

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE TRES ESPECIES
ORNAMENTALES MONOCOTILEDONEAS

P O R

Edgar Oliverio Fajardo Oliva

TESIS

PRESENTADA A LA

ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCION

DEL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO

BIBLIOTECA WILSON POPENO
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 92
TEGUCIGALPA HONDURAS

MICROISIS:	7,412
FECHA:	8/6/94
ENCARGADO:	VILLARREAL

EL ZAMORANO, HONDURAS
ABRIL, 1994

CPA-1994-7017

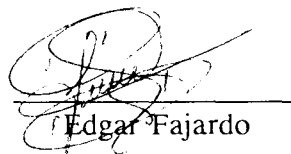
T#68 (468)

Establecimiento *in vitro* de tres especies
ornamentales monocotiledoneas

Por

Edgar Oliverio Fajardo Oliva

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana
el permiso para reproducir o distribuir copias
de este trabajo, para los fines que considere necesarios.
Para otras personas y otros fines se reservan
los derechos de autor



Edgar Fajardo

ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
EL ZAMORANO
ABRIL DE 1994

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz que me ha guiado para salvar otro obstáculo en la realización de mi vida.

A mis padres Edgar Oliverio Fajardo Marroquín y Gloria Amparo Oliva Ramos, por su amor, apoyo, consejos y todo lo que me han brindado.

A mis hermanos Marlon, Karen, Waldir, Herber y Christian por quererme y apoyarme en las penas, alegrías y tristezas, las que ayudaron a unirnos mucho más.

A toda mi familia, por el cariño, apoyo y confianza que me han tenido.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente al Dr. Juan José Alán, por haberme guiado en la realización del presente trabajo, además de ser un gran amigo que ha hecho despertar en mí el interés por la ciencia, la cultura y aprecio a la naturaleza.

Al profesor César Zepeda Ms.C., por su colaboración con las plantas de liriopé y consejos durante la realización del estudio. Al Sr. Markus Himspl Ms. C., por la donación del lote de plantas de agapanto, insumos y la asesoría prestada. Al Dr. Wilfredo Colón, al igual que el Dr. Juan Carlos Rosas por su ayuda en la revisión del documento final.

Al arquitecto Teodoro Albornoz, por el inmejorable trabajo de fotografía realizado.

A Bessy Martínez, así como a Olga Murillo, por su ayuda en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos.

A mis amigos Richard Kaehler, Ricardo Ewel, Gianni Suchini, Carlos Fuentes, Juan Durán, Raul Pinel, Ana Posas, Marco Vásquez, Dan Rosenfeld y Araceli Castro, por el apoyo y amistad que me brindaron durante la carrera.

A la Familia Chávez, en Tegucigalpa, por el cariño, la atención, fineza y amabilidad con que me han tratado.

A la Familia Rodríguez Moreno, por su amistad, apoyo, confianza y buenos momentos que disfrutamos juntos.

A la Sra. Isbela de Alvarez, por su colaboración en la preparación de la presentación de tesis y su aprecio.

Al personal del Departamento de Agronomía y de otros departamentos que de una u otra manera ayudaron en la realización del trabajo.

INDICE

TITULO	i
APROBACION	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE	vi
INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
COMPENDIO	xi
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
A. Micropropagación y Cultivos de Tejidos	3
1. Pasos en la Micropagación.....	4
a. Fase 1. Establecimiento Aséptico del Cultivo	5
b. Fase 2. Multiplicación de Propágulos	6
c. Fase 3. Enraizamiento de los Brotes y Preparación Para su Trasplante	7
B. Agapanto	8
1. Descripción Taxonómica, Morfológica y Origen	8
2. Propagación y Condiciones de Cultivo	9
3. Usos	10
C. Izote	10
1. Descripción Taxonómica, Morfológica y Origen	10
2. Propagación y Condiciones de Cultivo.....	10
3. Usos	11
D. Liriope	11
1. Descripción Taxonómica, Morfológica y Origen	11
2. Propagación y Condiciones de Cultivo	12
3. Usos	12
III. MATERIALES Y METODOS	16
A. Ubicación	16

B. Material Vegetal	16
C. Desinfección	17
D. Medios de Cultivo	18
1. Hormonas	18
2. Preparación del medio de Cultivo	20
3. Esterilización	20
E. Obtención de Explantes	21
F. Condiciones Ambientales	21
G. Metodología	22
1. Izote	22
a. Experimento 1	22
b. Experimento 2	23
c. Experimento 3	23
d. Experimento 4	23
2. Liriope	24
a. Experimento 1	24
b. Experimentos 2, 3 y 4	24
3. Agapanto	25
a. Experimento 1	25
b. Experimento 2	25
H. Análisis de Resultados	25
IV. RESULTADOS.....	27
A. Desinfección.....	27
B. Izote	27
1. Experimento 1	27
2. Experimento 2	28
3. Experimento 3	31
4. Experimento 4	31
C. Liriope	32
1. Experimento 1	32
2. Experimento 2	32
3. Experimento 3	33
4. Experimento 4	34
D. Agapanto	39
1. Experimento 1	39
2. Experimento 2	40
V. DISCUSION	46
A. Contaminación	46
B. Izote	48
C. Liriope	49
D. Agapanto	50

VI. CONCLUSIONES	52
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	54

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Tratamientos de desinfectantes utilizados, con sus diferentes concentraciones y tiempo de exposición	17
Cuadro 2.	Composición del medio básico de Murashige y Skoog (1962)modificado, usado en la micropropagación <i>in vitro</i> de lirioppe, izote y agapanto	19
Cuadro 3.	Dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento usadas en los experimentos para la micropropagación <i>in vitro</i> de lirioppe, izote y agapanto	20
Cuadro 4.	Combinación de hormonas utilizada en los Experimentos 2, 3 y 4 en la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>L. muscari</i> ...	24
Cuadro 5.	Tratamientos desinfectantes usados con sus diferentes concentraciones y tiempo de exposición que fueron los más adecuados para cada especie	27
Cuadro 6.	Número de yemas de izote que reaccionaron al usar ANA y BA, como hormonas.....	31
Cuadro 7.	Número de yemas de lirioppe que reaccionaron al usar las hormonas ANA y BA	33
Cuadro 8.	Número de yemas de lirioppe que reaccionaron al usar 2,4-D y KIN como hormonas	34
Cuadro 9.	Número de yemas de agapanto que reaccionaron al usar ANA y KIN como hormonas	39
Cuadro 10.	Número de yemas de agapanto que reaccionaron al usar ANA y BA como hormonas	40

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	El agapanto (<i>Agapanthus umbellatus</i>) se utiliza como planta de jardín, en decoración de interiores, y su inflorescencia se utiliza como flor de corte.....	13
Fig. 2	La planta de izote (<i>Yucca elephantipes</i>) es usada como planta ornamental de exportación, sirve para hacer barreras vivas y su flor es fuente de alimento	14
Fig. 3	El liriopé (<i>Liriope muscari</i>) es usado como planta de cobertura. Su ventaja principal es su adaptación a condiciones climáticas y edáficas adversas	15
Fig. 4	Callo de izote al momento que inicia a oxidarse en la parte basal. Se originó de una yema madura, en medio MS modificado suplementado con 1 mg/L de KIN y de ANA	29
Fig. 5	Callo de izote con formación de brote después de 2 semanas de cultivado en MS modificado con 1.0 y 0.5 mg/L de ANA y BA respectivamente	30
Fig. 6	Efecto de la aplicación de ANA y BA en yemas de liriopé	35
Fig. 7	Plántula de liriopé obtenida en medio de MS, suplementada con 0.5 mg/L de ANA, 5 semanas después de ser sembradas	36
Fig. 8	Efecto de la aplicación de 2,4-D y KIN en yemas de liriopé	37
Fig. 9	Brote con raíces formados a partir de una yema de liriopé en MS modificado, suplementado con 2.0 y 0.5 mg/L de 2,4-D y KIN respectivamente	38
Fig. 10	Plántula de agapanto con buena formación de raíces, con pelos radicales, 7 semanas después de sembradas y un subcultivo en medio sólido MS modificado, suplementado con 1.0 mg/L de ANA y KIN	42
Fig. 11	Efecto de la aplicación de ANA y KIN en yemas de agapanto ...	43
Fig. 12	Efecto de la aplicación de ANA y BA en yemas de agapanto	44
Fig. 13	Yema de agapanto diferenciándose en brote una semana después de la siembra, al suplementar el medio MS con 0.5 y 1.0 mg/L de BA y ANA respectivamente	45

COMPENDIO

La micropropagación es la producción masiva de plantas, usando técnicas de cultivos de tejidos *in vitro*, en especies con problemas para reproducirse, multiplicación de variedades con pocos individuos, etc. La micropropagación consiste en cuatro pasos, que son: 1) establecimiento aséptico del cultivo; 2) multiplicación de propágulos; y 3) enraizamiento de los brotes, 4) aclimatación.

Se trabajó con liriopé, izote y agapanto. Las primeras dos tienen importancia como plantas ornamentales de follaje y agapanto como flor de corte y planta de jardín.

