



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
INSTITUTO DE HORTICULTURA

F
Tesis
3181
C.2

**CULTIVO *in vitro* DE *E. pulcherrima* Willd Ex Klotzsch Y *E. strigosa*
Hook et Arn SILVESTRES DE MÉXICO**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

PRESENTA

EDNA FABIOLA VALDEZ HERNÁNDEZ



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

15 de marzo de 2010.

Chapingo, Estado de México.



BIBLIOTECA

CULTIVO *in vitro* DE *E. pulcherrima* Willd Ex Klotzsch Y *E. strigosa* Hook et
Arn SILVESTRES DE MÉXICO

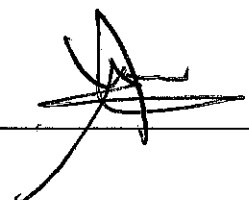
Tesis realizada por la Ing. Edna Fabiola Valdez Hernández bajo la dirección
del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como
requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: M.C. JOSÉ MERCED MEJÍA MUÑOZ



ASESOR: M.C. AMANDO ESPINOSA FLORES



ASESOR: M.C. ALEJANDRO MANZO GONZÁLEZ



DEDICATORIA

A todos los que soñamos con un mundo tranquilo donde cada uno de lo mejor de si, para un mejor mundo.

En una ocasión un señor se encontraba atrapando cangrejos por ahí del Golfo de México.

Al señor le gustaba sentarse exactamente donde pasaba la frontera de los Estados Unidos y México. Siempre llevaba dos botes y hasta que los llenaba de cangrejos se retiraba. En alguna ocasión una persona que lo había observado durante varias semanas se acercó y le pregunto:

-Oiga Señor.

-Digame Joven ¿en qué puedo servirle?

-He notado que uno de sus botes no tiene tapadera.

-No se preocupe Joven, aquí van los cangrejos Mexicanos.

-¿Como que ahí van los Cangrejos Mexicanos?

-Si Joven, mire acerquese y le explicaré.

El joven con curiosidad se acercó al lugar de la playa donde el señor estaba con una trampa improvisada de lata atrapando cangrejos. Al acercarse el Joven el señor le dijo lo siguiente:

-Mire Joven, ¿Ve donde coloqué la trampa? al que el joven respondió

-Si.

Luego el señor continuó:

-La trampa esta exactamente en un lugar donde pueden caer cangrejos Americanos o Cangrejos Mexicanos. Los Cangrejos Mexicanos los pongo en el bote abierto y los americanos en el bote cerrado.

A lo que el joven le pregunto,

- ¿y eso?

el señor le contesto:

-Es muy sencillo los cangrejos Americanos cuando se juntan inmediatamente se organizan y si ven abierto el bote hacen escalerita y en menos de dos horas se me escapan los desgraciados. En cambio si observas el bote de los cangrejos Mexicanos, en cuanto UNO logra trepar hasta arriba, por lo menos dos o tres cangrejos lo jalen para abajo y le dicen ... "Epa compa, ¡Qué! ¿Nos quiere dejar solitos? vengase pa'bajo desgraciado..."

Así que no me preocupa dejar ese bote abierto...

El joven se retiro sorprendido por la lección del día

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por su apoyo financiero, para realizar los estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología COMECYT, por el apoyo financiero para la culminación de la tesis.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por todas las facilidades otorgadas.

Al profe Mejía, por todo su apoyo y respaldo no solo académico y financiero a lo largo de mis estudios en el departamento de fitotecnia; también por ayudarme a ser mejor cada día.

A todos y cada uno de los miembros de mi comité asesor por su apoyo en el presente trabajo.

Al Dr. Leonardo Martínez, por las revisiones, correcciones y sobre todo por la compañía en todo momento.

A los investigadores que desinteresadamente, desde otra parte del mundo se tomaron la molestia de enviarme copia de sus investigaciones: Castellanos, Mike Davey, Miguel Chazaro, Ping Zh, Pedro L. Ortiz y Zong-Ming Cheng.

A Normita y Gisela, por enseñarme y apoyarme en el laboratorio de cultivo de tejidos.

