

MICROPROPAGACION DE LILIS (Lilium spp.) CV. CASA BLANCA

JOSE ANTONIO GONZALEZ FUENTES

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA



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



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Junio de 2003

14409

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

MICROPROPAGACION DE LILIS (*Lilium* spp.)
CV. CASA BLANCA

TESIS POR

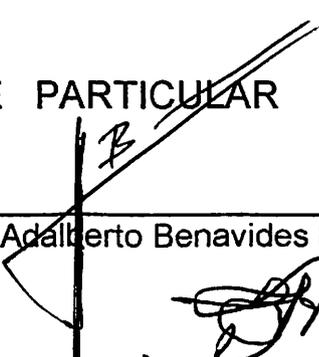
JOSE ANTONIO GONZALEZ FUENTES

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

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**

COMITÉ PARTICULAR

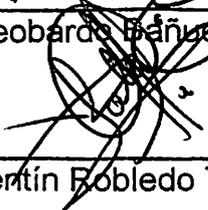
Asesor Principal


Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor


M. C. Leobardo Báñuelos Herrera

Asesor


Dr. Valentín Fobledo Torres


Dr. Jerónimo Landerós Flores
Subdirector de Postgrado

Buнавista, Saltillo, Coahuila, Junio de 2003

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por brindarme otra vez la oportunidad de superarme.

Al Dr. Marco A. Bustamante García por su apoyo durante la investigación.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza por sus sugerencias, conocimientos y apoyo brindado para culminación de este trabajo de investigación.

Al M.C. Leobardo Bañuelos Herrera por sus conocimientos y colaboración durante esta investigación.

Al M.C. Alfonso Rojas Duarte por sus sugerencias y ayuda en la terminación de este trabajo.

A la empresa Bioplants SA de CV y al Ing. Carlos Lascano Cano, que fue quien nos proporcionó el material vegetativo para este trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que de alguna manera me han brindado su amistad y con quienes he tenido una agradable convivencia y que de una forma u otra han contribuido en mi formación como profesionista.

A TODOS USTEDES GRACIAS

DEDICATORIAS

A DIOS:

Por estar presente en todo momento, por darme la oportunidad de vivir y por darme esa gran fuerza para afrontar la vida día con día y salir adelante para alcanzar una mas de mis metas.

A MIS PADRES, HERMANOS, CUÑADOS Y SOBRINOS:

Con gran respeto y cariño por el apoyo incondicional brindado en cada momento de mi vida.

A MI HIJA Y ESPOSA CON CARIÑO:

Especialmente a mi hija que es lo más importante de mi vida y razón de ser, motivándome con sus sonrisa y su chispa de espontaneidad además de compartir desvelos junto a mi todas esas noches en las que realicé este trabajo de investigación haciéndolo más ameno.

A LA FAMILIA URQUIZO RIVERA Y SALINAS ACOSTA:

Por su confianza y apoyo que me han brindado siempre, muchas gracias.

COMPENDIO

Micropropagación de lilis (*Lilium* spp.)
cv. Casa Blanca

POR:

JOSE ANTONIO GONZALEZ FUENTES

MAESTRIA

HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. Junio 2003

Dr. Adalberto Benavides Mendoza – Asesor

Palabras clave: Cultivo de tejidos, fitohormonas.

Con el objetivo de obtener un mayor número de bulbillos por explante *in vitro* en lilis (*Lilium* spp.) cultivar Casa Blanca, de los que actualmente son obtenidos en México, los cuales varían entre 3 y 4 bulbillos por explante; se evaluó el efecto de diferentes fitoreguladores, BA (N^6 -benzyladenine) a 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg.litro⁻¹, 2iP (N^6 -(3-methylbut-2-enyl)adenine) a 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4

y $0.5 \text{ mg.litro}^{-1}$, en combinaciones con ANA (2-(1-naphthyl)acetic acid) a 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y $1.0 \text{ mg.litro}^{-1}$, en un medio MS, usando un arreglo bifactorial, y un diseño completamente al azar, con tres repeticiones y tres explantes por frasco como unidad experimental; bajo condiciones controladas de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una temperatura diurna de 25°C y nocturna de 16°C . Los resultados muestran que el tratamiento con una concentración de BA a $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$, mas ANA a $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$, dio el mejor resultado, obteniendo un promedio de 6 bulbillos por explante; superando así el promedio de bulbillos por explante que actualmente se obtienen en México.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION OF LILIES (*Lilium* spp), CV. CASA BLANCA

BY:

JOSE ANTONIO GONZALEZ FUENTES

MASTER OF SCIENCE

HORTICULTURE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, June 2003

Ph. D. Adalberto Benavides Mendoza. – Adviser –

KEY WORDS: Tissue culture, plant growth regulators.

With the objective to increase the number of bulblets per explant cultured *in vitro* of lilies (*Lilium* spp.) cv. Casa Blanca, which in Mexico the average is 3 to 4 bulblets per explant, we studied the effect of different plant growth regulators, such as BA (N^6 -benzyladenine) at 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg.liter⁻¹, 2iP (*N*-(3-methyl-2-butenyl)-1*H*-purin-6-amine) at 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg.liter⁻¹, in combinations with NAA (1-naphthalenacetic acid) at 0.0, 0.2, 0.4,

0.6, 0.8 y 1.0 mg.litro⁻¹, in a MS medium, in a bifactorial arrangement using a completely random design, with 3 repetitions and 3 explants as a experimental unit; under controlled conditions of 16 hours light, 8 hours darkness and day temperature of 25°C and 16°C at night. The results shown that the treatment with a combination of BA at 0.1 mg.liter⁻¹ and NAA at 0.2 mg.liter⁻¹ gave the best results, getting an average of 6 bulblets per explant, which is superior to the average that is obtained in Mexico.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN -----	1
Objetivos-----	2
Hipótesis-----	2
REVISIÓN DE LITERATURA-----	3
Importancia de la floricultura en México-----	3
Generalidades del cultivo de lilies-----	4
Origen e historia-----	4
Clasificación taxonómica-----	4
Clasificación botánica-----	5
Descripción botánica-----	5
Descripción de híbridos orientales-----	7
Condiciones ambientales para el cultivo de lilies-----	7
REGULADORES DE CRECIMIENTO-----	9
Efectos biológicos-----	9
Auxinas-----	10
Modo de acción-----	11
Promoción de crecimiento-----	11
Morfogénesis-----	12
Estabilidad en el medio de cultivo-----	13
Actividad fisiológica-----	13
Efectos en cultivo de tejidos-----	14

	Pagina
Captación o fijación-----	15
Regulación de actividad auxinica-----	15
Citocininas-----	16
Actividad biológica-----	16
Modo de acción-----	17
Captación o fijación-----	18
Efectos en cultivo de tejidos-----	19
Especificidad de acción-----	21
Efecto de la temperatura-----	21
Interacción auxinas-citocininas-----	22
TRABAJOS SOBRE CULTIVO DE TEJIDOS EN LILIES-----	22
ARTICULO-----	28
LITERATURA CITADA-----	50

INTRODUCCIÓN

En la República Mexicana la horticultura ornamental es la actividad de mayor rentabilidad económica dentro del sector agrícola. Su valor en la producción de cultivos ornamentales por unidad de superficie alcanza, hasta 40 por ciento más, en comparación con otros grupos de cultivos. Contrastando con lo anterior, la superficie destinada a esa actividad es muy pequeña. Para el año agrícola 2001 la superficie ocupada con cultivos ornamentales a campo abierto y bajo cubierta, representa únicamente el 0.09 por ciento respecto al total cultivado a nivel nacional y dentro de este porcentaje se encuentran ocupando gran lugar los cultivos que se manejan como flor de corte.

Los lilis híbridos del tipo oriental son una especie de gran importancia en México y en el mundo, debido a su alto valor comercial, colocándose para el año 2001 en el 4º lugar, por orden de importancia, en el mercado mundial dentro de las flores de corte más vendidas, y en segundo lugar, dentro de los mismos híbridos orientales está el cultivar Casa Blanca. En México todos los bulbos que se cultivan de lilis (*Lilium* spp.) son importados principalmente de países como Holanda y USA, ocasionando con esto que los costos de producción sean muy elevados. Una posible solución a este problema es la obtención del material vegetativo aquí en México, con costos que permitan

ofertar el bulbo de *Lilium* a los productores nacionales, a precios más bajos de lo que normalmente se obtienen.

En México, la empresa Bioplants S.A. de C.V. trabajó con un protocolo de micropropagación para esta especie, a partir de bulbos comerciales importados de Holanda, teniendo como problema principal la poca o baja obtención de bulbillos (4) por unidad o explante (penca o escama), siendo económicamente muy pocos, debido a que un bulbo proveniente de Holanda tiene un costo de 0.6 a 0.9 dólares USA, dependiendo del tamaño 12-14 a 16-18 cm de periferia respectivamente, siendo estos los que producen un tallo comercial de buena calidad; sin embargo con el protocolo utilizado en México, los costos de producción desde micropropagación hasta la obtención de un bulbo de tamaño comercial, es de 0.7 dólares USA, que aunque es de la misma calidad, no representa ninguna ganancia, por lo anteriormente mencionado, aunado a esto se le suma el tiempo que tarda en obtenerse dicho bulbo, que es de 2 años promedio. Por lo anterior se planteó lo siguiente:

Objetivo:

Incrementar el número de bulbillos por explante y superar el número de 4 que actualmente se producen en México usando 2 citocininas *N*⁶-bencil adenina (BA) y (*N*-(3-methyl-2-butenyl)-1*H*-purin-6-amine (2iP) a diferentes concentraciones y combinadas con varios niveles de la auxina ácido naftalenacetico (ANA)

Hipótesis:

El número de bulbillos por explante dependerá de la combinación y concentración de auxinas y citocininas en el medio nutritivo.

REVISIÓN DE LITERATURA

1 Importancia de la floricultura en México

La horticultura ornamental es una actividad que ha crecido últimamente de forma considerable en México ya que se ha ampliado la red de países que importan flores vivas de México, generando grandes expectativas e ingresos; alrededor del 90 por ciento de la producción nacional se destina a los mercados nacionales y el resto es enviado a los mercados internacionales, obteniéndose con las exportaciones en promedio 30 millones de dólares por año. El sector florícola mexicano se ha desarrollado mucho en los últimos años y está tomando gran importancia para la economía del país, siendo uno de los cultivos con mayor auge dentro de los cultivos no tradicionales.

Dentro de la horticultura ornamental, uno de los principales cultivos de flor de corte para exportación es el de liliis (*Lilium* spp.) ya que salen cada año al mercado nuevos cultivares con colores variados; su particular belleza y encanto de sus formas, aumenta la posibilidad de utilización de los mismos como flores de ornato y dentro de ellos los híbridos orientales son los que mayor valor alcanzan en el mercado nacional siendo particularmente la variedad Casa Blanca una de las que mas demanda tienen, alcanzando hasta

1.5 dólares USA por tallo (Florvertical 2002), pagando el mercado de USA hasta tres veces mas por los híbridos orientales que por los asiáticos.

1^o Generalidades del cultivo de lilies

1^o Origen e historia.

El IFBC (International Flower Bulb Center, 1995), menciona que esta planta bulbosa creció originalmente en las montañas del Himalaya, desde ahí se ha distribuido a países como Japón, Taiwán y USA.