La investigación tuvo como objeto determinar cuál era el mejor medio de cultivo para cada especie. Como medio de cultivo se utilizaron las sales de Murashige y Skoog (1962), al 50% de concentración, suplementadas con compuestos orgánicos y hormonas. Las hormonas que se usaron a diferentes dosis fueron las auxinas ácido 2,4 dicloro fenoxiacético (2,4-D) y ácido naftaleno acético (ANA), las citocininas, kinetina (KIN) y bencil adenina (BA). La investigación se orientó hacia la desinfección del material vegetal y al balance hormonal.

Para evitar la contaminación en el laboratorio, se hizo un tratamiento de fungicidas y bactericidas a las plantas donadoras de explantes; se usó medio líquido y desinfección de yemas con etanol, hipoclorito de calcio y de sodio. Los explantes utilizados fueron las yemas maduras de las plantas en estudio.

Para izote se observaron altos porcentajes de contaminación y oxidación, muy poca reacción en los explantes. Los resultados muestran que debe seguirse estudiando la interacción de ANA y BA.

Para liriopé, la contaminación se redujo de 98% a 28% con el uso de la desinfección descrita. La oxidación fue uno de los factores importantes después de la contaminación. De las hormonas usadas se observó que la combinación ANA y BA fue mejor que 2,4-D con KIN.

En agapanto se observó que la contaminación limitó la respuesta de los explantes al medio, pero se superó al usar plantas con el tratamiento fungicida y la desinfección de los explantes. Con relación a la combinación de hormonas a la que los explantes respondieron mejor fue a la de ANA con KIN.

BIBLIOTECA WILSON POPENO
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 95
TEGUIGALPA HONDURAS

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE TRES ESPECIES ORNAMENTALES MONOCOTILEDONEAS

I. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de cultivos de tejidos cada día aumentan su importancia en la reproducción asexual de plantas, debido a que con ellas se pueden propagar grandes cantidades de plantas con características uniformes y de alta calidad. Esto tiene singular importancia cuando son plantas ornamentales, como en las orquídeas en las que se dificulta o es muy lento el proceso de reproducción, ya sea sexual o asexual, se justifica económicamente el uso de estas técnicas de reproducción.

Según Villalobos (1984), la aplicación comercial más común de las técnicas de cultivos de tejidos en las plantas ornamentales es la multiplicación clonal. A ésta se suman los métodos de eliminación de virus y enfermedades de estas plantas.

Esta tecnología no está limitada por las condiciones climáticas que son óptimas para el desarrollo de las plantas, es decir que se pueden producir plantas de clima templado en condiciones del trópico, donde es más barata la mano de obra, y que puede representar una ventaja económica en la producción de plantas comparada con los países desarrollados (Nichols y Christie, 1987).

En este estudio se utilizaron tres especies, todas de importancia ornamental con potencial de exportación y consumo a nivel nacional, estas son: *Liriope muscari* (liriope), *Yucca elephantipes* (izote) y *Agapanthus umbellatus* (agapanto). Liriope es usado como cultivo de cobertura en las zonas del sur de EUA, en donde cada planta tiene un valor de US.\$ 2.80 (Díaz, 1993), lo que confirma la aceptación de la planta por el público.

Según Guevara (1991), el izote es una planta que anteriormente se había utilizado como barrera para evitar la erosión del suelo y como una fuente de alimento sobre todo en países del área centroamericana, pero actualmente se utiliza también como planta ornamental de exportación. El agapanto usado en el estudio es una variante que se siembra en la regiones montañosas aledañas a Tegucigalpa (La Tigra), que tiene como característica especial un juego de corola doble, lo que hace que se vea muy atractiva para el mercado de exportacion como flor de corte, además que el tiempo de duración en florero es mayor comparada con la común, lo que constituye una ventaja para la exportación a mercados distantes (Himpsle, 1992)¹. La información limitada sobre la propagación *in vitro* de estas tres especies en nuestro medio y la importancia económica de éstas como una fuente de divisas para nuestros países, son factores que han impulsado en gran manera a hacer el estudio.

El objetivo principal del estudio fue determinar el mejor medio de cultivo con la adecuada combinación de auxinas y citocininas, en la micropropagación *in vitro* de *Agapanthus umbellatus*, *Liriope muscari* y *Yucca elephantipes*.

¹. Himpsle, M. 1992 Comunicación personal. Asesor del Centro Nacional de Floricultura (CENAFHOR), Instituto de Formación Profesional (INFOP), Tegucigalpa, Honduras.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Micropropagación y Cultivos de Tejidos

Las técnicas de cultivos de tejidos se pueden definir como la producción de plantas *in vitro* a partir de células, tejidos u órganos (explantes). Basándose en la totipotencia de las células de las plantas y proveyéndoles el ambiente físico y químico adecuados bajo condiciones de asepsia, se formarán plantas completas (Nichols y Christie, 1987; Roca y Mroginski, 1991).

Según Giles (1985), la micropropagación es la multiplicación estéril de plantas en un medio de cultivo definido, que contenga los nutrimentos y reguladores de crecimiento capaces de promover el desarrollo y crecimiento satisfactorios en las plantas. A este concepto, Krikorian (1991), agrega que cada una de las plántulas que se obtenga, pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta de la que se deriva.

Villalobos y Thorpe (1991), enfatizan que la micropropagación es una parte de las técnicas de cultivos de tejidos, y consiste en la multiplicación masiva de plantas *in vitro*, a partir de yemas, meristemas y otras partes jóvenes de las plantas.

Actualmente la micropropagación se practica con gran éxito en especies ornamentales (Villalobos, 1984), y otras especies en las que han mostrado importantes ventajas comparadas con los sistemas convencionales de propagación. Las más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas de un genotipo determinado.

- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables, cuando el sistema se establece.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras y cuarentenarias.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos (Villalobos y Thorpe, 1991).
- Conservación de germoplasma *in vitro*.

Para que la micropropagación sea más eficaz, y se puedan obtener plantas con las características deseadas, deben seleccionarse plantas fuertes y sanas; por que si son débiles y enfermas, las que de ellas se deriven tendrán estas mismas características. Por lo anterior, no se puede considerar a la micropropagación como una fase de rehabilitación para esta clase de materiales (Giles, 1985). Lastimosamente, no siempre es cierto, ya que puede ser que la especie a micropropagar, se encuentre en peligro de extinción.

1. Pasos en la Micropropagación

La micropropagación, según lo propone Murashige (1974), para que sea eficiente consiste en tres pasos: 1) establecimiento aséptico del cultivo; 2) multiplicación de propágulos; 3) enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante; y 4)

aclimatación.

Debergh y Maene (1981), opinan que este esquema es usado por investigadores y productores a nivel comercial cuando usan técnicas de micropropagación, y recomiendan que algunas fases deben modificarse para uso comercial.

a. Fase 1. Establecimiento Aséptico del Cultivo

Una vez seleccionado el mejor explante (parte de un tejido u órgano que se aísla de una planta con fines de cultivo), se debe desinfectar superficialmente: el medio de cultivo, por su alto contenido en carbohidratos, favorece el crecimiento de microorganismos, principalmente hongos y bacterias, que pueden competir ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se utilizan soluciones de diversos compuestos como hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, alcohol y otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por el tipo de explante. Al usar partes de inflorescencias como explante en liriope, Frett y Dirr (1983), determinaron que usando 0.5% de hipoclorito de sodio por 20 minutos se logra una buena desinfección. En la práctica los tiempos de exposición, desinfectantes y dosis, se determinan experimentalmente por ensayo y error (Villalobos y Thorpe, 1991). Al respecto, Debergh y Maene (1981), dicen que no es suficiente tener un medio para la fase 1, en la que se induce la primera reacción al explante, sino que para muchas especies es más importante evitar la contaminación desde antes que se obtengan los explantes de las plantas donantes, propagándolas bajo condiciones controladas, lo que asegura que se tendrán explantes

sanos y que reaccionarán de forma uniforme.

b. Fase 2. Multiplicación de Propágulos

Bhojwani y Razdan (1983), opinan que esta es la fase en la que más problemas se presentan.

En esta fase, el explante puede formar callos dependiendo de las condiciones de cultivo. Varios autores (Villalobos y Thorpe, 1991; Debergh y Maene, 1981; y Bhojwani y Razdan, 1983), están de acuerdo en que se debe evitar la formación de callos cuando se tienen fines de micropropagación, debido a que las plantas que de ellos se deriven, tendrán diferentes grados de variación, la que puede ser de origen genético o epigenético. Según Krikorian (1991), ésto puede considerarse una ventaja, ya que puede ser una fuente de variación en las plantas, pero no es así, cuando el objetivo es la micropropagación de plantas. Dice además (Krikorian, 1991), que podrían existir uno o varios mecanismos que produzcan variación. Entre los que se pueden señalar: la segregación de ciertos tipos celulares presentes en el explante primario, las mutaciones o cambios ocasionados por el medio de cultivo, las presiones de selección, los reordenamientos cromosómicos y otras modificaciones del cariotipo, y las interacciones nucleo-citoplasma.

c. Fase 3. Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante y aclimatación

El proceso de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* se puede hacer de dos maneras según Giles (1985), Debergh y Maene (1981) y, Bhojwani y Razdan (1983):

(1). Los brotes se transfieren a un medio rico en auxinas, por ejemplo en *Dracaena*, la concentración de AIA aumenta de 3 a 10 mg/L de la fase 2 a la 3. Además de tener menor concentración de citocininas (incluso en algunas especies se eliminan), se reducen las sales (MS al 50% de concentración), diluyéndolas se obtienen buenos resultados (Villalobos y Thorpe, 1991). Esto inducirá la formación de raíces *in vitro*, las que serán morfológicamente diferentes a las que se forman normalmente, ya que tienden a ser quebradizas y al trasplantarse al suelo la planta forma otras. Las formadas *in vitro* terminan muriendo antes que los brotes comiencen a crecer en forma extensiva. Este retraso en el establecimiento de las plantas, según Debergh y Maene (1981), representan el 35% de los costos de la producción de las plantas que se producen *in vitro*, por lo que es costoso para un viverista, y se puede evitar promoviendo el enraizamiento en una mezcla adecuada de medio de crecimiento en el vivero, en las especies que lo permitan (Debergh y Maene, 1981; Giles, 1985).