BIOGRAFÍA

Nace en el Distrito Federal el 20 de Abril de 1973, en 1981 tras la muerte de su padre se muda al Estado de México. En 1989 inicia su labor docente a nivel preescolar y primario, al concluir la carrera de Asistente Técnico en Educación Preescolar y desempeña esta actividad hasta 1999. Durante este periodo toma varios cursos, talleres y seminarios de artes y didáctica, entre ellos el de Instructor de danza; lo que le abrió las puertas del 1993 al 1995 a la practica de la enseñanza en el nivel medio y del 1995 al 2001 en el nivel superior. En estos años se ve en la necesidad de obtener un título universitario. Por esta razón considera a la Universidad Autónoma Chapingo como una oportunidad de ampliar sus conocimientos. Ya dentro de la carrera pertenece al consejo departamental y universitario, se desempeña como operadora de cabina, entre otras actividades extracurriculares. Además por tres años consecutivos es parte del cuadro de honor, siendo la segunda alumna de la generación en titularse como Ing. Agrónomo Fitotecnista, siendo su tesis publicada para la venta. Se desempeño desde antes de egresar como asesor técnico de viveristas en Acapulco Guerrero y después como jefe de jardinería en la zona hotelera. En el año 2008, ingresa a la maestría en Horticultura buscando fortalecer sus conocimientos en el área ornamental.

RESUMEN

CULTIVO *in vitro* DE *E. pulcherrima* Willd Ex Klotzsch Y *E. strigosa* Hook et Arn SILVESTRES DE MÉXICO

Edna Fabiola Valdez Hernández. Maestra en Ciencias en Horticultura.
Universidad Autónoma Chapingo.

M.C. José Merced Mejía Muñoz. Director de tesis.

Existen numerosas investigaciones sobre la respuesta morfogénica *in vitro* de especies cultivadas de *E. pulcherrima* Willd Ex Klotzsch, sin embargo hay pocas reportes científicos de especies silvestres de *E. pulcherrima* y *Euphorbia strigosa* Hook et Arn, nativas de México. A pesar de ser estas especies factibles para la producción ornamental comercial. Para la observación de la respuesta morfogénica en ambas especies se utilizó el medio MS (1962) al 50% adicionado con 60 mg L⁻¹ de cisteína, 50 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico; con tres combinaciones hormonales y un testigo sin hormonas: 1 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) + 0.1 mg L⁻¹ de ácido α -naftalenacético (ANA), 2 mg L⁻¹ de ANA + 0.1 mg L⁻¹ de 2-isopenteniladenina (2iP) y 2 mg L⁻¹ de BA + 3 mg L⁻¹ de ácido idol-3-acético (AIA). Los explantes evaluados fueron ápices, hipocótilos, mesocótilos, cotiledones, radículas y epicótilos. Los mejores resultados obtenidos fueron para *E. pulcherrima* a los 30 días después de establecidos en el medio sin

hormonas explantes de hipocótilos y radículas presentaron desdiferenciación de hasta 50 yemas adventicias. En *E. strigosa* a los 60 días después de establecidos en el medio con BA+AIA hipocótilos, ápices, radículas y mesocótilos presentaron formación de callo y diferenciación a yemas adventicias con desarrollo de más de 25 brotes. Los resultados antes señalados permiten vislumbrar a esta técnica como una alternativa viable para la multiplicación masiva de estas especies y con ello desarrollar proyectos de mejoramiento de las mismas vía organogénesis directa, la cual se origina exclusivamente dentro de los tejidos que contienen clorofila y especialmente de las células de la capa subepidérmica.

Palabras clave adicionales: Nochebuena, organogénesis, callo, plántula, diferenciación, yemas adventicias.

ABSTRACT

TISSUE CULTURE OF *E. pulcherrima* Willd Ex Klotzsch AND *E. strigosa* Hook et Arn WILD OF MÉXICO