Las pinturas en paredes y figuras de cerámica nos dicen que los lilis han sido populares por lo menos 35 siglos (Bird, 1991).

El *Lilium* es el género más rico de todo el grupo de las liliáceas comprende alrededor de 80 especies que crecen en forma silvestre principalmente en los países de Europa y cerca de 20 en Norte América.

2^o Clasificación Taxonómica:

Reino-----Plantae

División-----Magnoliophyta

Clase-----Liliopsida

Orden-----Liliales

Familia-----Liliácea

Genero-----*Lilium*

Especie-----spp

2^o Clasificación Botánica

La real Sociedad Hortícola de Gran Bretaña propone la siguiente clasificación para el genero *Lilium* que contempla 9 divisiones.

División I. Híbridos Asiáticos de floración temprana, 60cm – 1.5m de longitud del tallo y 10cm – 15cm de diámetro de flor

División II. Híbridos tipo martagón de floración media, 92cm – 180cm de longitud de tallo 7cm – 10cm de diámetro de flor.

División III. Híbridos derivados de *L. Candidum* y de *L. Chalcedonium*.

División IV. Híbridos de especies americanas

División V. Híbridos derivados de *L. Longiflorum* y de *L. Farnosanum*.

División VI. Híbridos trompeta y Aurelian derivados de especies Asiáticas

División VII. Híbridos orientales

División VIII. Todos los híbridos no proporcionados en los grupos anteriores.

División IX. Todas las especies verdaderas y sus formas.

2^o Descripción Botánica.

2^o **Flor:** Esta tiene 6 pétalos, tres de ellos se conocen técnicamente como sépalos. En algunas especies el sépalo es mas estrecho que el pétalo, también cuenta con perianto y segmento de perianto. Existe una gran gama de colores como rayados, combinados, manchados y de un solo color con varios matices dentro del mismo como varios tipos de rojo, anaranjado, naranja vivo, amarillo, amarillo limón oro, rosa, cremoso, blanco y blanco puro. (Bird, 1991)

2° **Fruto:** Es una cápsula que contiene dentro las semillas, una encima de otra en tres secciones.

3° **Hojas:** Las hojas son verdes sin pubescencia, largas y lanceoladas frecuentemente con un aspecto fresco y brillante, y están dispersas en intervalos regulares en espiral en el tallo, con algunas excepciones estas son sésiles (sin pecíolo) (Bird, 1991).

3° **Tallo:** Este sale de un punto sobre la placa basal dentro del bulbo.

3° **Bulbo:** Esta compuesto de raíces, una placa basal (tallo modificado comprimido), escamas y un meristemo apical. (Larson 1996)

3° **Raíz:** Las raíces emergen debajo de la placa basal principalmente alrededor de su perímetro, hay dos tipos de raíces alimenticias y contráctiles. El híbrido Casa Blanca si se le cubre el tallo de tierra forma raíces adventicias que sirven como sostén a la planta (Bird, 1991)

3° **Las escamas:** son hojas modificadas completamente visibles que funcionan como órganos de reserva. Todas las escamas están pegadas a la placa basal, rodean al meristemo apical hasta que el brote se empieza a alargar (Larson 1996).

2° Descripción de los híbridos orientales.

El cultivar Casa Blanca entra en la división VII que corresponde a los híbridos orientales, las flores de estos Liliium se caracterizan por ser mucho mas alargadas que las Asiáticas y están ligeramente perfumadas con una fragancia que va desde las mas dulces hasta las mas picantes. Este Liliium en el mercado es mas caro ya que el costo de producción es mas elevado.

2° Condiciones ambientales para el cultivo

↳ **Temperatura:** Para obtener un producto de calidad se necesita conseguir una buena formación de raíces y esto se logra manteniendo una temperatura baja de 12 a 13° C al comienzo del cultivo y durante el primer tercio de la duración del mismo o hasta que se hayan formado las raíces, ya que a temperaturas mas bajas retardaran innecesariamente el cultivo y temperaturas mas altas de 15° C en este periodo evitaran el buen desarrollo de raíces y en consecuencia darán una flor de menor calidad (IFBC, 1995). Para los híbridos orientales, después del periodo de formación de raíces, la temperatura optima del invernadero debe de ser constante durante las 24 horas del día, entre 15 a 22° C . La temperatura deberá ser superior durante el día y bajo influencia solar podrá aumentar de 20 a 22° C y eventualmente por periodos cortos, hasta los 25° C. Las temperaturas por debajo de los 15° C pueden causar la caída de las hojas o tornarlas amarillas.

☞ **Suelo:** El suelo mas conveniente es el arcillo-arenoso rico en humus y bien drenado. El IFBC (1995) menciona que en prácticamente todos los tipos de suelo se pueden cultivar lilies, lo que se debe garantizar es una buena estructura y una excelente permeabilidad del mismo durante todo el periodo del cultivo. Los suelos pesados son los menos indicados para este cultivo, y se recomienda mantener un pH de 5.5 a 6.5 para los híbridos orientales, y una capa de suelo bien drenado de mínimo 40 cm.

☞ **Luz:** Durante el forzamiento es deseable una máxima cantidad de luz del sol para obtener un producto de alta calidad. Los días cortos producirán plantas mas cortas. Se observan pocas diferencias en la velocidad de desdoblamiento de hojas así como en la velocidad de desarrollo del botón floral a diferentes intensidades lumínicas reducidas y temperaturas de descarga de alta energía. (Larson, 1996)

☞ **Humedad:** El porcentaje de H.R. es de 80 a 85 porciento, y se recomienda evitar grandes oscilaciones para impedir cualquier tipo de estrés. Se debe de regar después de la plantación con abundancia distribuyendo el agua en forma fragmentada. En periodos secos el consumo de agua alcanza de 8 a 9 litros por m² por día, siempre mantener humedad. (IFBC, 1995)

☞ **Fertilización:** El (IFBC, 1995,) sugiere que 3 semanas después de haber plantado, se deberá administrar N, a razón de 1Kg de nitrato de calcio por 100 m², siendo la dosificación manual del abono químico, esparcido al

suelo o por riego a presión. Niveles aceptables para los elementos nutritivos en el suelo del invernadero durante el cultivo de híbridos orientales, expresados en mmhos/cm son: K 1.3, Ca 1.8, Mg 1.0, N ($\text{NO}_3^{75\%}$ y $\text{NH}_4^{25\%}$) 3.0, SO_4 1.5, P 0.15 y una CE de 0.9. Widmer (1977, citado por Larson, 1996) ha producido constantemente plantas de buena calidad con aplicaciones de una mezcla neutral de nutrientes, de una parte de sulfato de amonio y 4 partes de nitrato de calcio, hecho en 347 gr/100 litros de agua, cada 2 semanas a partir de una a 2 semanas después de la aparición de brotes.

1º REGULADORES DE CRECIMIENTO

1º Efectos biológicos de los reguladores de crecimiento.

El efecto de los reguladores de crecimiento generalmente no es absoluto ni específico. La respuesta de las células, tejidos y órganos *in vitro* puede variar de acuerdo a las condiciones de cultivo, tipo de explante y el genotipo de la planta. Frecuentemente una combinación de 2 o más compuestos por separado son requeridos, aplicados simultáneamente o secuencialmente y generalmente después de cierto periodo de tiempo se da el efecto en el tratamiento.

El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción y el balance entre los reguladores de crecimiento aplicados en el medio y los producidos endógenamente. Además de ejercer un efecto directo sobre los mecanismos celulares, muchos reguladores sintéticos pueden de hecho

modificar el nivel de reguladores endógenos. El efecto producido *in vitro* por un regulador de crecimiento es también dependiente de el medio en el cual un órgano o tejido esta siendo cultivado. (Edwin F. G.,1996)

2.1 AUXINAS.

Las auxinas son ampliamente usadas en el trabajo de micropropagación, siendo incorporadas al medio nutritivo con el fin de promover crecimiento de callo, suspensión de células u órganos y regular morfogénesis especialmente en unión con citocininas. La elección de la auxina así como su concentración depende de el tipo de crecimiento o desarrollo requerido, el nivel endógeno natural de auxina en el explante excisado, la capacidad del tejido cultivado para sintetizar naturalmente auxina y la interacción entre la auxina sintética aplicada y la endógena natural.

Los compuestos son llamados auxinas si son capaces de controlar varios procesos tales como crecimiento, elongación y división celular, así como estar involucrados en participar e inducir al meristemo a seguir como tejido desorganizado (dominancia apical) o a definirse como órganos. La auxina natural mas frecuentemente reportada es el AIA (ácido 3-indolacetico) que es formada de el aminoácido triptófano. Cuando un medio nutritivo contiene este aminoácido los niveles endógenos naturales de auxina de los tejidos cultivados aumenta rápidamente (Edwin F. G.,1996).

3 **Modo de acción de auxinas**

4 **Promoción de crecimiento**

Las auxinas son consideradas para promover el crecimiento de tejidos vegetales en dos formas.

- 1- Induciendo secreción de iones hidrógeno dentro y a través de toda la pared celular. Ligamentos de auxina llevan a una descomposición de lípidos y acidificación de la pared, aumentando su extensibilidad. Los iones de potasio son tomados dentro de la célula para neutralizar la exportación electrogenica de iones hidrógeno (protones) que tienen el efecto de disminuir el potencial hídrico de la célula y así el agua entra y la célula se expande (Böttger 1986, citado por Edwin F. G.,1996).
- 2- Por un efecto en el metabolismo del RNA (aumentando síntesis de proteína) posiblemente induciendo la transcripción de moléculas específicas mensajeras de RNA (mRNA) (Beaven y Northcote 1981, citado por Edwin F. G.,1996), los mRNA son considerados para codificar proteínas las cuales son requeridas para mantener crecimiento.

La exportación de protones de las células, causa una acidificación acelerada del medio externo cuando los explantes son tratados con auxinas (Edwin F. G.,1996). El intercambio iónico puede ocurrir porque la auxina estimula indirectamente la enzima ATP-asa localizada en la membrana celular la cual es responsable de el transporte de H^+ y OH^+ dentro y fuera de las células; o porque las sustancias de crecimiento aumentan la permeabilidad de la membrana celular a protones y otros iones (Edwin F. G.,1996).

4 Morfogénesis

Las auxinas aplicadas endógenamente parecen ser capaces de borrar la fisiología programada genéticamente de todos los tejidos de la planta, los cuales han determinado previamente su estado diferenciado. Las células las cuales responden a las auxinas se revierten a un estado desdiferenciado y empiezan a dividirse. El cómo las auxinas logran esta reprogramación no está del todo entendido.

Edwin F. G., (1996), encontró que las auxinas causan ADN mas metilado de lo usual y sugiere que esto puede ser necesario para la reprogramación de células desdiferenciadas. Programas precisos de tejido específicamente asociados con diferenciación llegarían a ser erradicados por hipermetilacion, con quizás una pequeña fracción de las células alcanzando un ultimo estado de desdiferenciacion en el cual ellas llegan a ser capaces de morfogénesis o embriogenesis (Edwin F. G.,1996).

Las auxinas sintéticas mas comúnmente usadas en cultivo de tejidos son: 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacetico), AIB (ácido indol butírico) y ANA (ácido naftalenacetico). Junto con citocininas el 2,4-D es usado principalmente para inducción de callo y cultivo de células en suspensión, siendo remplazado por ANA y AIB cuando morfogénesis es requerida. ANA y AIB son las auxinas favorecidas para cultivo de tejidos.