(2). Si los brotes micropropagados son tratados como microcortes y se ponen en un medio artificial adecuado, que al mantenerse con alta humedad de manera que no se deshidraten las hojas, las raíces se formarán naturalmente en dos o tres semanas. Este tipo de raíces según Giles (1985), son fisiológicamente normales comparadas con aquellas

que se formaron durante el proceso de micropropagación *in vitro*. Al usar este tipo de enraizamiento se tendrá como resultado menor atraso al poner los brotes a enraizar. En algunas especies se requiere que la base de los brotes se trate con auxinas en polvo o pastas (Hormodine, Rootone, etc.), para inducir el desarrollo radical. En este caso el procedimiento es más sencillo, y se hace fuera de las condiciones estériles con que se manejan *in vitro* y el costo es menor. Este método no está del todo desarrollado, por que aún no se adecua a varias especies de importancia (Giles, 1985; Debergh y Maene, 1981).

B. Agapanto

1. Descripción Taxonómica, Morfológica y Origen

El agapanto, conocido también como lirio africano azul o lirio del Nilo, pertenece al género *Agapanthus*. Según Graf (1978), es de la familia de las liliáceas, aunque Purselove (1972), lo clasifica dentro de la familia Alliaceae. Las aliáceas, son una familia intermedia entre las amarilidáceas y las aliáceas por que tienen flores con ovario súpero, que es característico en las liliáceas, y las flores nacen en una umbela al final de un escapo, que es característico en las amarilidáceas. En cuanto a la especie, existe discusión, ya que Sganzerla (1973), la clasifica como *Agapanthus umbellatus* y Graf (1978), como *Agapanthus africanus*, aunque Warren (1988), dice que son la misma

especie.

Sganzerla (1973), Warren (1988) y Purseglove (1972), están de acuerdo en que es originaria de Africa del Sur.

La planta es herbácea, con tallos que pueden medir entre 60 y 90 cm, con hojas perennes de un verde brillante. Su inflorescencia tiene un ancho que varía entre 2.5 a 10 cm. Las flores tienen corola en forma de embudo, y pueden ser de color blanco, azul y rosa (Sganzerla, 1973; Warren, 1988).

2. Propagación y Condiciones de Cultivo

El medio primario de propagación es por división de raíces, aunque en la Universidad de Humboldt Alemania (1993)² se ha trabajado en micropropagación, utilizando las yemas maduras de las bulbos, obteniéndose resultados prometedores. Requiere de suelos ligeros con buena cantidad de humus para su cultivo. Además, necesita riegos frecuentes, pero sin mantenerlas todo el tiempo húmedas. Esto se debe a que las raíces fibrosas están expuestas a pudriciones, o en caso contrario a quemarse por la falta de agua. Las condiciones adecuadas de temperatura para este cultivo son de 10 a 13°C por la noche, y de 18 a 21°C o más en días soleados. Puede mantenerse bajo condiciones de baja humedad relativa (Graf, 1978).

². Universidad de Humboldt, Alemania. 1993. Comunicación personal escrita.

3. Usos

Las inflorescencias de agapanto se pueden usar como flor de corte (Warren, 1988), en la decoración de interiores (Sganzerla, 1973; Graf, 1978) y como planta de jardín (Fig.1).

C. Izote

1. Descripción Taxonómica, Morfológica y Origen

Se les conoce también con los nombres de bayoneta española y palmas, pertenece al género *Yucca*, que según Weberling y Schwantes (1981), es de la familia Agavaceae.

El izote es la especie *Yucca elephantipes*, originaria de América del Norte, como el resto de especies pertenecientes a este género (Purseglove, 1972).

Son plantas característicamente xerofíticas, con hojas suculentas en forma de cuchillos. Las flores están en una panícula, son de color blanco, se abren durante la noche y se polinizan por polillas del género *Pronuba*. En su centro de origen, el izote produce semillas gracias a la presencia de este insecto, asegurando así su reproducción (Purseglove, 1972).

2. Propagación y Condiciones de Cultivo

Hartmann y Kester (1975), afirman que el izote puede sembrarse por semillas, a temperaturas que estén alrededor de los 20°C, pero la velocidad de crecimiento es muy lenta y se requieren cinco años para que la planta llegue a floración. Se pueden propagar

de forma asexual mediante la siembra de los brotes que salen de las yemas axilares del tallo, y por estacas. La especie *Y. gloriosa*, Durmishidze *et al.* (1983), lograron propagarla mediante cultivos de tejidos usando las yemas como explantes, medio de MSIV suplementado con 2,4-D y bajo condiciones de oscuridad hasta realizar el trasplante a los 45 días.

3. Usos

El izote, se utiliza como barrera viva para evitar la erosión del suelo y las flores como fuente de alimento (Guevara 1991); y últimamente se ha convertido en ornamental (Fig. 2) de exportación (Guevara, 1991; Hartmann y Kester, 1975).

C. Liriope

1. Descripción Taxonómica, Morfología y Origen

El liriope, *Liriope muscari* (Decne) Bailey, pertenece a la familia Liliaceae (Graf, 1978; Benson, 1959). Tiene flores color lila a púrpura, el fruto se origina en largos racimos, las semillas son esféricas y el embrión está rodeado por un endosperma abundante y duro. Tiene follaje denso y lustroso, con hojas angostas (1 cm), y varían entre los 10 y 15 cm de longitud, erectas y con una curvatura no muy pronunciada (Fagan y Dirr, 1982). El liriope, es una planta originaria de Japón y China (Graf, 1978).

2. Propagación y Condiciones de Cultivo

El liriopé es una especie que se puede adaptar con facilidad a gran diversidad de suelos. Su popularidad en las zonas costeras, se debe a la tolerancia que tiene a suelos salinos (Fagan y Dirr, 1982).

Con lo relacionado a las condiciones ideales de cultivo, Graf (1978), dice que necesita temperaturas nocturnas de 10-13°C y diurnas que varíen entre los 18 y 21°C.

Para suplir los requerimientos de agua en liriopé, Graf (1978) y Adams (citado por Díaz, 1993), están de acuerdo en que hay mejor crecimiento, cuando el suelo está uniformemente húmedo, pero no debe estar constantemente saturado, por que puede provocar pudrición de raíces.

El liriopé se puede propagar por división de matas (Graf, 1978), por semillas (Fagan y Dirr, 1982). Además Frett y Dirr (1983), obtuvieron algunas plantas al usar técnicas de cultivos de tejidos, utilizando la inflorescencia como explante, en un medio modificado de MS, suplementado con 2,4-D y BA.

3. Usos

El liriopé es comúnmente utilizado como una planta ornamental de cobertura (Fig. 3) en donde hay problemas de sequía, fertilidad e iluminación (Fagan y Dirr, 1982; Díaz, 1993; y Graf, 1978).



Fig. 1 El agapanto (*Agapanthus umbellatus*) se utiliza como planta de jardín, en decoración de interiores, y su inflorescencia se utiliza como flor de corte.



Fig. 2 La planta de izote (*Yucca elephantipes*) es usada como planta ornamental de exportación, sirve para hacer barreras vivas y su flor es fuente de alimento.



Fig. 3 El liriope (*Liriope muscari*) es usado como planta de cobertura. Su ventaja principal es su adaptación a condiciones climáticas y edáficas adversas.

III. MATERIALES Y METODOS

A. Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras.

B. Material Vegetal

Se utilizaron plantas de agapanto (*Agapanthus umbellatus*), liriopé (*Liriope muscari*) e izote (*Yucca elephantipes*). Para izote, los explantes se obtuvieron aislando las yemas axilares basales, mientras en agapanto y liriopé, se obtuvieron de los nudos de los tallos. Las yemas se aislaron con una porción pequeña de tejido circundante, para llevar a cabo la desinfección.

Las plantas donadoras de explantes, crecieron bajo condiciones controladas de luz (30% de sombra) en una estructura sombreada. En las primeras fases del estudio, se aplicó fertilizante foliar una vez al mes. Después de hacer algunos cultivos en el laboratorio, se notó que los explantes tenían bacterias y hongos sistémicos, por lo que se comenzó un tratamiento semanal al follaje de las plantas con 2 g/L de sulfato de estreptomicina (Agri-mycin^R 500), y 1 g/L de benomil 500 (Benlate^R).