There are several investigations on the *in vitro* morphogenetic response of cultivated species of *Euphorbia pulcherrima* Willd Ex Klotzsch. However, there are few scientific reports on wild species of *E. pulcherrima* and *Euphorbia strigosa* Hook et Arn., which are native to Mexico, despite these species being feasible for commercial ornamental production. For the observation of the morphogenetic response in both species, the MS medium (1962) was used, 50% added with 60 mg L⁻¹ cysteine, 50 mg L⁻¹ ascorbic acid, and 50 mg L⁻¹ citric acid, along with three hormonal combinations and a hormone free control: 1 mg L⁻¹ benzyladenine (BA) + 0.1 mg L⁻¹ α -naphthaleneacetic acid (NAA), 2 mg L⁻¹ α -naphthaleneacetic acid (NAA) + 0.1 mg L⁻¹ 2-isopenteniladenine (2iP), 2 mg L⁻¹ benzyladenine (BA) + 3 mg L⁻¹ 3-indol acidacetic acid (IAA). The explants tested were: apices, hypocotyls, mesocotyls, cotyledons, radicles and epicotyls. The best results obtained were achieved for *E. Pulcherrima* 30 days after establishment in the hormone free medium in hypocotyl and radicle explants: hypocotyls and radicles showed dedifferentiation of up to 50 adventitious buds. In *E. strigosa* 60 days after establishment in the medium with BA+IAA, hypocotyls, apices, radicles and mesocotyls presented callus formation and dedifferentiation to

adventitious buds with development of more than 25 shoots. These results allow considering this technique as a viable alternative for the massive multiplication of these species and the development of improvement projects of the same with direct organogenesis, which only originates inside chlorophyll-bearing tissues, especially in the cells of the subepidermic layer.

Additional keywords: Poinsettia, organogenesis, callus, seedling, differentiation, adventitious buds.

CONTENIDO	Pág.
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
CONTENIDO	x
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	6
RESULTADOS Y DISCUSION	9
<i>E. pulcherrima</i>	9
<i>E. strigosa</i>	15
CONCLUSIONES	20
BIBLIOGRAFIA	21

INTRODUCCION

La nochebuena es una especie de origen mexicano, con una alta capacidad de producción de embriones somáticos a partir del cultivo de callos (Priel y Beck 1991). Colinas y Mejía (2006) indican que la nochebuena silvestre y otras *Euphorbias* en la costa del pacífico, constituyen un recurso genético de gran importancia para la creación de nuevas variedades de plantas ornamentales. Una etapa muy importante en el proceso de aprovechamiento de especies y requisito fundamental es el de contar con un número mínimo de individuos clonados; por lo cual se requiere desarrollar un esquema de multiplicación clonal que permita desarrollar estrategias de caracterización y descripción de individuos. La técnica del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos es una alternativa para obtener dicha producción.

Murashige (1974) señaló que en la nochebuena se ha empleado la formación de callo, brotes adventicios y embriones asexuales. El primer reporte de la iniciación de retoño de brotes de tejido somático fue por Natajara *et al.* (1973). Sagawa (1976), incluyo a esta especie dentro de las que requieren la utilización del cultivo de tejidos para su mejoramiento, De Langhe *et al.* (1974) publicaron esta técnica como método para la propagación vegetativa de la nochebuena y fueron los primeros en investigar el papel que tienen tanto los reguladores de crecimiento como la composición del medio de cultivo en la formación de brotes adventicios a

partir de callos generados de entrenudos. De Langhe *et al.* (1974) encontraron que en explantes de peciolo de nochebuena cultivada, se producían brotes después de 21-35 días cuando eran cultivados en medio MS al cincuenta por ciento y suplementado con 2iP en un rango de concentración de 10-50 μM y en presencia de 0.5 μM de ANA. Veinte años después Preil (1991) reportó que brotes apicales de 1-2 mm de largo, eran el tamaño óptimo de explante para micropropagación en medio semisólido adicionado con 0.9 μM de BAP y 11.4 μM de AIA.

Posteriormente Osternack *et al.* (1999) fueron los primeros en analizar los estados de competencia, inducción y diferenciación asociados con brotes adventicios regenerados de discos de hipocótilos en MS con 0.2 μM de BAP, por 14 días y después en un medio con 11.4 μM de AIA por 42 días. Los autores observaron que los brotes se originaron exclusivamente dentro de las células de la clorofila que contienen los tejidos y se desarrollaron directamente de la capa subepidermal de las células.