Estabilidad en el medio de cultivo

AIA y AIB son afectados por las altas temperaturas y se descomponen durante el proceso de esterilización del medio nutritivo en autoclave, pero AIA no es estable en el medio de cultivo aun si es pasado por filtro de esterilización, así como que es altamente susceptible a descomposición por efectos de la luz y es acelerado por la presencia de sales del medio MS (Edwin F. G.,1996). AIB es mas estable en solución que AIA, quedando un 75 por ciento después de 30 días en oscuridad y 40 por ciento después de 30 días en luz. Otras auxinas tales como ANA y 2,4-D no son desnaturalizadas en el medio (Edwin F. G.,1996), pero una vez absorbidos dentro del tejido vegetal, la proporción de deterioro de todas las auxinas puede ser igualmente rápido, ya que no solo están expuestas a factores físicos sino que también están sujetas a degradación enzimática.

Actividad fisiológica.

Las auxinas difieren en su actividad fisiológica y la magnitud a la cual se mueven dentro de tejidos, son limitados dentro de las células o metabolizados. En el medio para trabajo de micropropagación, concentraciones efectivas de cada regulador de crecimiento variaran y necesitaran ser ajustadas de acuerdo el genotipo de la planta a ser cultivada, el tipo de tejido u órgano, la naturaleza del método de micropropagación y el estado del cultivo.. aunque las auxinas artificiales han estado disponibles por muchos años, no esta claro todavía que magnitud de su actividad fisiológica es debida a su imitación directa de la

acción del AIA natural, o a una acción indirecta modificando su nivel efectivo dentro de tejidos.

Efectos en cultivo de tejidos

1- Inducción de crecimiento de callo. La auxina mas frecuentemente usada para este propósito es 2,4-D de 1 a 3 mg/lit, aunque algunos investigadores prefieren usar ANA. Para inducir crecimiento de callo en dicotiledóneas, una citocinina es casi siempre agregada al medio en adición con auxina, aunque la citocinina puede no ser necesaria en para inducir crecimiento de callo en monocotiledóneas, y solo se logra usando auxinas a concentraciones ligeramente mas elevadas por ejemplo 2,4-D de 2 a 10 mg/lit. Las auxinas promueven dispersión celular en cultivos de suspensión, mientras que las citocininas causan agregación celular. Los altos niveles relativamente altos de auxina agregados al medio para este propósito evitaran morfogénesis, pero pueden inducir embriogenesis si las células todavía son competentes .

2- Formación de clorofila. Mientras que las citocininas promueven la formación de clorofila en callos y cultivos en suspensión, las auxinas pueden ser inhibitorias. Como lo reportado por (Edwin F. G.,1996) quien observó una reducción de formación de clorofila con presencia de 2,4-D en cultivo de callo de tomate, papa y chícharo. Lo que ocurre es que al incrementar la concentración de auxina se conduce a una reducción progresiva de desarrollo de cloroplastos en algunos tejidos vegetales como en la achicoria (Edwin F. G.,1996)

3- Morfogénesis. Formación de brotes y raíces, la inducción de caulogenesis o rizogénesis en cultivo de tejidos usualmente requiere de un ajuste de los niveles de auxinas y citocininas que son necesarias para iniciación de callo y crecimiento.

4- Embriogenesis. El proceso de embriogenesis somática es algunas veces iniciado en el medio conteniendo altos niveles de auxina, pero los embriones no se desarrollan hasta que los niveles de auxina son reducidos, así como la división de células pro-embriogénicas a bajas concentraciones. También se le atribuye la formación de embriones regulados por el pH como en zanahoria, ya que las auxinas tienen capacidad de reducir el pH intracelular. (Edwin 1996.)

Captación o fijación de auxinas

AIA, y otras auxinas sintéticas tales como ANA y 2,4-D son rápidamente absorbidas del medio hacia adentro de los tejidos cultivados, siempre y cuando el pH oscile entre 5 y 6. Los compuestos son subsecuentemente absorbidos dentro de las células como moléculas completas, pero la disociación después causa que sean retenidas dentro de las células, porque el plasmalema es impermeable a los aniones de auxinas (Edwin F. G., 1996).

Regulación de la actividad auxinica

La diferenciación, división y morfogénesis potencial de células vegetales puede no solo depender de las auxinas adicionadas al medio de crecimiento, sino que también a las auxinas (AIA) dentro del tejido cultivado, y la interacción

de entre las dos. Los factores que afectan los niveles naturales de auxinas y su actividad, pueden por lo tanto ser importantes en el control del crecimiento y morfogénesis en cultivos de tejidos vegetales usados en micropropagación. La acción de las auxinas es dependiente de la libre disponibilidad de boro. En plantas deficientes de boro, la traslocación de AIA y la síntesis nuclear de ARN en respuesta al tratamiento de auxina se encontró que es inhibido (Edwin F. G., 1996).

2º CITOCININAS

3º Actividad Biológica.

Las citocininas comprenden una clase separada de reguladores de crecimiento. Producen efectos menores cuando se aplican a plantas intactas, pero se ha notado que estimulan síntesis de proteínas. Es tal vez por esta razón que pueden promover la maduración de cloroplastos y retardan la senescencia de hojas separadas. La aplicación de citocininas a una sola parte del vegetal por ejemplo a una sola hoja, causa que esta llegue a ser un auténtico resumidero de aminoácidos, el cual después emigran a un órgano de lugares circundantes. El efecto de las citocininas es más notable en cultivo de tejidos donde ellas son usadas, algunas veces junto con auxinas para estimular división celular y control de morfogénesis. Agregadas al medio de cultivo, estos compuestos superan o dominan la dominancia apical y liberan los brotes laterales de la dormancia. En este caso las citocininas parecen tener un

efecto contrario a las auxinas endógenas. Aunque la kinetina no es considerada actualmente como una citocinina natural, al menos 25 citocininas naturales han sido estructuralmente relacionadas con la kinetina han sido identificadas como compuestos libres o como glucosidos o como ribosas (Edwin 1996). Dos de estos compuestos usados en cultivo de tejidos son la Zeatina y la 2iP (2-isopentil adenina).

Las citocininas son necesarias en el cultivo de tejidos, ya que a pesar de que todos los vegetales las producen endógenamente, muchos tejidos aislados para su cultivo *in vitro* son incapaces de sintetizar suficiente de estas sustancias para mantener un crecimiento normal.

Aunque las citocininas naturales 2iP y zeatina son usadas en investigación, no son empleadas por laboratorios comerciales rutinariamente, debido a su alto costo. Afortunadamente varios análogos químicos de citocininas naturales aparte de la kinetina han sido preparadas las cuales han demostrado ser altamente efectivas como citocininas. Una de las citocininas sintéticas más comúnmente usadas en cultivo de tejidos es la BA (Bencil adenina) o BAP (bencil aminopurina).

3º **Modo de acción**

El modo de acción de las citocininas es incierto, algunas han sido encontradas en moléculas de RNA de transferencia. En algunas circunstancias las citocininas han sido mostradas como activadoras de la síntesis de RNA y

estimuladoras de la síntesis de proteínas y actividad enzimática (Edwin F. G.,1996).

La acción de citocininas es dependiente de la luz. En azul, rojo lejano y luz blanca la proliferación de brotes por citocininas es fuertemente afectada por la proporción de fluidez de fotones, pero la proporción de fluidez de una fuente de luz roja no es crítica. (Edwin F. G.,1996), sugirió que la proliferación de brotes por citocininas fue promovido por una respuesta del fitocromo a una baja energía. En condiciones donde no hubo proliferación de brotes (oscuridad o poca afluencia de rojo lejano) la citocininas inhiben la elongación de brotes. La promoción de crecimiento de brotes axilares por citocininas, y su inhibición en elongación parecen ser dos procesos independientes.

Captación o fijación de citocininas

La captación de las citocininas en cultivo de tejidos es rápida (Edwin F. G.,1996). Una enzima natural (citocinina oxidasa) degrada las citocininas tales como, zeatina e isopentil adenina, las cuales tienen una doble ligadura por unión al lado de la cadena y la zeatina al oxidarse queda solo adenina; esto no inactiva la dihidrozeatina, pero la rápida degradación de zeatina y 2iP por la enzima puede explicar la no efectividad de estos compuestos en algunas plantas como por ejemplo la gerbera.

En varios tipos diferentes de tejidos vegetales, la actividad de la citocinina oxidasa es aumentada por la aplicación exógena de citocininas,

haciendo pensar que plantas tratadas con citocininas sintéticas, pueden disminuir el nivel endógeno natural de los compuestos. En algunos experimentos se ha reportado que al tratar tejidos vegetales con compuestos sintéticos homólogos causan temporalmente un incremento en los niveles naturales de zeatina y zeatin ribosida (Edwin F. G.,1996)

3º **Efectos en cultivo de tejidos**

1- Estimulan división celular. En cultivo de tejidos la citocininas parecen ser necesarias para división celular. En su ausencia, la metafase, pero no la profase o mitosis, es considerablemente retardada, y con esto se ha sugerido que las citocininas pueden ser requeridas para regular la síntesis de proteínas involucradas en la formación y función del aparato huso mitótico. En cultivos donde las citocininas están limitando división de núcleos celulares llegan a ser detenidas en un estado del ciclo celular. El subcultivo de tejidos a un medio nuevo conteniendo una citocinina puede causar a las células dividirse sincrónicamente después de un cierto periodo de tiempo (Edwin F. G.,1996). En tejidos de callos donde la división celular sigue adelante sin la adición de citocininas al medio de cultivo, es porque estos son capaces de producir sus propias reguladores de crecimiento naturales. Por ejemplo de una cadena citocinina-independiente de callo de tabaco, se pueden aislar tres citocininas naturales (Edwin F. G.,1996).

2- Formación de brotes adventicios. Las citocininas son muy eficaces para promover directa o indirectamente iniciación de brotes, usadas para este

propósito en unión con auxinas. Un balance entre auxinas y citocininas normalmente da la mas efectiva organogenesis.

3- Embriogenesis. Una baja concentración de citocininas (0.5 a 2.5 μM) es comúnmente agregado al medio para inducción de callos embriogénicos, especialmente en plantas de hoja ancha. Hay evidencia que sugiere que las citocininas pueden inhibir embriogenesis en monocotiledóneas. La presencia de citocininas endógenas pueden ser también responsables de la inhabilidad de obtener embriogenesis en algunos genotipos. Pero también con la adición de citocininas a cultivos donde se tienen tejidos de cadena no sensible a embriogenesis, se ha visto que si son capaces de inducir embriogenesis. (Edwin F. G.,1996).

4- En cultivo de brotes. **a-** Proliferación axilar de brotes. Una o mas citocininas son adicionadas al medio en etapa II para aumentar el incremento de brotes axilares y reducir dominancia apical.

b- Formación de brotes en brotación adventicia. La formación de brotes adventicios directamente de tejidos o indirectamente de callo, es regulada por una interacción de entre auxinas y citocininas.

c- Inhibición de formación de raíces. Altas concentraciones de citocininas (0.5 a 10 mg/lit) generalmente inhiben o retardan la formación de raíces y detienen su crecimiento (Edwin F. G.,1996), por esta razón las citocininas son omitidas en la etapa III cuando los brotes son enraizados y preparados para plántulas.