C. Desinfección

Después de lavar las plantas con agua y jabón, se disecaban las yemas del tallo de la planta donadora y se ponían en agua bidestilada. Se hizo una serie de experimentos relacionados con la desinfección de las tres especies como se muestra en el Cuadro 1, se comparó el efecto de los medios líquidos con medios solidificados con agar.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfectantes utilizados, con sus diferentes concentraciones y tiempo de exposición.

Tratami en-to.	Etanol		Hipoclorito de Na		Hipoclorito de CA	
	%	Tiempo	%	Tiempo	%	Tiempo
1	95	15 seg	0.5	15 min	-	--
2	70	15 seg	0.5	10 min	0.5	10 min
3	70	20 seg	1.5	15 min	1.0	15 min
4	70	15 seg	1.5	20 min	2.0	20 min
5	70	15 seg	1.0	15 min	1.0	15 min

Las yemas se introdujeron en una bolsa pequeña hecha con gasa para evitar que se dispersaran en las soluciones, y de esta manera uniformar el tiempo de exposición. Las concentraciones y tiempo de exposición de las yemas a las soluciones desinfectantes para cada una de las especies se muestran en el Cuadro 1.

Las yemas, de las tres especies, se introdujeron en etanol con el objeto de disolver la cera que las recubría. Después de esa inmersión, se colocaron en las soluciones de hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio, respectivamente. Además, se

agregaron una o dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución clorada, como dispersante y detergente.

Para efectuar una buena desinfección en todas las soluciones, se mantuvieron en constante movimiento en un agitador magnético. Después de la desinfección, y en la cámara de flujo laminar, el material se enjuagó tres veces con agua bidestilada estéril, para eliminar los residuos de los desinfectantes en los explantes. La cámara de flujo laminar, se ponía a funcionar 30 minutos antes de usarla, y se desinfectaba con alcohol inmediatamente antes de comenzar los enjuagues.

D. Medios de Cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para las tres especies fueron las sales de Murashige y Skoog (1962) MS al 50% de concentración, suplementado con hormonas y otras sustancias orgánicas. La composición del medio de cultivo se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición del medio básico de Murashige y Skoog (1962) modificado, usado en la micropropagación *in vitro* de liriopé, izote y agapanto.

Macroelementos	mg/L
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
Microelementos	mg/L
KI	0,415
H ₃ BO ₃	3,1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	11,15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,3
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0125
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0125
EDTA FeNa	18,75
Inositol	50,0
Tiamina	0,2
Sulfato de adenina	80,0
Extracto de malta	250,0
Sacarosa	30000,0
pH	5,7

1. Hormonas

Se usaron dos auxinas y dos citocininas. Las auxinas fueron el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA); y las citocininas, kinetina (KIN) y bencil adenina (BA). Todas estas hormonas se utilizaron para izote y liriopé, pero para agapanto no se utilizó la auxina 2,4-D. Las dosis y combinaciones de

reguladores de crecimiento para los experimentos se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento usadas en los experimentos para la micropropagación *in vitro* de liriopé, izote y agapanto.

Citocininas (mg/L)	Auxinas (mg/L)				
	0	0,1	0,5	1,0	2,0
0	0;0	0;0,1	0;0,5	0;1,0	0;2,0
0.5	0,5;0	0,5;0,1	0,5;0,5	0,5;1,0	0,5;2,0
1.0	1,0;0	1,0;0,1	1,0;0,5	1,0;1,0	1,0;2,0
2.0	2,0;0	2,0;0,1	2,0;0,5	2,0;1,0	2,0;2,0

2. Preparación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo se preparó de manera similar a la que describe Montalván (1992), con la diferencia de que el medio de cultivo se ajustó a pH 5.7. Al principio se utilizó Bactoagar^R como agente gelatinizante a razón de 8 g/L, pero debido a los altos índices de contaminación que se observaron, se utilizaron puentes de papel filtro sin cenizas, con el objeto de ayudar a evitar la contaminación de los explantes. Se identificó cada uno de los tubos de ensayo (18 x 150 mm) de acuerdo con los tratamientos y se les puso seis ml de medio de cultivo con la ayuda de una jeringa automática y una cánula.

3. Esterilización

El medio de cultivo se esterilizó en un autoclave automático 1.06 kg de presión por cm² y 120°C durante 20 minutos. Posteriormente, se guardaba en un refrigerador

a 4°C de temperatura hasta el momento de su utilización.

E. Obtención de Explantes

Los explantes esterilizados, se disecaron en la cámara de flujo laminar. Este proceso se llevó a cabo con la ayuda de pinzas, agujas hipodérmicas, bisturíes y un estereoscopio, desinfectados previamente con alcohol.

Las disecciones se realizaron en platos de Petri estériles y que tenían un disco de papel filtro que ayuda en la absorción del exceso de humedad superficial del explante. Cada plato de Petri se utilizaba por 15 minutos aproximadamente. Después de disecar cada explante, se colocaba en un tubo de ensayo que se tapaba con tapas de plástico, que a su vez se sellaban con Parafilm^R.

F. Condiciones Ambientales

Después de poner las yemas en los tubos de ensayo, para observar la respuesta de éstos al medio, se mantuvieron en una cámara de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de $54 \text{ micromol/m}^2/\text{s}^{-1}$.

G. Metodología

El estudio de las interacciones de reguladores de crecimiento se hizo en una serie de experimentos, en los que se usó el mismo medio de cultivo y se estudió la reacción de los explantes. Debido a la limitada cantidad de material de agapanto en determinado momento, o los altos porcentajes de contaminación, la investigación se encaminó hacia las combinaciones de hormonas que mostraron resultados positivos. Además, sólo se hicieron 5 repeticiones por tratamiento o interacción de hormonas, considerando a cada tubo de ensayo como una repetición. A continuación, se muestra como se procedió con cada especie estudiada.

1. Izote

a. Experimento 1

En este experimento se trató de evaluar el efecto del ANA y KIN en las yemas basales y distales de *Yucca elephantipes* en un medio de cultivo de MS modificado.

Se utilizó el medio MS (Cuadro 2), suplementado con 0.8% de agar, la auxina ANA y la citocinina KIN, según las dosis establecidas en el Cuadro 3. Este experimento se repitió, con la modificación de que se usó medio líquido con puentes de papel filtro sin cenizas en lugar de agar. Esta modificación se hizo por el alto grado de contaminación que se presentó en el primer experimento hecho en agar.

b. Experimento 2

Efecto del uso del medio MS modificado con ANA y BA en las yemas axilares basales de *Yucca elephantipes* .

Se utilizó el medio MS suplementado con la auxina ANA y la citocinina BA, con las dosis presentadas en el Cuadro 3. Este experimento, también se modificó y repitió, por las razones mencionadas en el Experimento 2.

c. Experimento 3

Efecto del medio de MS modificado con 2,4-D y KIN yemas axilares basales de *Y. elephantipes*.

En este experimento se trató de evaluar el efecto del medio MS suplementado con la auxina 2,4-D y la citocinina KIN, con las dosis que se mostraron en el Cuadro 3. En este experimento se utilizó medio líquido solamente.

d. Experimento 4

Efecto del medio MS modificado con 2,4-D y BA en yemas axilares basales de *Y. elephantipes* .

Al igual que en el Experimento 3, se trató de evaluar el efecto del medio MS suplementado con las dosis de hormonas según el Cuadro 4 sobre las yemas axilares.

2. Liriope

a. Experimento 1

Efecto del medio MS modificado con ANA y KIN en vainas de hojas y yemas de *L. muscari*

En este experimento se observaron los efectos que tuvo el medio de cultivo suplementado con ambos reguladores de crecimiento, con las dosis de hormonas según el Cuadro 4, sobre las vainas de hojas. Al contaminarse casi totalmente el experimento se repitió con medio líquido, haciendo uso de yemas axilares.

b. Experimentos 2, 3 y 4

Efecto del medio MS líquido suplementado con hormonas (Cuadro 4), sobre yemas de *L. muscari* basándose en las dosis mostradas en el Cuadro 3.

Cuadro 4. Combinación de hormonas utilizada en los Experimentos 2, 3 y 4 en la micropropagación *in vitro* de *L. muscari*.

EXPERIMENTO #	AUXINA	CITOCININA
2	ANA	KIN
3	2,4-D	BA
4	2,4-D	KIN

En cada uno de los tratamientos que formaba callogénesis o morfogénesis, se transferían a medio fresco con las mismas características cada cinco semanas, eliminándoles las partes oxidadas y dividiéndolos cuando se podía.

3. Agapanto

a. Experimento 1

Efecto del medio MS modificado con ANA y KIN sobre yemas axilares basales de *Agapanthus umbellatus*.

En este experimento se observó el efecto que causaban las dosis de hormonas (Cuadro 4), sobre las yemas maduras de Agapanto. Este experimento, como los otros, también se repitió en medio líquido.

b. Experimento 2

Efecto del medio MS modificado con ANA y BA sobre las yemas axilares basales de *A. umbellatus*

Este experimento se hizo en medio líquido, observando el comportamiento de los explantes en el medio con las diferentes dosis de hormonas (Cuadro 4).