En contraste Roy y Jinnah (2001) reportaron que el desarrollo y calidad de los brotes regenerados de explantes dependían no solo de la combinación y concentración de reguladores en el medio sino también de la interacción sinérgica entre ellos, particularmente de la citocinas, en un medio semisólido con BAP y Kn. Pickens *et al.* (2005) encontraron formación de callo blanco en la superficie del corte y emergencia de raíces en los callos desarrollados en el medio adicionado únicamente con AIA; brotes axilares y continuos se formaron a partir del callo en medio con BA y solo brotes crecidos en un

medio sin reguladores de crecimiento produjeron raíces. Estos mismos autores observaron que las combinaciones de BA y AIA formaron callos rojos y callos organogénicos lo que coincide con lo reportado anteriormente por De Langhe *et al.* (1974) en cuanto a los efectos fisiológicos de la aplicación exógena de BA en nochebuena, ya que cuando se aplicó 2,4-D, observaron la formación de callo blanco, el cual no se consideró de importancia, ya que el callo rojo, característico de la nochebuena es prioritario para organogénesis.

Existen varios estudios *in vitro* en los cuales se utilizaron distintos tipos de explante provenientes de variedades cultivadas de *Euphorbia pulcherrima* reportados por Castellanos *et al.* 2008. El mencionado estudio aporta una idea de la amplitud de posibilidades de estudio para especies silvestres. En cuanto a los factores fisicoquímicos la mayoría de los autores coinciden en que la temperatura de incubación debe ser $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 hrs luz, con lámparas fluorescentes. Sin embargo, entre estos estudios hay una variación en la intensidad. Mientras Katja *et al.* (2000) incubaron a una intensidad de $23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Pickens *et al.* (2005) lo hicieron con una intensidad de $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En estudios realizados por D'Onofrio y Morini (2001), los autores observaron que la luz roja (comparada con la luz blanca) induce aproximadamente tres veces más la formación de callo mientras que la luz azul ejerce un efecto negativo. Los fotoreceptores podrían estar involucrados en esta respuesta; según ese mismo estudio el fitocromo juega un papel positivo, que a su vez parece ser inhibido por una interacción antagonista con el criptocromo.

Según Lee *et al.* (1997) y Clarke *et al.* (2006), el cultivo de meristemos genera la pérdida de las características de las brácteas. Sin embargo, la inducción axilar de brotes adventicios y regeneración de callo, puede exponer la variación somaclonal, la cual puede explotarse para la mejora genética de esta planta ornamental (Castellanos, 2008). El sistema de organogénesis de hoja de cultivo *in vitro* podría usarse para transformaciones genéticas u otra manipulación *in vitro*, así como selección o mutagénesis *in vitro*. La producción de embriones somáticos con la tecnología del biorreactor ha sido reconocida como una estrategia para la futura propagación en masa de plantas. Sin embargo, para ello deberán interactuar la inducción de embriogénesis y el desarrollo, así como manejo del biorreactor para obtener un protocolo preciso para su aplicación industrial (Priel y Beck, 1991).

E. pulcherrima, presenta potencial para multiplicación *in vitro* mediante varios métodos, ya sea cultivo de meristemos, ápices o hipocótilos (en la forma tradicional), con la utilización de biorreactores, entre otros. La multiplicación siempre se ha llevado a cabo utilizando materiales mejorados. Es por ello que el presente trabajo de investigación se enfocó a la utilización de plantas silvestres de esta especie provenientes del estado de Guerrero (México). Por ello parte del objetivo general del presente estudio fue evaluar la respuesta morfogénica *in vitro* de *E. pulcherrima* de origen silvestre.

E. strigosa Hook et. Arn, es conocida como "flor de pascuilla", ya que pudiera referirse a ella como una versión enana de la "flor de nochebuena" o "pascua" (Mostul y Cházaro, 1996). Taxonómicamente se diferencia de *E. pulcherrima* por que el follaje es notablemente escábrido-estrigoso¹ y la tendencia de las flores de nacer en el ápice de los tallos vegetativos los cuales pueden alcanzar hasta 35 cm de altura (Dressler 1961 y Mayfield 1997). Otra características que la convierte en una planta con potencial ornamental es la continúa pigmentación de las brácteas.

Por lo que el objetivo del presente estudio fué observar la respuesta morfogenética *in vitro* de *E. pulcherrima* Willd Ex Klotzsch y *E. strigosa* Hook et Arn silvestres, con fines de observar el potencial para su multiplicación y posterior uso en el mejoramiento de dichas especies. Para ello se describieron las respuestas morfogenicas en diferentes tipos de explante y medios de cultivo.