Algunas veces más de un subcultivo en medio sin citocininas es requerido hasta que el nivel de estas dentro del tejido ha sido lo suficientemente reducido.

3. Especificidad de acción de las citocininas

El efecto de las citocininas en cultivo de tejidos u órganos puede variar de acuerdo al compuesto en particular usado, el tipo de cultivo, la variedad de la planta de la cual ha sido extraído el explante y si es madura o joven. Un requerimiento para una citocinina en particular es muchas veces notado para la inducción de embriogenesis, y para la promoción de formación directa e indirecta de brotes adventicios, por ejemplo cultivos de *Browallia viscosa* requieren de 2iP para iniciación de brotes adventicios, donde BAP, Zeatina y Kinetina fueron inefectivas (Edwin F. G., 1996).

3. El efecto de la temperatura.

Manteniendo cultivos *in vitro* en altas temperaturas anormales la eficacia de las citocininas se reduce, pero se puede aumentar el efecto de las auxinas. Las citocininas promueven directamente formación de brotes o inhiben directamente formación de raíces, en begonias cuando cortes de hoja se mantuvieron a 27° C después del tratamiento, en lugar de a 15° C. La proliferación de brote fue mejor que al baja temperatura. (Fonnesbech *et al.*, 1977, citado por Edwin F. G., 1996)

INTERACCION AUXINAS-CITOCININAS

AUXINA	Efecto Auxina + Citocinina	CITOCININA
+++++	Formación de raíces en explantes	-----
++++	Iniciación de callo en monocotiledóneas	----
+++	Primera etapa de embriogenesis	---
=	Formación de raíces adventicias en callo	=
---	Iniciación de callo en dicotiledóneas	+++
----	Formación de brotes adventicios	++++
-----	Proliferación de brotes axilares en brotes	+++++

TRABAJOS SOBRE EL CULTIVO DE TEJIDOS EN LILIES

(Caputo *et al.*, 1990) micropropagando escamas de lilies cv Casa Blanca, usando los reguladores de crecimiento, ANA y BA, reportan que repetidos sub cultivos (4 generaciones) de los primeros bulbos obtenidos, siguen produciendo bulbillos, morfológicamente estables, con un número de cromosomas ($2n = 24$)

(Lee *et al.*, 1994) investigaron la formación de bulbillos de un *Lilium* híbrido cultivados en medio MS a una temperatura de 23° C (no menciona foto periodo ni concentración de reguladores de crecimiento). Se usaron escamas

de bulbos y cuando estas se cortaron en 4 segmentos transversalmente se obtuvieron un total de 15.6 bulbillos (4.9 por explante), y obteniéndose bulbos mas grandes y mas pesados de los explantes de la parte basal. Y cuando se hicieron 5 cortes longitudinalmente se obtuvieron 32.2 bulbillos (6.44 por explante), se obtuvieron bulbos mas grandes y mas pesados de los cortes de la parte media que de los de afuera. En escamas no divididas se obtuvieron solo 2 bulbillos.

(Mizuguchi *et al.*, 1994) indujeron callos blancos, en medio MS, en continua luz (300 lx) por 8 semanas y a 25° C, usando reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones, y el mejor resultado se obtuvo con la combinación de 0.01 ppm, de ANA y 1.0 ppm BA. Posteriormente el callo obtenido se coloco en otro medio MS con reguladores a bajas concentraciones para la obtención de bulbillos, pero no se mencionan las cantidades.

(Joung *et al.*, 1995) investigaron los efectos de BA, NAA, tratamiento de frío por 0, 2, 4, 6 o 8 semanas y ambiente controlado (luz a 24°C y oscuridad a 5 y 24°C) para la formación de bulbillos en *Lilium cv. Casa Blanca* y *L. leichtlinii var. tigrinum*. Un medio base MS fue el mas efectivo para formación de bulbillos en Casa Blanca. El medio MS fue suplementado con BA a 0.5 mg/litro que fue la concentración mas efectiva para ambas especies. En Casa Blanca el diámetro de bulbillos fue incrementado con 8 semanas en tratamiento en frío y 4 semanas para la otra variedad. El crecimiento de los bulbillos fue mejor en la luz a 24° C que en la oscuridad a 24° C ó 5° C.

(Joung *et al.*, 1995) estudiaron los efectos de un medio MS, un medio Hiponex, BA, ANA y tipos de explante en la formación de bulbillos en *Lilium cv. Casa Blanca*. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio MS, suplementado con BA a 0.5 mg/litro y NAA a 0.5 mg/litro, y la formación de bulbillos fue influenciada por el tipo de explante. Los explantes de la porción media de las escamas produjeron mas bulbillos que las dístales y basáles. En el uso del meristemo para la producción de bulbillos el mejor explante fue el de la parte media sin el domo apical, mientras que partes basáles de explantes de hoja no produjeron bulbillos, pero diferenciaron brotes adventicios. El contenido de clorofila de hojas de plántulas cultivadas en medio MS fue mas alto que la clorofila de aquellas cultivadas en medio Hyponex.

Niimi (1995) menciona que existe una relación entre los bulbillos de *Lilium Japonicum Thumb* obtenidos por micro propagación y su comportamiento en campo. En cuanto a la producción de bulbillos mencionan que la mejor concentración de reguladores en un medio MS fue con 0.1 mg/lit de ANA y 0.01 mg/lit de BA, (no menciona numero de bulbillos producidos por explante). En cuanto a la latencia de los bulbillos producidos in Vitro, se requiere un tratamiento en frío por mas de 12 semanas para romperla. En cuanto al establecimiento en suelo, los bulbillos producidos en luz son mas resistentes a infecciones por microorganismos del suelo que aquellos producidos en oscuridad. Todos los bulbillos con mas de 400 mg de peso,

produjeron tallos elongados (plantas de tipo epigeo), estas plantas toman cuando menos dos años en cultivación para florecer.

Krause (1996) menciona los resultados obtenidos de 1992 a 1994 en la micropropagación de híbridos orientales (Casa Blanca y Star Gazer), usando auxinas y citocininas como IBA y BA, partiendo de escamas de bulbos de 14cm, y reporta que la capacidad reproductiva depende en gran parte de la variedad, obteniendo 2.03 a 1.99 bulbillos por explante, en periodos de incubación de 8 a 14 semanas.

Wagatsuma (1996) menciona la importancia de la duración del día en propagación *in vitro*, ya que controla la formación de bulbillos por escamas, y a su vez los bulbillos producidos en luz tienen mejor comportamiento en campo, en cuanto a crecimiento de bulbo y emergencia de hojas.

(Ohkawa *et al.*, 1996) en experimentos de micro propagación de *Lilium japonicum* Thumb, usando 2,4-epibrassinolido (EB) a diferentes concentraciones 0, 0.001, 0.01, 0.1 o 1.0 mg/lit, y ANA (0 y 0.1 mg/lit), cultivados en luz continua y por periodos de 8 a 10 semanas; reportan que la mayor brotación de tallos adventicios después de 10 semanas fue obtenida con 0.1 mg /lit de EB, obteniendo 10.4 brotes por explante, seguido de por 1.0 mg/lit de EB + 0.1 mg/lit de NAA obteniendo 8.9 brotes por explante, y 0.1 mg EB + 0.1 mg/lit de ANA, obteniendo 8.2 brotes por explante. En cuanto a la formación de bulbillos el mas grande numero se obtuvo con 0.01 mg EB + 0.1

mg NAA/litro, obteniendo 2.0 bulbillos por explante después de 10 semanas, seguido por 0.1 mg EB + 0.1 mg NAA/litro, obteniendo 1.5 bulbillos por explante. El enraizamiento de los bulbillos regenerados fue mejor con 0.01 mg EB + 0.1 mg NAA/litro, obteniendo 4.9 raíces por explante, después de 10 semanas.

(Park *et al.*, 1996) reportan resultados de micropropagación de *Lilium concolor* cv. Parthenion, usando diferentes reguladores de crecimiento, y mencionan que para cultivo de meristemo los mejores resultados se obtuvieron con 1.5 mg kinetina y 1.0 mg de IAA por litro, mientras que para la producción de bulbillos por explante, benciladenina (BA) fue mas efectiva que isopenteniladenina (2iP) o kinetina. Thidiazuron (TDZ) a 0.01 mg/litro produjo multiples brotes por explante de escama de bulbo pero inhibió el desarrollo de los bulbillos en comparación con BA, kinetina y 2iP. Sin embargo, un bulbillo en medio MS suplementado con 0.01 mg TDZ por litro produjo 12.5 bulbillos. Esto fue en un medio osmoticamente controlado con 3% sacarosa y 5% manitol como fuente de carbono.

(Roh *et al.*, 1996) reportan que en la propagación de *Lilium* spp, aparte de la importancia de los efectos de la luz, temperatura, sacarosa y la adición de reguladores de crecimiento a un medio MS; es importante la parte de donde se toma la escama para micropropagar, mencionando que las escamas de la parte de afuera producen mas bulbillos que las de en medio, y la parte central del bulbo produce menos que las de en medio; y en cuanto a las escamas,

mencionan que se cortaron en tres formas, distal, basal y central y las que dieron mejores resultados para la producción de bulbillos fueron las que se cortaron en forma basal; y en cuanto a la concentración de reguladores, los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones mas bajas de ANA 0.01 mg/lit y 0.01 mg/lit de BA

(Marinangeli *et al.*, 1997) realizaron experimentos en *Lilium cv. Enchantment*, para la engorda de bulbillos después de micropropagados. Probaron medio MS solo y MS doble suplementados con varias concentraciones de sacarosa (30, 60, 90 or 120 g/litro), 0.1 mg NAA/litro, 0.1 mg kinetina/litro, 0.4 mg tiamina/litro, 100 mg inositol/litro y 8 gr agar/litro, a pH 5.7. los cultivos fueron puestos en oscuridad a 25C. Después de 3 meses, el tamaño de bulbillos y el crecimiento de raíces fue mejor en el medio doble y suplementado con 90 g de sacarosa por litro.

(Lim *et al.*, 1998) realizaron experimentos en lilies orientales, Casa Blanca, Star Gazer y Acapulco, usando diferentes tipos de explante (escamas, flores y tallos) y mencionan que todos fueron aptos para producción de bulbillos y que las escamas fueron las mejores. La benciladenina indujo producción y crecimiento de bulbillos así como bajas concentraciones de ANA, y la kinetina inhibió formación y desarrollo.

MICROPROPAGACION DE LILIES (*Lilium spp*), cv Casa Blanca

J. A. González-Fuentes¹; M. A. Bustamante-García; A. Benavides-Mendoza. L. Bañuelos-Herrera.

Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila México.

(¹Autor responsable)

RESUMEN

Con el objetivo de obtener un mayor número de bulbillos por explante in vitro en lilies (*Lilium spp.*) cv. Casa Blanca, de los que actualmente son obtenidos en México, los cuales varían entre 2 y 4 bulbillos por explante; se evaluó el efecto de diferentes fitoreguladores, BA (*N*⁶-benzyladenine) 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg.litro⁻¹ y 2iP (*N*⁶-(3-methylbut-2-enyl)adenine) 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg.litro⁻¹, en combinaciones con ANA (2-(1-naphthyl)acetic acid) 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg.litro⁻¹, en un medio MS, usando un arreglo bifactorial, en un diseño completamente al azar con tres repeticiones y tres explantes por frasco como unidad experimental; bajo condiciones controladas de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una temperatura diurna de 25° y nocturna de 16°C. Los resultados muestran que el tratamiento con una concentración de BA a 0.1 mg.litro⁻¹ mas ANA a 0.2 mg.litro⁻¹, dio el mejor resultado, obteniendo un promedio de 6 bulbillos por explante; superando así el promedio de bulbillos por explante que actualmente se obtiene en México.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Cultivo de tejidos, fitohormonas.

