	2.86	20
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81	20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22	20
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08	20
H ₂ MO ₄ H ₂ O	0.02	20
Solución de hierro		
Na-EDTA	0.08	10
FeCl	1.0	10