¹ Escábrido-estrigoso: áspero-cubierto por tricomas rectos, adpresos y agudos, generalmente en la base redondeada (Moreno, 1984)



MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron semillas de plantas silvestres en este estudio. Las semillas de *E. pulcherrima* fueron colectadas en Taxco, Guerrero durante los años 2007 al 2009; las semillas de *E. strigosa* fueron obtenidas de plantas cultivadas en la Universidad Autónoma Chapingo las cuales originalmente fueron colectadas en el estado de Nayarit en 2006. Se utilizó el medio MS (1962) al 50% adicionado con 60 mg L⁻¹ de cisteína, 50 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico; con tres combinaciones hormonales y un testigo sin hormonas que fueron: medio uno [1 mg L⁻¹ benciladenina (BA) + 0.1 mg L⁻¹ ácido α -naftalenacético (ANA)], medio dos [2 mg L⁻¹ ANA + 0.1 mg L⁻¹ 2-isopenteniladenina (2iP)], medio tres [2 mg L⁻¹ BA + 3 mg L⁻¹ ácido indol-3-acético (AIA)] y medio cuatro (testigo sin hormonas).

Los explantes utilizados fueron obtenidos de semillas germinadas *in vivo* e *in vitro*: radícula, cotiledón, hipocótilo (fracciones de 1 cm de largo con corte longitudinal, con la zona abaxial en contacto con el medio), epicótilo y mesocótilo. Las semillas fueron establecidas *in vitro* con y sin testa tras su desinfección la cual consistió en: triple lavado con detergente biodegradable, remojo en agua estéril deionizada con 4 ml L⁻¹ de azul de metileno durante cinco minutos (en la cámara de siembra), después se triple enjuague con agua estéril, posteriormente remojo en alcohol al 70% durante cinco minutos, nuevamente triple enjuague con agua estéril, remojo en agua con 30% de

cloro comercial, con una gota de Tween 20®, durante 10 minutos y por último enjuague cinco veces con agua estéril, y se sembraron en los diferentes tratamientos *in vitro*, con y sin eliminación de testa. Ya que se encontró que la eliminación de esta facilitó la germinación para la obtención de plántulas *in vitro*. En estas especies, al entrar la semilla en contacto con agua, se observó la presencia de mucilago y como lo indicó Fahn (1978), el mucilago puede intervenir en la regulación de la germinación ya que impide la desecación durante el proceso. El exceso de agua se presenta, cuando las semillas se cubren completamente de mucilago el cual puede impedir la germinación al cortar el paso al oxígeno. Esto fue corroborado al obtener una mayor y más pronta germinación mediante la remoción de la testa.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se combinaron los medios de cultivo con los tratamientos y los diferentes explantes. Cada tratamiento conto con un mínimo de tres repeticiones en cada especie. Se consideró como unidad experimental un tubo de ensaye con un explante.

Las variables de respuesta fueron evaluadas a los 30, 60 y 100 días después del establecimiento (siempre y cuando la contaminación y oxidación para esta fecha fuera menor al 80%, en caso contrario se descartaron sin evaluación). Dichas variables fueron el número de tubos que presentaban indicios de: contaminación, oxidación, formación de callo (desdiferenciación), formación de brotes (organogénesis directa) o tejido sin respuesta.

La prueba de diferencia mínima significativa (DMS) con un $\alpha=0.05$, para la comparación de medias de la variable "número de brotes" se aplicó solamente en la especie *E. strigosa*.

RESULTADOS Y DISCUSION

En función de los resultados se pudo observar en este estudio que la técnica de cultivo *in vitro* en ambas especies estudiadas es una alternativa viable para la multiplicación masiva mediante la organogénesis directa .

E. pulcherrima

La contaminación fue un problema cuando los explantes provenían de plántulas generadas *in vivo* (Cuadro 1), ya que cuando fueron obtenidos *in vitro* con eliminación de testa, la contaminación solo se presentó en un 10%. Por lo fue inferido que un alto porcentaje de la contaminación no fue causado debido a la condición del explante, ya que mediante la remoción de la testa la contaminación fue considerablemente menor. Otro factor que también influyó en la incidencia de contaminación fue la temperatura de incubación. El nivel de temperatura en el área de incubación no fue el adecuado la cual alcanzó 35°C (10° C por encima de lo recomendable), lo que favoreció el desarrollo de patógenos en un medio rico (Villalobos, 1985).