MICROPROPAGATION OF LILIES (*Lilium spp*) cv. Casa Blanca

SUMMARY

With the objective to increase the number of bulblets per explant cultured in vitro, of lilies (*Lilium spp.*) cv. Casa Blanca, which in Mexico the average is 2 to 4 bulblets per explant, we studied the effect of different plant growth regulators, such as BA (*N*⁶-benzyladenine) at 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg.liter⁻¹ and 2iP (*N*-(3-methyl-2-butenyl)-1*H*-purin-6-amine) at 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg.liter⁻¹ in combinations with NAA (1-naphthalenacetic acid) at 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg.litro⁻¹, in a MS medium, in a bifactorial arrangement using a completely random design with 3 replicates and 3 explants per flask as a experimental unit; under controlled conditions of 16 hours light, 8 hours darkness and day temperature of 25°C and 16°C at night. The results show that the treatment with a combination of BA at 0.1 mg.liter⁻¹ and NAA at 0.2 mg.liter⁻¹ gave the best results, obtaining an average of 6 bulblets per explant, which is superior to the average that is obtained in Mexico.

ADDITIONAL KEY WORDS: Tissue culture, plant growth regulators.

INTRODUCCIÓN

La propagación asexual por medio de cultivo de tejidos ha sido reportada para muchos cultivares de lilies, algunos de ellos incluyen *L. longuiflorum* (Mizuguchi *et al.*, 1994), *L. leichtlinii* var. *trigrinum* (Joung *et al.*, 1995), Híbridos orientales Karuse (1996), *L. japonicum* thumb (Ohkawa *et al.*, 1996), *L. concolor* vr. *Parthenion* (Park *et al.*, 1996), *L. cv* *Enchantment* (Marinangeli *et al.*, 1997).

Wagatsuma (1996), menciona la importancia del fotoperíodo en la propagación *in vitro* de lilies, ya que este controla la formación de bulbillos por escamas, y reporta además que la mejor duración de fotoperíodo es de 16 horas luz y 8 oscuridad, y a su vez los bulbillos producidos en luz tienen mejor comportamiento en campo, en cuanto al crecimiento de bulbo y emergencia de hojas. Así mismo, Niimi (1995) reporta que los bulbos producidos bajo condiciones de luz son más resistentes a infecciones por microorganismos del suelo que los producidos en oscuridad. (Mizuguchi *et al.*, 1994) reportan que los mejores resultados se obtuvieron a una temperatura diurna de 23 a 25°C. En cuanto al tipo de explante, (Joung *et al.*, 1995) mencionan que para producción de bulbillos a partir de meristemo, la mejor parte de la placa basal fue la media. Por otro lado Roh (1996) menciona que las escamas de la parte de afuera del bulbo producen más bulbillos que las de la parte media y las de la parte central. En cuanto al medio de cultivo, (Joung *et al.*, 1995), comparando un medio MS con un medio Hiponex para formación de bulbillos *in vitro* en híbridos orientales, reportan que el mejor medio fue el MS, lo cual fue

corroborado por Niimi (1995) y, (Park *et al.*, 1996) y, (Jeong *et al.*, 1996) y Curvetto (1997).

En México, la empresa Bioplants S.A. de C.V. trabajo con un protocolo de micropropagación para esta especie, a partir de bulbos comerciales importados de Holanda, teniendo como problema principal la baja obtención de bulbillos (4) por unidad o explante (penca o escama), resultando económicamente muy pocos, ya que un bulbo proveniente de Holanda tiene un costo de 0.6 a 0.9 dólares USA, dependiendo del tamaño (12-14 a 16-18 cm de periferia, respectivamente), siendo estos los que tienen la capacidad de producir un tallo comercial de buena calidad. Sin embargo. con el protocolo utilizado en México, los costos de producción desde micropropagación hasta obtener un bulbo de tamaño comercial, normalmente es de 0.7 dólares USA que aunque es de la misma calidad, no representa ninguna ganancia para la empresa, y aunado a esto se le suma el tiempo que tarda en obtenerse dicho bulbo, que es de 2 años promedio.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue Incrementar el numero de bulbillos por explante y superar el número de 4 que actualmente se producen en México usando 2 citocininas N^6 -bencil adenina (BA) y (*N*-(3-methyl-2-butenyl)-1*H*-purin-6-amine (2iP) a diferentes concentraciones y combinadas con varios niveles de la auxina ácido naftalenacetico (ANA).

MATERIALES Y METODOS

La empresa Bioplants S.A. de C.V proporciono los microbulbillos in vitro, tomándose las escamas de la parte de afuera (figura 1) de cada bulbillo clonado como explante. Las unidades experimentales estuvieron compuestas por tres explantes por frasco (figura B), los cuales contienen 40 cc de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 8 gramos de agar, pH de 5.7, sacarosa 3% y suplementado con reguladores de crecimiento. Los frascos se incubaron a un foto periodo de 16 hrs. luz y 8 oscuridad, y temperatura, 25°C día y 16°C noche.

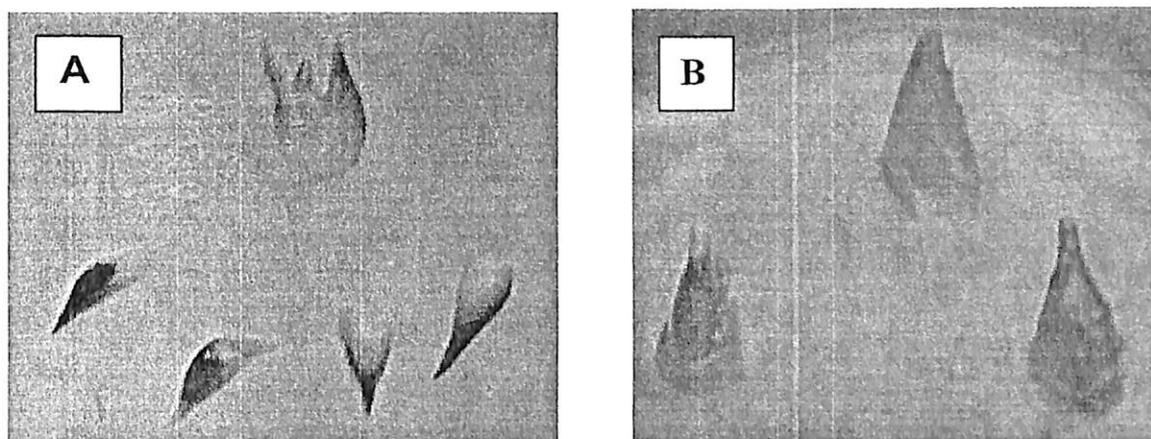


Figura 1. Disección y siembra de explantes de lilies. A- Escamas separadas ,
B- Unidad experimental

Los reguladores de crecimiento usados fueron la auxina ANA y las citocininas BA y 2iP, las cuales se combinaron usando dos experimentos factoriales con arreglo combinatorio en una distribución completamente al azar con 3

repeticiones (frascos) por tratamiento. En el primer factorial se combinaron BA a 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg.litro⁻¹ con ANA a 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg.litro⁻¹, con los cuales se obtuvieron 36 tratamientos. En el segundo factorial se combinaron 2ip 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg.litro⁻¹ con ANA 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg.litro⁻¹, y con las cuales se obtuvieron 36 tratamientos.

Las variables evaluadas fueron: Número de bulbillos por explantes, peso fresco de bulbillos por explante, número de raíces por explante, número de hojas por explante. Estas evaluaciones se hicieron mediante observaciones cada 3 semanas, y el conteo final por unidad se realizó al término de un periodo de 10 semanas.

Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo al modelo estadístico del experimento factorial utilizado, $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$, de tal manera que cuando existió diferencia estadística significativa se procedió a realizar una prueba de comparación múltiple de medias por Tukey ($P < 0.01$).

RESULTADOS

Número de bulbillos por explante

Por lo general podemos decir que la mezcla de BA con ANA dio mejores resultados en comparación con la mezcla de 2iP con ANA, en cuanto a producción de bulbillos por explante (figura 2 y 3). Aún en el medio MS sin fitorreguladores de crecimiento (testigo), se produjeron bulbillos, aunque en muy baja cantidad. De las 72 combinaciones de auxina y citocininas probadas en los 2 factoriales, la de ANA a 0.2 mg.litro⁻¹ + BA a 0.1 mg.litro⁻¹ dio los mejores resultados (figura 4).

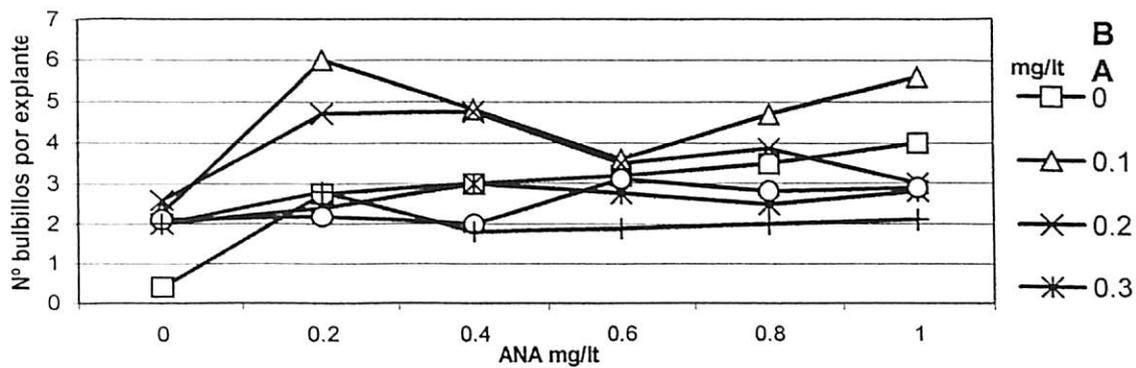


Figura 2.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA, y BA , SOBRE EL NUMERO DE BULBILLOS POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO

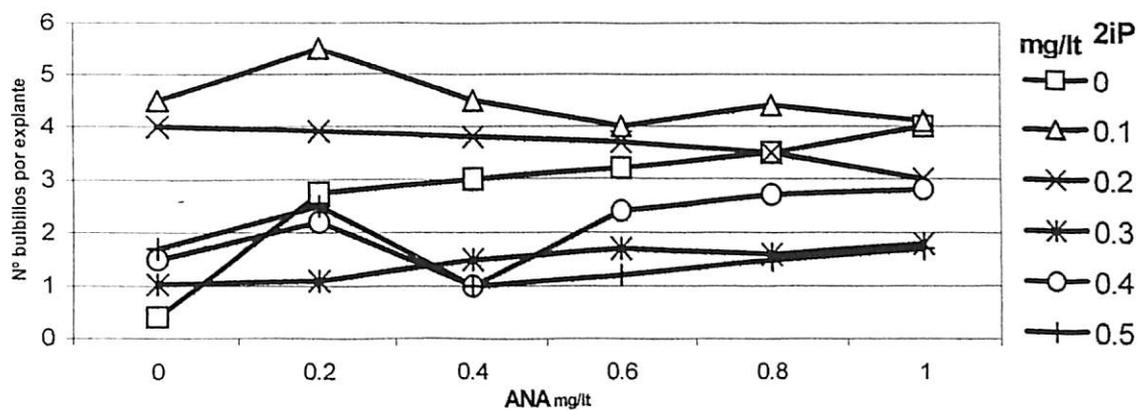


Figura 3.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA, y 2iP, SOBRE EL NUMERO DE BULBILLOS POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO

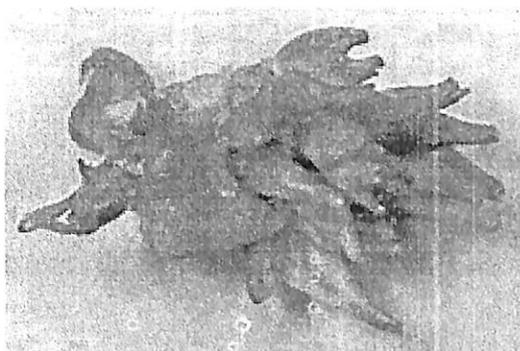


Figura 4. Producción de bulbillos en un explante de lilies

El sitio de iniciación de la formación de bulbillos fue de la base del explante, donde en la mayoría de los tratamientos se formaba un callo y posteriormente los bulbillos (figura 5), y en algunos casos los bulbillos aparecían sin presentar callo.