H. Análisis de Resultados

El estudio se realizó usando las combinaciones de los reguladores de crecimiento organizados en un diseño factorial, (4 * 5) en el que uno de los factores fueron las citocininas y el otro las auxinas. Se utilizaron cuatro dosis de citocininas y cinco de auxinas; así se obtuvo 20 combinaciones o tratamientos. Esta serie de tratamientos permitió estudiar el efecto de las auxinas y citocininas por separado y sus combinaciones (Cuadro 4). El estudio se orientó hacia las combinaciones de hormonas y a la

desinfección del material vegetal. La variable que se midió fue la reacción o no de los explantes (callo, brote, raíz, etc.).

IV. RESULTADOS

A. Desinfección

De los experimentos hechos para determinar cuáles fueron los tratamientos de desinfección más adecuados para las tres especies, se determinó que fueron los que se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos desinfectantes usados con sus diferentes concentraciones y tiempo de exposición que fueron los más adecuados para cada especie.

Especie	Etanol		Hipoclorito de calcio		Hipoclorito de sodio	
	%	Tiempo min.	%	Tiempo min.	%	Tiempo min.
Liriope	70	15	1.0	15	1.0	15
Izote	70	20	1.5	15	1.0	15
Agapanto	70	15	2.0	20	1.5	20

B. Izote

Experimento 1.

Al evaluar el efecto que tuvo la combinación de ANA con KIN en medio de MS solidificado con agar sobre las yemas de izote, hubo 57% de contaminación y el resto no reaccionó. En ninguna de las yemas se notó crecimiento, y tomaron una coloración blanquecina, con el centro color negro, por lo que se evaluaron como yemas muertas.

Al cambiar el medio sólido por líquido, tratar las plantas donadoras con plaguicidas y usar el método desarrollado para desinfectar los explantes (Cuadro 5), se redujo la contaminación a 12%, pero sólo el 6% de los explantes cultivados reaccionó al medio, el porcentaje restante tuvo las mismas características que las del experimento solidificado con agar. En los explantes que reaccionaron, se notó que sólo las yemas maduras reaccionaron formando callo (Fig. 4).

Experimento 2

Al evaluar el efecto de la combinación de ANA con BA en el medio de MS solidificado con agar sobre las yemas axilares, hubo 60% de contaminación y el resto no mostró ninguna reacción. Las yemas que no se contaminaron se comportaron de manera similar que en el Experimento 1.

Al usar el medio líquido, el 73% de los explantes murió, hubo 15% de contaminación y el porcentaje restante formó callo, sin embargo, estos resultados muestran que 0.5 mg/L de BA y 1,0-2.0 mg/L de ANA pueden ayudar al desarrollo de callo y quizás de brotes (Cuadro 6; Fig. 5).



Fig. 4 Callo de izote al momento que inicia a oxidarse en la parte basal. Se originó de una yema madura, en medio MS modificado suplementado con 1 mg/L de KIN y de ANA.



Fig. 5 Callo de izote con formación de brote después de 2 semanas de cultivo en MS modificado con 1.0 y 0.5 mg/L de ANA y BA respectivamente.

Cuadro 6. Número de yemas de izote que reaccionaron al usar ANA y BA, como hormonas.

BA (mg/L)	ANA (mg/L)					TOTAL
	0	0,1	0,5	1,0	2,0	
0	0	0	1	0	0	1
0,5	1	1	0	2	2	6
1,0	0	0	1	1	0	2
2,0	0	0	1	1	1	3
TOTAL	1	1	3	4	3	

Experimento 3

El efecto del medio con la combinación de 2,4-D y KIN en medio líquido de MS en las yemas de izote, se contaminaron el 16%, el resto no mostró ningún efecto del medio sobre las yemas. Estas yemas se mantuvieron de color blanco y no mostraron ningún indicio de desarrollo por tres meses.

Experimento 4

El efecto de la combinación de 2,4-D con BA en medio sólido sobre las yemas maduras de *Y. elephantipes*, resultó en 54% de contaminación, y las del 46% restante murieron. Con esta combinación de hormonas al cambiar a medio líquido, los explantes murieron. Las yemas tomaron una coloración café oscuro, que se consideró como oxidación. El 10% de las yemas se contaminó.

C. Liriope

Experimento 1

Al utilizar la combinación de ANA con KIN en medio sólido de MS, usando las vainas de hojas y yemas de *L. muscari*, se contaminaron el 74%, y el resto no reaccionó. Al cambiar a líquido hubo 65% de muerte por oxidación. Al oxidarse, las yemas comenzaban poniéndose de color negro en la base; después, aunque se transfirieran y se les quitara la parte oxidada el proceso de oxidación continuaba. El 28% de las yemas se contaminó y el 7% restante formó callos de apariencia friable, color verde claro. Con las yemas que reaccionaron, se notó que la aplicación de ANA no es necesaria, ya que respondieron a las combinaciones donde no se había agregado la auxina. También, se observó que la KIN favorece el desarrollo de las yemas, ya que no hubo respuesta cuando estuvo ausente en el medio. Lastimosamente, no se vio la reacción de los explantes cuando estaban ausentes las hormonas.

Experimento 2

Al evaluar el efecto de la combinación de ANA con BA en medio MS sólido, sobre las yemas de liriope, se obtuvo 98% de contaminación. El 62% del total fue por hongos. Al tratar las plantas donadoras con plaguicidas, usar medio líquido y la desinfección descrita para los explantes (Cuadro 5), este porcentaje se redujo a 39%. Del porcentaje restante el 59% formó brotes, y 2% no reaccionó al medio (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número de explantes de liriopé que reaccionaron al usar las hormonas ANA y BA.

BA (mg/L)	ANA (mg/L)					Total
	0	0,1	0,5	1,0	2,0	
0	2	4	4	3	2	15
0,5	3	2	4	3	3	15
1,0	2	3	4	3	3	15
2,0	3	1	3	4	3	14
TOTAL	10	10	15	13	11	

De las yemas que reaccionaron, no hubo diferencia en la aplicación de citocininas (Fig. 5). En cambio, la reacción a las auxinas fue diferente, ya que según el número de explantes que reaccionaron resultó mejor la dosis de 0,5 mg/L de ANA, aunque la aplicación de 1,0 mg/L tuvo resultados promisorios comparados con el resto de las dosis utilizadas.

Los explantes que reaccionaron se transfirieron a medio fresco cada cinco semanas, lo que provocó que algunas de las transferencias hechas desarrollaran brotes y raíces o sólo brotes (Fig. 6).

Experimento 3

En este experimento se trató de evaluar el efecto de BA combinado con 2,4-D sobre las yemas de liriopé, en las que el 60% se contaminaron por hongos y 38% por bacterias, el restante 2% no reaccionó.

De los resultados que se presentan en el Cuadro 8, la dosis de 0,1 mg/L de 2,4-D es mejor que las otras, mientras que para la KIN, es 0,5 mg/L. El testigo absoluto también mostró crecimiento de brotes, aunque no es comparable con el mejor de los tratamientos.

Cuadro 8. Número de yemas de liriopé que reaccionaron al usar 2,4-D y KIN como hormonas.

KIN (mg/L)	2,4-D (mg/L)					TOTAL
	0	0,1	0,5	1,0	2,0	
0	1	2	0	2	1	6
0,5	2	4	2	2	3	13
1,0	1	2	1	2	2	8
2,0	1	3	1	2	3	10
TOTAL	5	11	4	8	9	

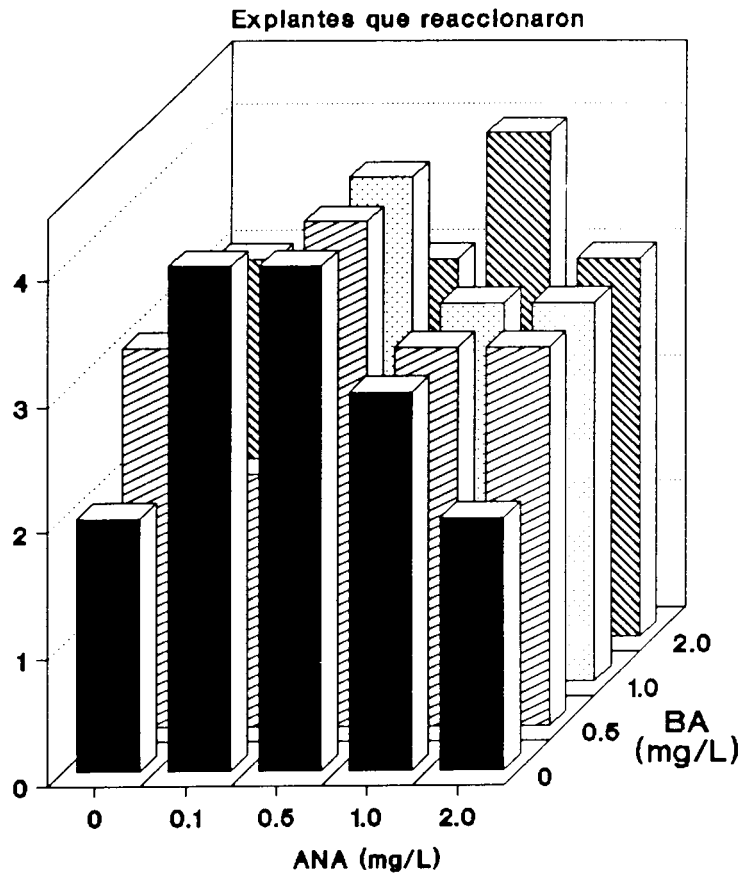


Fig. 6 Efecto de la aplicación de ANA y BA en yemas de liriopé.