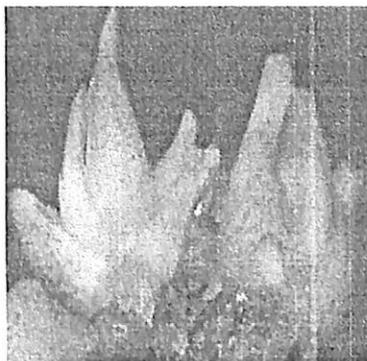


Figura 5. Lugar de iniciación de bulbillos, emergiendo de un callo.

Para esta variable los bulbos anormales también fueron contados, la aparición así como la frecuencia de estos la cual se dio y aumento cuando en el medio nutritivo la concentración de reguladores fue alta, desde 0.3 a 0.5 mg.litro⁻¹ de citocininas y 0.6 a 1.0 mg.litro⁻¹ de auxina, incluso a estas concentraciones de reguladores la producción de bulbillos disminuyo considerablemente. Las malformaciones observadas fueron: bulbillos con muchas hojas (15 a 18), emergiendo de un solo punto abultado y sin raíces, y bulbillos de forma globular, de apariencia débil, con crecimiento lento (figura 6) comparable con los que fueron normales (figura 7). La morfología de los bulbillos normales fue comparable con aquellos producidos de un bulbo madre cultivado in vivo. En la (figura 3) se representa el comportamiento de ANA y 2iP y se observa que ningún tratamiento supera al tratamiento de 0.2 mg.litro⁻¹ de ANA mas 0.1 mg.litro⁻¹ de BA (figura 1)

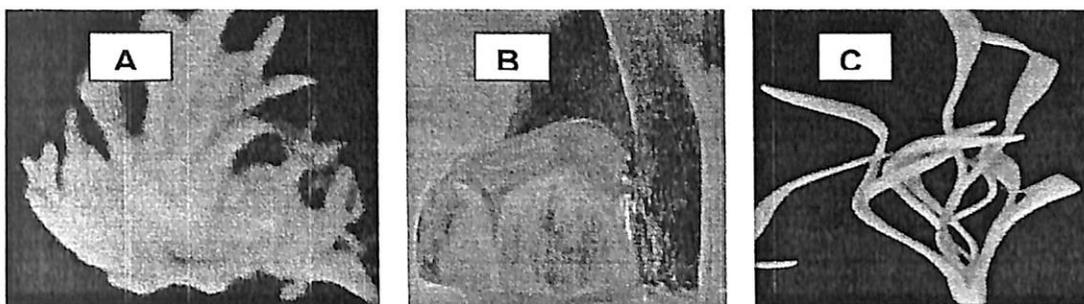


Figura 6. Malformaciones observadas en bulbillos (A) bulbillos con muchas hojas (15 a 18), emergiendo de un solo punto abultado y sin raíces. (B) bulbillos de forma globular. (C) crecimiento de un bulbillo mal formado.

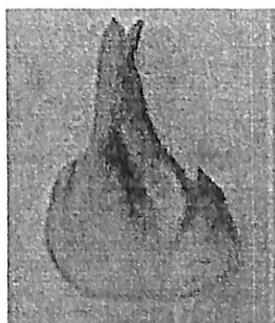


Figura 7. Bulbillo bien formado, presentando una forma similar a los bulbillos producidos in situ en forma natural a partir de un bulbo madre.

Como se puede observar en el cuadro 1, al realizar la prueba de comparación de medias por el método de Tukey $p < 0.01$, el tratamiento, con BA a $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ mas ANA a $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ fue estadísticamente igual al tratamiento con BA a 1 mg.litro^{-1} mas ANA a $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ y diferente al resto de los tratamientos.

Cuadro 1.- Comparación de medias del factor B (auxina ANA) dentro del nivel 2 del factor A (citocinina BA), para el parámetro de numero de bulbillos por explante de acuerdo a Tukey con un nivel de significancia $p < 0.01$.

BA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ANA	0.2	1.0	0.4	0.8	0.6	0.0
Numero de bulbillos	6.0 a^z	5.6 a	4.8 b	4.7 b	3.6 c	2.3 d

^zValores con la misma letra en la línea de medias son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con $P \leq 0.01$

Peso fresco de bulbillos por explante

Los pesos mas altos (figura 8 y 9) fueron registrados para los bulbillos producidos en el medio con 0.1 mg.litro de BA mas 0.4 mg.litro de ANA, obteniendo un promedio de 240 miligramos por conjunto de bulbillos. La tendencia que se observo fue que cuando la concentración de citocininas supero los 0.3 mg.litro⁻¹, el peso disminuyo significativamente hasta en un 70% menos, en comparación con los producidos a bajas concentraciones, con la excepción del testigo sin reguladores y el tratamiento con ANA sola a 0.2 mg.litro⁻¹, que también registraron un peso muy bajo similar al de las concentraciones mas elevadas de ANA (1.0 mg.litro⁻¹) mas citocininas (0.5mg.litro⁻¹)

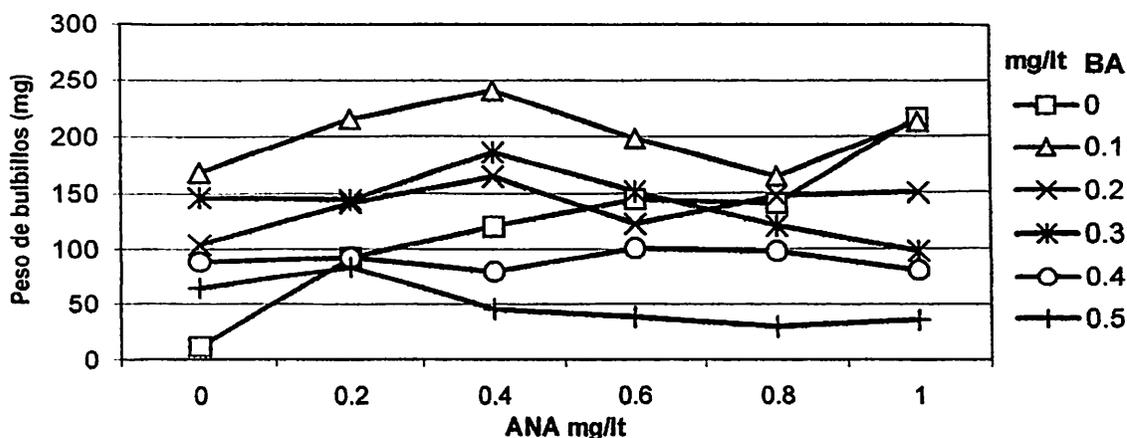


Figura 8.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA, y BA, SOBRE EL PESO DE BULBILLOS POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO

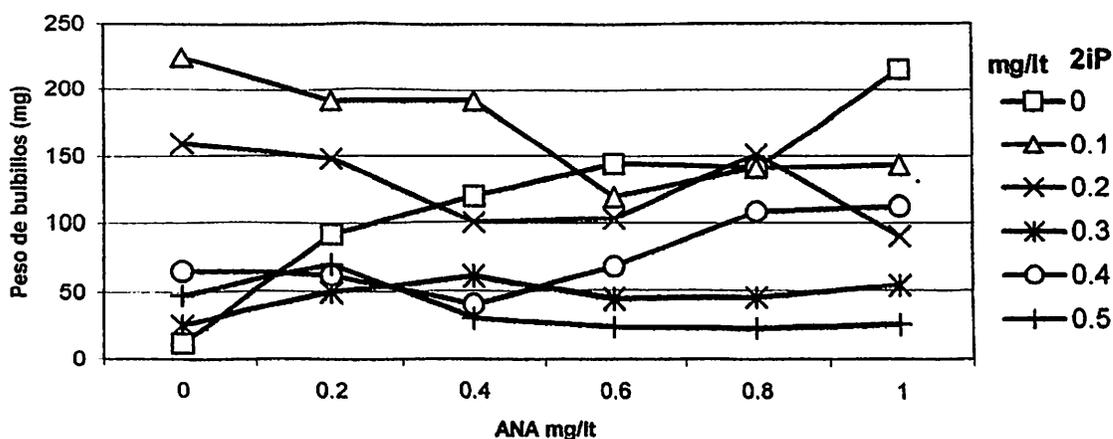


Figura 9.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA y 2iP, SOBRE EL PESO DE BULBILLOS POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO

Como se puede observar en el cuadro 2, al realizar la prueba de comparación de medias, el tratamiento con BA a $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ mas ANA a $0.4 \text{ mg.litro}^{-1}$ fue estadísticamente igual a los tratamientos con BA a $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ mas ANA a 0.2 y $1.0 \text{ mg.litro}^{-1}$, y diferente a los demás tratamientos.

Cuadro 2.- Comparación de medias del factor B (ANA) dentro del nivel 2 del factor A (BA), para peso de bulbillos por explante de acuerdo a Tukey con un nivel de significancia $p < 0.01$.

BA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ANA	0.4	0.2	1.0	0.6	0.0	0.8
Peso de bulbillos (miligramos)	240 a²	215 ab	212 ab	198 b	167.9 c	164.3 c

²Valores con la misma letra dentro de la línea de medias son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey $P \leq 0.01$

Número de hojas producidas por explante

El número de hojas por explante (figuras 10, 11 y 12) fue mayor en los tratamientos conteniendo citocinina y auxina que en los tratamientos con auxina o citocinina sola, así como el testigo que también presentó pocas hojas. Se observa que a medida que aumento la cantidad de BA a $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ y el ANA a $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$, el número fue mayor, siendo el mismo comportamiento en la combinación de ANA con 2iP, pero con $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ de 2iP.

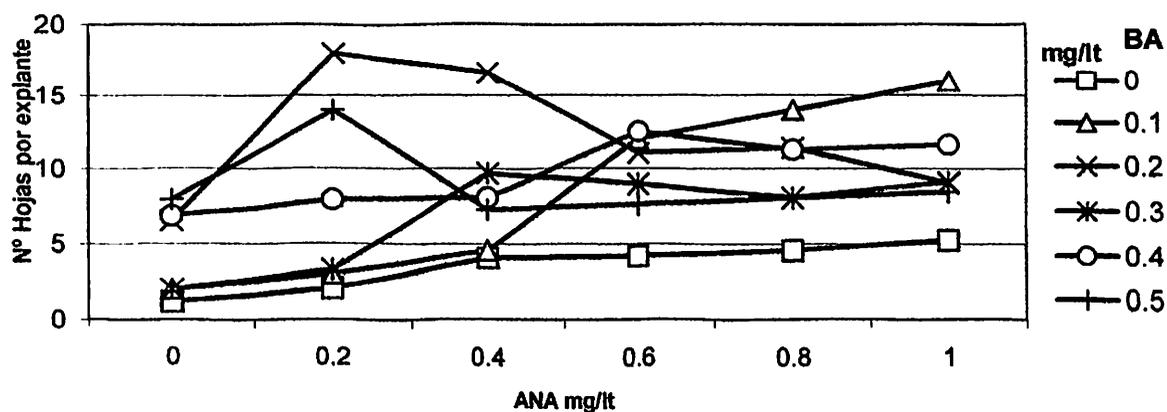


Figura 10.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA y BA, SOBRE EL NUMERO DE HOJAS POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO

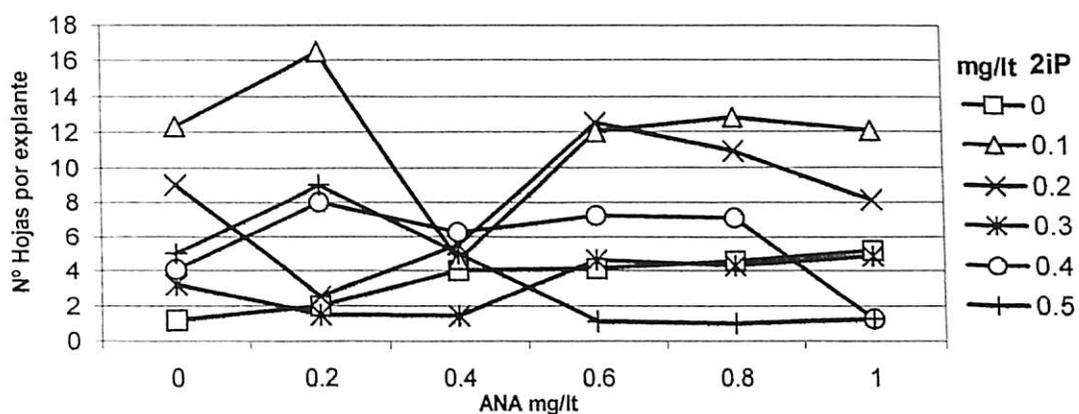


Figura 11.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA y 2iP, SOBRE EL NUMERO DE HOJAS POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO



Figura 12. Emergencia de hojas en las escamas de lilies

En el cuadro 3 se observa que el tratamiento con BA a $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ mas ANA a $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ fue estadísticamente igual al tratamiento con BA a $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ mas ANA a $0.4 \text{ mg.litro}^{-1}$ y diferente a los demás tratamientos.

Cuadro 3.- Comparación de medias del factor B (auxina ANA) dentro del nivel 3 del factor A (citocinina BA), para el parámetro número de hojas por explante, de acuerdo a Tukey con un nivel de significancia $p < 0.01$.

BA	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
ANA	0.2	0.4	0.8	0.6	1.0	0.0
Numero de hojas Por explante	18 a²	16.6 a	11.4 b	11 b	9 bc	6.5 c

²Valores con la misma letra dentro de la línea de medias son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey $P \leq 0.01$

Número de raíces por explante

En número de raíces por explante (figuras 13 y 14) fue mayor en los tratamientos con combinación de citocinina y auxina que en los tratamientos con auxina o citocinina sola, así como en el testigo que también presentó pocas raíces. Se observa que a medida que aumento la concentración de ANA el número fue mayor, teniendo el mismo comportamiento en la combinación con BA y con 2iP. Se puede observar también que la producción de raíces se dio en todos los tratamientos (figura 15), pero cuando la concentración de citocinina aumento de 0.1 a 0.5 mg.litro⁻¹, el número se vio reducido.

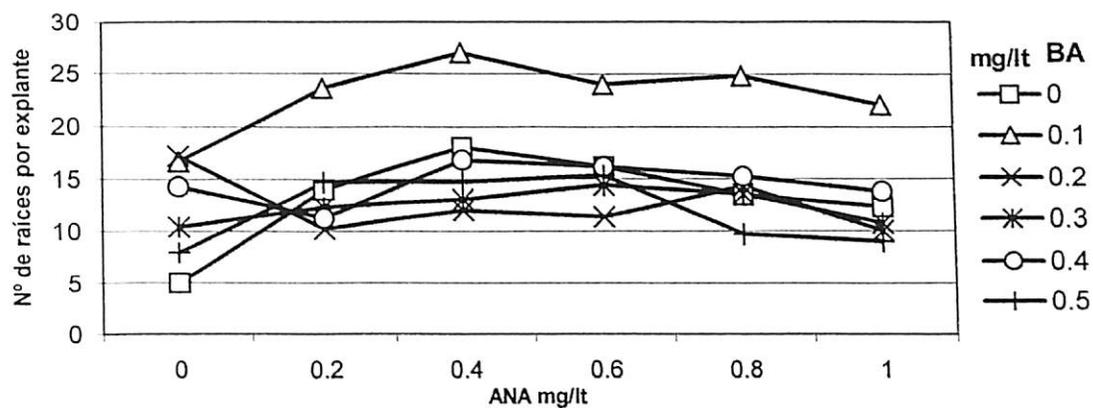


Figura 13.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA, y BA, SOBRE EL NUMERO DE RAICES POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO

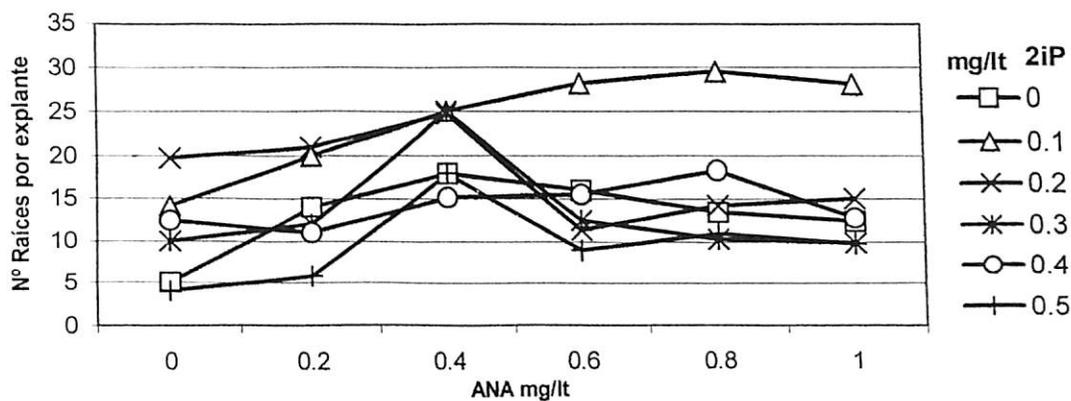


Figura 14.- EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ANA y 2iP, SOBRE EL NUMERO DE RAICES POR EXPLANTE EN LILIES, DESPUES DE 10 SEMANAS DE CULTIVO

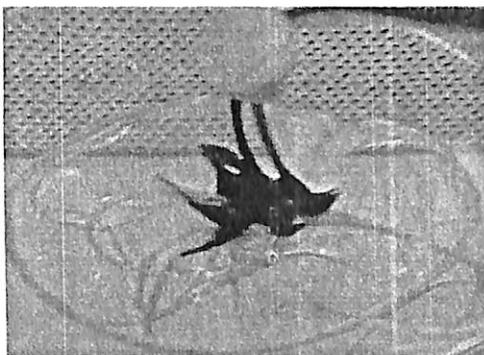


Figura 15. Regeneración de raíces en *Lilium* cv Casa Blanca, se muestra la multiplicación y crecimiento de raíces en el medio nutritivo.

En el cuadro 4 se observa que los tratamientos con 2iP a 0.1 mg.litro⁻¹ mas 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg.litro⁻¹ de ANA, fueron estadísticamente diferentes a los otros tratamientos.

Cuadro 4.- Comparación de medias del factor B (auxina ANA) dentro del nivel 2 del factor A (citocinina 2iP) para el parámetro numero de raíces por explante de acuerdo a Tukey con un nivel de significancia $p < 0.01$.

2iP	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ANA	0.8	0.6	1.0	0.4	0.2	0.0
Numero de raíces Por explante	29.4 a^z	28.2 a	28 a	25 ab	20 b	14.1 c

^zValores con la misma letra dentro de la línea de medias son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey $P \leq 0.01$

DISCUSIÓN

Para la regeneración de bulbillos, la adición de reguladores de crecimiento no es necesaria, ya que si hay producción de bulbillos (aunque en bajas cantidades) como se observa en el testigo, lo cual coincide con lo reportado para otras especies de *Lilium* por Niimi (1995). Al suplementar el medio con bajas concentraciones de citocininas y de ANA, aumenta considerablemente la respuesta de regeneración, mientras que la respuesta inducida por citocinina sola también es considerable, siendo mas con 2iP que con BA. La respuesta estimuladora de ANA mas que con citocininas (BA o

2iP), nos permite creer que los explantes utilizados tienen suficiente cantidad de citocininas endógenas y cuando suplementamos bajos niveles de auxinas, estos pueden alcanzar el balance crítico de auxina-citocinina requerido para la formación de órganos, coincidiendo con (Aartrijk *et al.*, 1981).

En la mayoría de los trabajos donde se usan auxinas y citocininas *in Vitro* para multiplicación clonal en *Lilium*, los resultados siguen un patrón de acuerdo a las concentraciones y combinaciones. El número de bulbillos por explante parece estar relacionado con la interacción y el balance de estos fitoreguladores, por lo que niveles ligeramente un poco más altos de auxina ($0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$) que de citocinina ($0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$), induce mayor formación de bulbillos, coincidiendo con lo reportado por (Rybczynski *et al.*, 1989) para otras especies de *Lilium*.

El peso fresco de bulbillos estuvo influenciado por la combinación de ANA a $0.4 \text{ mg.litro}^{-1}$ más BA a $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$, superando al tratamiento que produjo más bulbillos $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ de ANA más $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ de BA, lo cual nos indica que la competencia por nutrientes en los bulbillos permitió obtener más peso en aquellos tratamientos con menos bulbillos y viceversa; además del delicado balance que existe entre el medio ambiente de cultivo y el tipo de fitohormonas exógenas suplementadas al medio nutritivo, que inducen a producir bulbillos con más o menos peso. El peso fresco de los bulbillos generados fue ligeramente más alto que los reportados por (Maesato *et al.*, 1994) en diferentes especies de *Lilium*, lo cual creemos se puede deber a que es diferente el cultivar, y en consecuencia difieren en su capacidad de regeneración.