Fig. 7 Plántula de liriope obtenida en medio de MS, suplementada con 0.5 mg/L de ANA, 5 semanas después de ser sembradas.

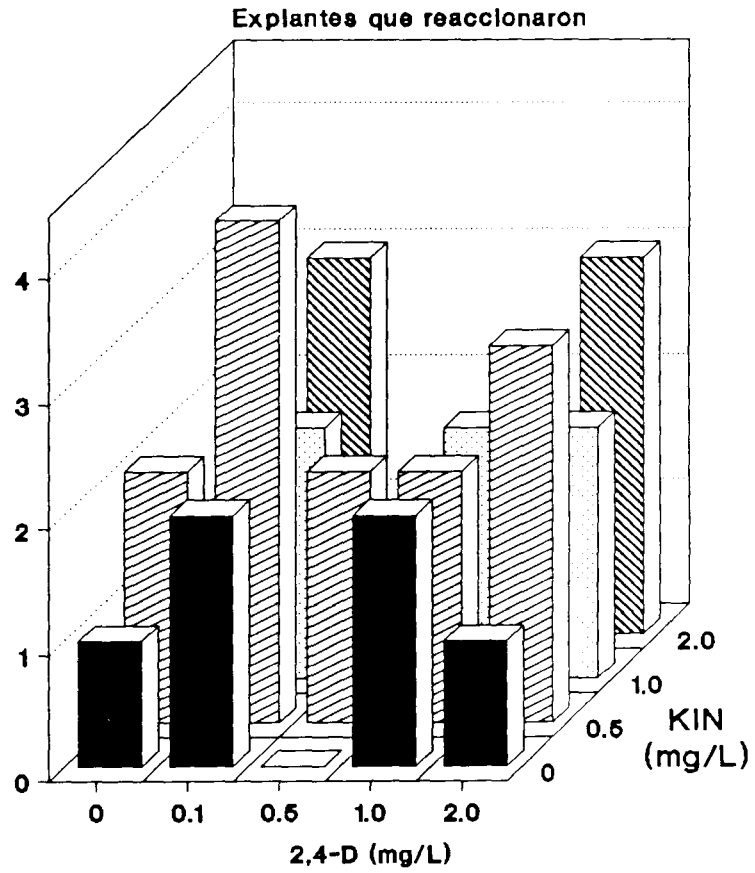


Fig. 8 Efecto de la aplicación de 2,4-D y KIN en yemas de liriopé.



Fig. 9 Brote con raíces formados a partir de una yema de liriopé en MS modificado, suplementado con 2.0 y 0.5 mg/L de 2,4-D y KIN respectivamente.

D. Agapanto**Experimento 1**

En este experimento se evaluó el efecto que tuvo la combinación de ANA y KIN en el medio MS sobre las yemas axilares de agapanto. La contaminación fue de 83%; 7% de las yemas murieron, éstas se ponían de color amarillento, luego morían con una coloración café. El 10% restante, reaccionó de manera satisfactoria. Se observó que la adición de 1,0 mg/L de ANA y de KIN promovieron el desarrollo de plántulas (Fig. 10).

Al cambiar de medio sólido a líquido, se obtuvo 44% de reacción de los explantes (Cuadro 9; Fig. 11), mientras que el porcentaje de contaminación se redujo a 7%. El porcentaje de muertes fue de 49%, los explantes tomaban una coloración amarilla, posteriormente color café claro y esto tenía como consecuencia la muerte de la yema.

Cuadro 9. Número de yemas de agapanto que reaccionaron al usar ANA y KIN como hormonas.

KIN (mg/L)	ANA (mg/L)					TOTAL
	0	0,1	0,5	1,0	2,0	
0	2	3	3	2	2	12
0,5	3	2	1	4	3	13
1,0	1	1	3	2	2	9
2,0	0	2	2	2	4	10
TOTAL	6	8	9	10	11	

Al poner las más altas concentraciones de las hormonas indujeron la formación

de callos con raíces grandes, en tanto que, la combinación de 1,0 y 0,5 mg/L de ANA y KIN respectivamente, indujo la brotación de yemas. La ausencia de KIN, según los resultados es muy parecida y en algunos casos mejor que la aplicación de altas concentraciones, sin embargo, en las yemas con presencia de KIN fue se notaban más verdes y saludables.

Experimento 2

En este experimento se notó el efecto del medio MS con ANA y BA en las yemas axilares de agapanto. Se obtuvo 32% de reacción de las yemas, 57% de muerte y 11% de contaminación. Los resultados de las yemas que reaccionaron se presentan en el Cuadro 10 (Fig. 12).

Cuadro 10. Número de yemas de agapanto que reaccionaron al usar ANA y BA como hormonas.

BA (mg/L)	ANA (mg/L)					TOTAL
	0	0,1	0,5	1,0	2,0	
0	2	3	2	1	0	8
0,5	2	2	1	2	3	10
1,0	3	0	2	2	1	8
2,0	1	0	1	2	2	6
TOTAL	8	5	6	7	6	

Las yemas que reaccionaron al medio lo hicieron de mejor manera cuando se les puso 0,5 mg/L de BA y cualquiera de las dosis de ANA (Fig. 13). También se observó que la dosis más alta de BA produjo un efecto menor que las bajas e intermedias. Asimismo se observó buena respuesta de las yemas al BA sólo.



Fig. 10

Plántula de agapanto con buena formación de raíces, con pelos radicales, 7 semanas después de sembradas y un subcultivo en medio sólido MS modificado, suplementado con 1.0 mg/L de ANA y KIN.

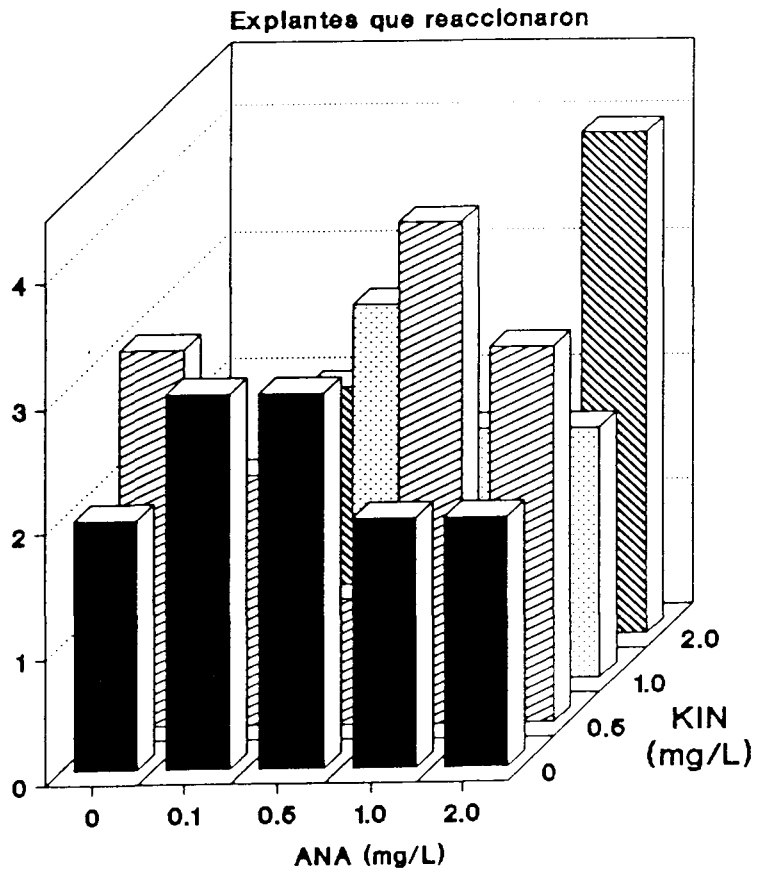


Fig. 11 Efecto de la aplicación de ANA y KIN en yemas de agapanto.

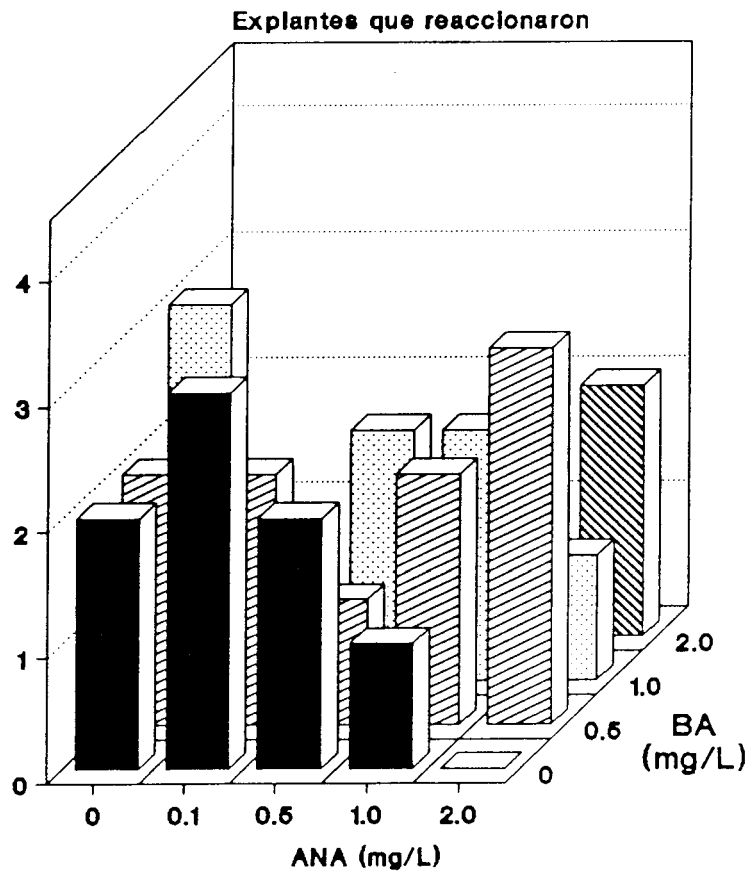


Fig. 12 Efecto de la aplicación de ANA y BA en yemas de agapanto.

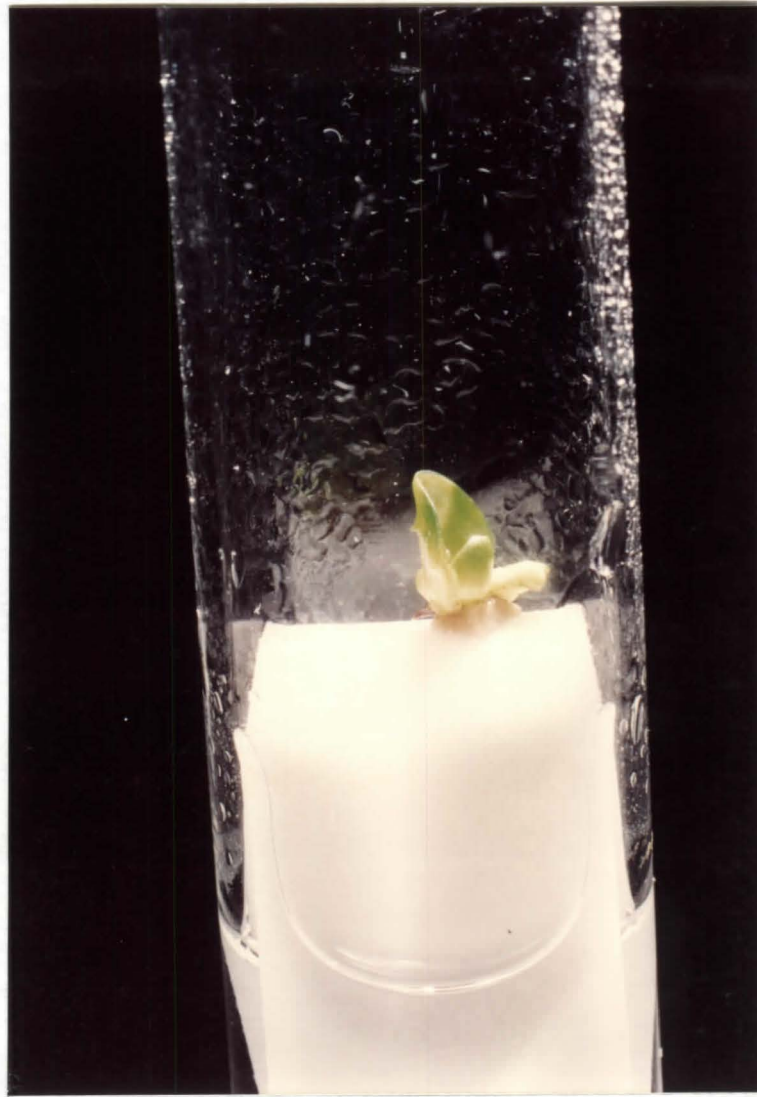


Fig. 13

Yema de agapanto diferenciándose en brote una semana después de la siembra, al suplementar el medio MS con 0.5 y 1.0 mg/L de BA y ANA respectivamente.

V. DISCUSIÓN

A. Contaminación

El problema que más afectó durante el desarrollo de la investigación fue el alto grado de contaminación que hubo en las tres especies. Esta fase fue una de las más difíciles, porque para determinar las dosis y combinaciones de agentes desinfectantes fue necesario hacer varias pruebas (Cuadro 1).

De acuerdo con los resultados que se presentan en el Cuadro 5, y con las observaciones hechas por otros investigadores (Debergh y Maene, 1981; Fajardo y Alán, 1994), la contaminación en cultivos de tejidos, no sólo depende de la esterilización del explante (Roca y Mroginski, 1991), sino que, también, dependen en gran parte del tratamiento a las plantas donadoras.

Con relación al uso de plaguicidas en las plantas donadoras Debergh y Maene (1981), no están de acuerdo, argumentando que en las plantas hay un "equilibrio biológico", es decir, que tienen una microflora similar a la de los animales, en la que el uso de plaguicidas sistémicos podría afectarlo negativamente. A pesar de lo que dicen, la micropropagación de las especies ornamentales en la investigación no se hubiera podido llevar a cabo sin el uso de plaguicidas. Aunque una solución puede ser el tratamiento de las plantas con altas temperaturas (25-40°C), conjuntamente con baja humedad relativa, 70%, (Debergh y Maene, 1981).

Mantener las plantas en un medio estéril, sin suelo, es una alternativa que se puede practicar, de tal manera que las plantas crezcan como lo hacen bajo un sistema

hidropónico.

De acuerdo con los resultados observados, no es suficiente la desinfección que se hace en el laboratorio y el tratamiento a las plantas donadoras con plaguicidas. Es necesario, además, el uso de medios líquidos. Al respecto, Montalván (1992), observó reacción de los explantes al cambiar de medio sólido a líquido, disminuyéndose así los problemas de oxidación, y los problemas de contaminación que se le presentaron fueron menores.

En lo que respecta al desarrollo de hongos fue mayor en los medios sólidos que en los líquidos. Lo anterior se notó, ya que en el medio sólido se desarrollaban en toda la superficie, no así en los líquidos, en los que comenzaban a desarrollarse sobre el papel filtro. Esto probablemente se deba a que los hongos necesitan una superficie de soporte para desarrollarse, la que no puede proveer el medio líquido.

Es necesario mencionar que la parte de la planta de donde se diseque el explante tiene gran influencia en los contaminantes presentes durante la micropropagación. Frett y Dirr (1983), recomiendan el uso del escapo floral como fuente de explantes, ya que aseguran que las partes de las plantas que están en contacto con el suelo, son más propensas a contaminarse que las que se encuentran en la parte superior de la planta. Considerando que el liriope no florece en el trópico, las alternativas de conseguir explantes se limitan a la parte basal de la planta, que está en contacto con el suelo.

B. Izote

En el Experimento 1 (efecto de ANA y KIN), de acuerdo con los resultados observados, se notó la importancia que representa el hecho de usar yemas maduras (basales), comparadas con las que se originaban de las partes superiores de las plantas, ya que la reacción de las basales fue la formación de callo y brotes (Fig. 5), mientras que las provenientes de las partes distales no reaccionaron. Con base en estos resultados, es contradictorio el comportamiento de las yemas más jóvenes, pues varios investigadores están de acuerdo en que a medida que el tejido utilizado como explante sea más joven, reaccionará de mejor manera (Hill, 1988; Holdgate, 1977). Lo anterior puede estar relacionado con las concentraciones de hormonas que tengan las yemas maduras comparadas con las jóvenes, debido al tamaño y desarrollo de éstas, lo cual puede afectar su balance.

Al usar las otras dosis y combinaciones de hormonas (Cuadro 4), hubo un alto porcentaje de muerte, la cual se puede atribuir en gran parte a la falta de algún o algunos cofactores, que ayuden a la morfogénesis en los explantes. Durmishidze *et al.* (1983), dicen que es necesario, no sólo un balance adecuado de hormonas, sino que también deben considerarse factores ambientales como son la oscuridad, la temperatura, la aireación, etc.

La oxidación de los explantes fue otro de los factores que afectó su reacción. Esto se debe a la secreción de sustancias fenólicas por los explantes. La oxidación según Bhojwani y Razdan (1983), y Montalván (1992) se reduce al adicionar ácido cítrico al

medio de cultivo y poner los cultivos en oscuridad por algún tiempo.

Según los resultados obtenidos, las yemas reaccionan al estar presente la auxina ANA al contrario del 2,4-D, que no formó callo. En contraste con lo anterior, Durmishidze *et al.* (1983), al trabajar con *Y. gloriosa*, observaron que hay organogénesis al usar 2,4-D, pero es necesario considerar que utilizó otras condiciones de cultivo como oscuridad, temperatura, luz, etc., bajo las cuales puede variar la reacción del explante al medio de cultivo.

C. Liriope

En esta especie, las yemas reaccionaron de mejor manera que las vainas de hojas. Esto se puede atribuir a que la desinfección las mataba, ya que cuando se hacía una desinfección con concentraciones bajas se contaminaban, en tanto que las yemas soportaban mejor las concentraciones altas. Esto es, posiblemente porque las yemas tienen primordios foliares que las protegen de la acción de los desinfectantes usados (Cuadro 5).