El número de hojas aumento mas por la influencia de citocininas que de auxina y fue mayor a concentraciones bajas de ambos reguladores ($0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ de ANA mas $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ de 2iP o $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ de BA y disminuyo generalmente cuando las concentraciones de ambos reguladores se incrementaron. Cuando el numero de hojas fue alto los bulbillos producidos fueron de baja calidad, así como los bulbos producidos a las mas altas concentraciones de reguladores que aunque tuvieron pocas hojas, también fueron de baja calidad; no así los bulbillos producidos con pocas hojas a concentraciones bajas de citocininas $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ BA y 0.0 a $0.4 \text{ mg.litro}^{-1}$ de ANA, que fueron de buena calidad.

La producción de raíces y de hojas en este caso no es muy importante ya que los bulbillos producidos son disectados sin raíces y sin hojas y engordados en otro medio nutritivo antes de ser transplantados a suelo para una mayor engorda. Sin embargo, es claro que la producción de raíces fue influenciada por ambos reguladores pero mas por la auxina, lo cual era de esperarse, dado el efecto que tienen las auxinas sobre la inducción de raíces.

La producción de bulbillos anormales ocurrió en el medio con altas concentraciones de reguladores de crecimiento, y aunque estos bulbillos anormales no tienen ningún uso practico, nos permiten tener una visión del desarrollo de la formación de bulbillos por micro escamas bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Trabajando con propagación *in vitro* por escamado en varias especies de *Lilium*, (Maesato *et al.*, 1994; Mizuguchi *et al.*, 1994) observaron varios tipos de malformaciones, y algunas coinciden un poco con las observadas en este estudio.

Los resultados muestran que para la multiplicación clonal por escamado in vitro de lilies cv. Casa Blanca, cultivados en un medio MS suplementado con auxinas mas citocininas a bajas concentraciones, usando como explante una micro escama de 4 x 6 mm de tamaño y un peso de 50 miligramos promedio, con una edad de 8 semanas, da buenos resultados en cuanto a la producción de bulbillos por explante, superando a los reportados por (Niimi *et al.*, 1990; Maesato *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994 y, Park *et al.*, 1996). Una posible razón es que el explante que nosotros usamos fue de menor edad y en consecuencia de mayor capacidad de reproducirse, como reportado por Edwin F. G. (1996). Así mismo, la aplicación exógena de reguladores de crecimiento, especialmente de ANA y BA, esta ultima superando y siendo mejor que 2iP, coincidiendo con (Park *et al.*, 1996), es necesaria para lograr una respuesta estimuladora.

CONCLUSIONES

- 1) El numero de bulbillos se incremento hasta un promedio de 6 por unidad o explante en la micropropagación de lilies (*Lilium spp*) cv. Casa Blanca, al agregar al medio nutritivo $0.1 \text{ mg.litro}^{-1}$ de BA mas $0.2 \text{ mg.litro}^{-1}$ de ANA.
- 2) El peso fresco de cada bulbillito fue de 35.8 miligramos en promedio, siendo mayor a los reportados en otros trabajos.
- 3) Se logró una disminución en costo del 25% en cada bulbo producido.

LITERATURA CITADA

- AARTRIJK, J. V.; BARNHOORN, G. J. B. 1983. Adventitious bud formation from bulb-scale explants of *Lilium speciosum* Thunb, *in vitro*. Effects of wounding, TIBA and temperature. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 110: 355-363.
- EDWIN, F. G. 1996 Plant propagation by tissue culture, part 2, 2nd Edition pages 421 to 445. Publishing house, Exegerics Limited, Great Britain.
- JOUNG, H.; SUNG, M.; LEE, J.; YU, C.; JOUNG, H. 1995. In vitro bulbing of *Lilium* Oriental hybrid 'Casa Blanca' and *Lilium leichtlinii* var. *tigrinum* as influenced by growth regulators, cold treatment and culture environments. Journal of Agricultural Science, Horticulture. 1995, 37: 1, 384-388; 24 ref.
- LEE, J.; SUH, J. 1994 In vitro bulblet formation from various explant sources and sizes of bulb scale segment in *Lilium elegans* hybrid. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 1994, 35:5, 507-513; 1 fig.;14 ref.
- MAESATO, K.; SHARADA, K.; FUKUI, H.; SARMA, K.S. 1994. In vitro bulblets regeneration from bulb scale explants of Harson easter lily. J. Hort Sci. 69(2):289-291.
- MARINANGELI, P.; CURVETTO, N. 1997. Increased sucrose and salt concentrations in the culture medium improve growth of micropropagated *Lilium* bulblets. Biocell. 1997, 21: 2, 161-164; 9 ref.

- MIZUGUCHI, S.; OHKAWA, M.; IKEKAWA, T. 1994. Effects of naphthaleneacetic acid and benzyladenine on the growth of white callus and formation of bulblet from callus induced from mother-scale of *Lilium japonicum* Thunb. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 1994, 63: 1, 131-137; 23 pl. 25 ref.
- NIIMI, Y. 1995. In vitro propagation and post *in vitro* establishment of bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 1995, 63: 4, 843-852; 3 pl.; 14 ref.
- OHKAWA, M.; OHSHIRO, T.; IKEKAWA, T. 1996. Effects of 24-epibrassinolide and NAA on the formation of regenerated bulblet of *Lilium japonicum* Thunb. by scale culture in vitro. *Environment-Control-in-Biology*. 1996, 34: 1, 15-19; 10 pl.; 11 ref.
- PARK, N.; LEE, J.; ROH, M. 1996. Effect of temperature, scale position, and growth regulators on the bulblet formation and growth during scale propagation of *Lilium*. *Acta Horticulturae*. 1996, No. 414, 257-262; 10 ref.
- ROH, M.; JEONG, J.; LEE, J. 1996. In vitro propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. *Acta Horticulturae*. 1996, No. 414, 269-276; 15 ref.

RYBCZYNSKI, J. J.; GOMOLINSKA, H. 1989. 6-Benzyladenine control of the initial bulblets formation of wild lily *Lilium martagon* L. *Acta Horticulturae*. 1989, No. 251, 183-189; 11 ref.

WAGATSUMA, T.; UNNO, Y. 1996. Effect of day length in vitro on bulblet formation in edible lily, bulblet enlargement, and leaf emergence from bulblets in vivo. *Journal of Rakuno Gakuen University, Natural Science*. 1996, 21: 1, 73-77; 22 ref.

LITERATURA CITADA

- Aartrijk, J. V.; Barnhorn, G. J. B. 1983. Adventitious bud formation from bulb-scale explants of *Lilium speciosum* Thunb, *in vitro*. Effects of wounding, TIBA and temperature. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 110: 355-363.
- Bidwell, R. G. 1990. *Fisiología Vegetal*. AGT Editor. México. P. 461-463..
- Bird, R. 1991. *Lilies. An illustrated identifier and guide and cultivation*. Chartwell, books INC. printed in Hong Kong.
- Caputo, G.; Apollonio, G.; Scaramuzzi, F.; D'emerico, S. 1990. Research on vegetative multiplication of *Lilium* 'Casa Blanca' by growing various types of explants *in vitro*. Istituto Orto Botanica, Università di Bari, Bari, Italy. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*. 1990, 184: 2, 123-134; 18 pl.; 16 ref.
- Edwin, F. G. 1996 *Plant propagation by tissue culture, part 2, 2nd Edition* pages 421 to 445. Publishing house, Exegerics Limited, Great Britain.
- Hartmann, H.; Kester, D. E. 1995. *Propagación de Plantas*. Ed. Continental. México. Pp 130-165..
- <http://www.florvertical.com>; <http://www.infoagro.com>; <http://www.thebulbcenter.com>
- International Flower Bulb Center 1995. *El cultivo de Lilium para flor cortada y en maceta*. Hillegom Holland
- Joung, H.; Sung, M.; Lee, J.; Yu, C.; Joung, H.; Sung, M. 1995. *In vitro* bulbing of *Lilium* Oriental hybrid 'Casa Blanca' and *Lilium leichtlinii* var. *tigrinum* as influenced by growth regulators, cold treatment and culture environments. *Journal of Agricultural Science, Horticulture*. 1995, 37: 1, 384-388; 24 ref.
- Krause, J. 1996. Reproductive ability of some oriental lily varieties propagated by bulb scales. *Prace z Zakresu Nauk Rolniczych*. 1996, 80:275-281;6 ref.
- Larson, A.R. 1996. *Introducción a la Floricultura*. Primera edición en español. Ed A.G.T., México D.F.
- Lee, J. S; Suh, J. K.; Han, E.J. 1994 *In vitro* bulblet formation from various explant sources and sizes of bulb-scale segment in *Lilium elegans* hybrid. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. 1994, 35: 5, 507-513; 1 fig.; 14 ref.
- Lim, S.; Seon, J.; Son, S.; Han, B.; Paek, K. 1998. Effect of explant sources and plant growth regulators on bulblet formation in *Lilium*. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. 1998, 39: 1, 111-114; 16 ref.

- Maesato, K.; Sharada, K.; Fukui, H. 1994. *In vitro* bulblets regeneration from bulbscale explants of Harson easter lily. *J. Hort Sci.* 69(2):289-291.
- Marinangeli, P.; Curvetto, N. 1997. Increased sucrose and salt concentrations in the culture medium improve growth of micropropagated *Lilium* bulblets. *Biocell.* 1997, 21: 2, 161-164; 9 ref.
- Mizuguchi, S.; Ohkawa, M.; Ikekawa, T. 1994. Effects of naphthaleneacetic acid and benzyladenine on the growth of white callus and formation of bulblet from callus induced from mother-scale of *Lilium japonicum* Thunb. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.* 1994, 63: 1, 131-137; 23 pl. 25 ref.
- Niimi, Y. 1995. *In vitro* propagation and post *in vitro* establishment of bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.* 1995, 63: 4, 843-852; 3 pl.; 14 ref.
- Ohkawa, M.; Ohshiro, T.; Ikekawa, T. 1996. Effects of 24-EP and NAA on the formation of regenerated bulblet of *Lilium japonicum* Thunb. by scale culture *in vitro*. *Environment Control in Biology.* 1996, 34: 1, 15-19.
- Park, N.; Lee, J.; Roh, M. 1996. Effect of temperature, scale position, and growth regulators on the bulblet formation and growth during scale propagation of *Lilium*. *Acta Horticulturae.* 1996, No. 414, 257-262; 10 ref.
- Roh, M.; Jeong, J.; Lee, J. 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. *Acta Horticulturae.* 1996, No. 414, 269-276; 15 ref.
- Rojas, G.M.; Ramírez, H. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. *Fisiología, Tecnología, Experimentación.* Ed. Limusa. México pp 20-27..
- Rybcynski, J. J.; Gomolinska, H. 1989. 6-Benzyladenine control of the initial bulblets formation of wild lily *Lilium martagon* L. *Acta Horticulturae.* 1989, No. 251, 183-189; 11 ref.
- Shuzo, H. 1998. *In vitro* culture of plants. Ed Hario Investigation SA de CV..
- Wagatsuma, T.; Unno, Y. 1996. Effect of day length *in vitro* on bulblet formation in edible lily, bulblet enlargement, and leaf emergence from bulblets *in vivo*. *Journal of Rakuno Gakuen University, Natural Science.* 1996, 21: 1, 73-77; 22 ref.
- Weaver, R. J. 1990. *Reguladores de Crecimiento de las Plantas en la Agricultura.* Ed. Trillas. México. Pp 113-155..