En cuanto al medio de cultivo, se observó en general mejor respuesta de las yemas cuando estaban en medio líquido que en medio sólido.

A pesar de que algunas veces se presenta contaminación y oxidación de los explantes, o ambas, los resultados son promisorios. Los resultados observados, coinciden con los de Frett y Dirr (1983), considerando que los explantes que provienen de partes que están en contacto con el suelo tienden a contaminarse.

Al comparar las auxinas usadas, se observaron mejores resultados con ANA (Fig. 7) que con 2,4-D (Fig. 9). Frett y Dirr (1983), observaron mejor comportamiento con 2,4-D que con IAI. Jerárquicamente, ANA es mejor que 2,4-D y observaron que la última es mejor que IAI. Esto, probablemente, se deba a que ésta es la única auxina natural (Street y Opik, 1976), y las plantas tienen mecanismos que permiten su degradación. Lo anterior debe considerarse para experimentos posteriores y determinar qué auxina promueve una mejor respuesta de las yemas. Con los resultados observados (Cuadro 6), la presencia de ANA, puede ser necesaria para la propagación *in vitro* de liriopé. A pesar de lo anterior, el testigo también reaccionó, y esto puede, probablemente, atribuirse a que en las yemas de liriopé existe el balance hormonal endógeno adecuado para promover la formación de brotes, pero se mejora al incluirse dosis exógenas intermedias de ANA.

D. Agapantho

Al igual que en las otras especies, la contaminación y oxidación tomaron un lugar preponderante en la investigación, y probablemente se deba a los factores que ya se discutieron.

El uso de altas concentraciones de ANA en la propagación *in vitro* de agapantho promovieron el crecimiento de callos y raíces. Esto como lo citan Street y Opik (1976), es lógico que ocurra, ya que una de las funciones de las auxinas es promover el desarrollo y crecimiento de raíces. La situación era que no se sabía cuál es una

concentración alta o baja de hormonas para esta especie. En lo que respecta a la aplicación de citocininas se comportó mejor KIN que BA, aunque en ausencia de citocininas también se observó reacción de los explantes. En general, las dosis altas de ambas citocininas tuvieron un efecto menor que las bajas e intermedias.

A pesar de que hay menor contaminación en los medios líquidos, los sólidos representan una buena opción para la producción de plántulas de agapanto, porque se observa mejor desarrollo de las raíces (Fig. 11). Implementando un buen tratamiento a las plantas donadoras y asepsia en el laboratorio, este medio de cultivo puede ser adecuado para la tercera fase de micropropagación en agapanto.

VI. CONCLUSIONES

1. El tratamiento a las plantas donadoras de explantes con fungicidas y bactericidas es necesario para obtener resultados positivos.
2. El medio líquido con puentes de papel filtro sin cenizas, es más conveniente que el sólido en la micropropagación *in vitro* de liriope e izote.
3. El establecimiento *in vitro* de liriope y agapanto es factible.
4. En liriope la combinación de ANA y BA es mejor que la de 2,4-D y KIN.
5. En agapanto las combinaciones de 0.5 mg/L de BA o KIN con cualquiera de las dosis probadas de ANA producen mejores resultados.
6. En izote deben continuarse las investigaciones orientadas a encontrar la forma de que reaccionen los explantes.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el uso de fungicidas y bactericidas en plantas donadoras de explantes y la búsqueda de otras alternativas para evitar la presencia de microorganismos durante el cultivo en el laboratorio.
2. Se recomienda el uso de medios líquidos con puentes de papel filtro sin cenizas, para la micropropagación *in vitro* de liriope, izote y agapanto.
3. Se recomienda continuar con la investigación relacionada con los factores ambientales que afectan el desarrollo y crecimiento de los explantes.
4. Se recomienda continuar investigando el balance y combinación adecuados de hormonas para la micropropagación *in vitro* de las especies estudiadas.
5. Hacer mayores estudios para reducir la oxidación de los explantes.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- BENSON, L. 1959. Plant classification. Lexington, Massachusetts, EE.UU., D. C. Heath and Company. 688 p.
- BHOJWANNI, S. S.; RAZDAN, M. K. 1983. Plant tissue culture; theory and practice. Amsterdam. Elsevier. Developments in Crop science (5) 502 p.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hortic.* (Netherlands) 14:335-345.
- DIAZ, F. M. 1993. Inducción de brotes laterales en *Liriope sp.* mediante despunte manual y tratamiento con diversos reguladores químicos de crecimiento. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 49 p.
- DURMISHIDZE, S. V.; GOGOBERIDZE, M. K.; MAMALADZE, M. N. 1983. Regeneration of plants from callus tissue of *Yucca gloriosa* buds. *Z. Pflanzeenphysiol.* (U.R.S.S.) Abr. 1983:179-182
- FAGAN, A. E.; DIRR, M. A. 1982. Significant environmental and biochemical factors in seed germination of *Liriope muscari* 'Variegata' and two related taxa *Liriope muscari* 'Variegata' and *Ophiopogon japonicus*. *HortScience* 31:542-543.
- FAJARDO, E.; ALAN, J. J. 1994. La asepsia en la micropropagación *in vitro* de plantas ornamentales. En: Informe Anual de Investigación 1994 (IAI-94). Departamento de Agronomía, Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 6:114-116.
- FRETT, J. J.; DIRR, M. A. 1983. Tissue culture propagation of *Liriope muscari* and *Ophiopogon joruban*. *HortScience* 18(4):431-432.
- GILES, K. L. 1985 (a). Micropropagation in a growing world. 1: The concept of Micropropagation. *Agriculture International Series, World Crops* 37(1):6-8.

- 1985 (b). Micropropagation in a growing world. 2: The impact of Micropropagation. Agriculture International Series, World Crops 37(3):86-88.
- GRAF, B. A. 1978. Exotic plant manual. Roehrs Company, New Jersey. (EE.UU.). 840 p.
- GUEVARA, A. 1991. El cultivo comercial del izote (*Yucca elephantipes* Reg) en Centro América. Tesis Ing. Agr. Universidad Católica de Occidente, Santa Ana, El Salvador. 75 p.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. 1975. Plant propagation: Principles and practices. Third edition. New Jersey, EE.UU., Prentice Hall, Inc. 662 p.
- HILL, R. A. 1988. Tissue culture of *Hosta*. Carolina Tips (EE.UU.) 51(7):25-26.
- HOLDGATE, D. P. 1977. Propagation of ornamentals by tissue culture. In Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Ed. by Reinert, J. and Bajaj, P. S. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York. p 18-43.
- KRIKORIAN, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. In Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. Cali (Colombia), CIAT. p. 95-126.
- MONTALVAN, P. 1992. Propagación vegetativa in vitro del bambú. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 65 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum (EE.UU.) 15:473-497.
- 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. no. 25:135-166.

- NICHOLS, M. A.; CHRISTIE, C. B. 1987. Plant tissue culture: From theory to tool for today's agriculture. *Agribusiness Worldwide (EE.UU.)* 2(5):35-37.
- PURSEGLOVE, J. W. 1972. *Tropical crops: Monocotyledons 1*. London, Great Britain, Longman Group Limited. 607 p.
- ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. 1991. Establecimiento de un laboratorio de cultivos de tejidos vegetales. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. Cali (Colombia), CIAT. p. 1-17.
- SGANZERLA, M. 1973. Flores de bulbo: Cómo cultivarlas. Trad. y Ed. por M. I. Albiñana. Barcelona, España. Editorial De Vecchi. 166 p.
- STREET, H. E.; OPIK, H. 1976. *The Physiology of flowering plants*. Barrington, F. R. S. and Willis, A. J. Second edition. England, Edward Arnold. 280 p.
- VILLALOBOS A., V. M. 1984. Tissue culture technology applied to ornamental species. *In* Micropropagation of selected rootcrops, palms, citrus and ornamental species. FAO/NORWAY symposium on plant tissue culture, technology and utilization (1984, As, Norway). [Proceedings]. As, Norway, FAO Plant production and protection. 59:155-176.
- ; THORPE, T. A. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. Cali (Colombia), CIAT. p. 127-142.
- WARREN A., C. 1988. Cultivos menores de flor de corte. *In* Introducción a la floricultura Trad. por L. S. Westrop. Ed. por R. A. Larson. México D. F., México, Editorial AGT, S. A. p. 153-188.
- WEBERLING, F.; SCHWANTES, H. O. 1981. *Botánica Sistemática*. Trad. por Isabel Fleck. Barcelona, España. Ediciones Omega. 370 p.

BIOGRAFIA DEL AUTOR

Lugar y fecha de nacimiento:

Ciudad de Guatemala, Guatemala. 10 de septiembre de 1971.

Educación secundaria:

Instituto Adolfo V. Hall del Sur (1983 - 1988), Retalhuleu, Guatemala.

Títulos obtenidos:

Perito Agrónomo.

Subteniente de Reservas en el arma de Infantería.

Educación Superior:

Escuela Agrícola Panamericana (1989 -1991), El Zamorano, Honduras.

Título obtenido:

Agrónomo.