La oxidación de los tejidos y callos también representó un problema que fue controlado con la incorporación de los antioxidantes (Cuadro 1). Este problema también fue señalado por Jasrai *et al.* (2003) quienes observaron necrosis en la superficie del corte del explante (nudo). Los mencionados autores disminuyeron la incidencia de la necrosis al colocar de forma vertical

el explante , efecto reportado igualmente por Riplay y Preece (1986), en un estudio de *E. jathryris*.

La necrosis igualmente se presento por efecto de la oxidación y fue mayor en las primeras pruebas que en ensayos posteriores gracias a ajustes realizados a los medios de cultivo así como la adición de antioxidantes y /o carbón activado como lo recomienda Margara (1988). Aunque se logró una incidencia de necrosis menor en nuestro estudio, se siguió presentando principalmente en los callos. Por lo que se consideró que la temperatura fue un factor determinante en su aparición. En los meses con temperaturas más bajas y constantes el problema no fue tan agudo en contraste con los meses calurosos en los cuales de manera adicional se presentaron fluctuaciones de temperatura de 35°C a 25°C en un mismo día mismo efecto que observo Murashinge (1974).

El desarrollo del callo inició con un engrosamiento del explante en los medios adicionados con hormonas (Cuadro 1). Algunos callos presentaron un crecimiento friable de color verde (transparente) mientras que otros presentaron una ligera coloración rojiza. Estos últimos, generalmente se oxidaban desde el centro hacia afuera antes del día 50 después de establecidos. Esta coloración se puede deber según Litz y Jarret (1991), a la sacarosa cuya concentración altera la pigmentación de los callos, aunque también ocurre cando la relación auxina-citocinina es menor y esta pigmentación se observó inclusive en los medios sin adición de estos reguladores. Estas pigmentaciones coincidió mayormente con lo expuesto

por De Langhe *et al.* (1974) y Prickens *et al.* (2005) quienes indican que son los callos de color rojo los característicos de la nochebuena y además son los prioritarios para organogénesis

Cuadro 1. Respuesta de cuatro tipos de explante de *E. pulcherrima* (en porcentaje) a cinco variables evaluadas a los 30 días después de establecidos en cuatro diferentes medios.

Variables	TIPOS DE EXPLANTE															
	Hipocótilo				Ápice				Cotiledón				Radícula			
	MEDIO DE CULTIVO				MEDIO DE CULTIVO				MEDIO DE CULTIVO				MEDIO DE CULTIVO			
respuesta	BA	ANA	BA	T*	BA	ANA	BA	T	BA	ANA	BA	T	BA	ANA	BA	T
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ANA	2iP	AIA		ANA	2iP	AIA		ANA	2iP	AIA		ANA	2iP	AIA	
(%)Contaminación	43	49	37	39	23	33	13	23	44	45	55	33	0	0	0	0
(%)Oxidación	19	20	25	11	4	2	10	15	16	10	21	6	75	75	0	0
(%)Sin respuesta	16	9	7	12	42	23	38	38	21	45	15	53	0	0	0	0
(%)Callo	22	23	28	1	23	40	31	0	15	0	9	9	25	0	0	0
(%)Brote	0	0	3	37	8	2	8	25	4	0	0	0	0	25	25	100
*Testigo																

La respuesta de organogénesis directa, se pudo apreciar solo en hipocótilos en el medio cuatro a partir del décimo día de establecidos (Figura 1) ya fuera por la presencia de la curvatura en el hipocótilo o por la diferenciación de yemas adventicias, así como posteriormente el desarrollo de brotes con hojas. A los 22 días se pudo observar el desarrollo de uno o varios brotes principales; los cuales mostraron un porte superior a los tres centímetros a los 40 días. Cuando existió un brote principal y éste fue extraído al momento de cambio a medio fresco, se desarrolló otro de similares características al anterior. Cuando los tallos y hojas se desarrollaron inmersos en el medio de cultivo presentaron diferencias morfológicas, con tallos más gruesos, aplanados y una mayor pigmentación rojiza. El ápice solo presentó elongación, no desarrolló tejido nuevamente y en el hipocótilo fue posible apreciar una diferenciación de más de 50 yemas adventicias con el desarrollo de varios brotes al mismo tiempo.

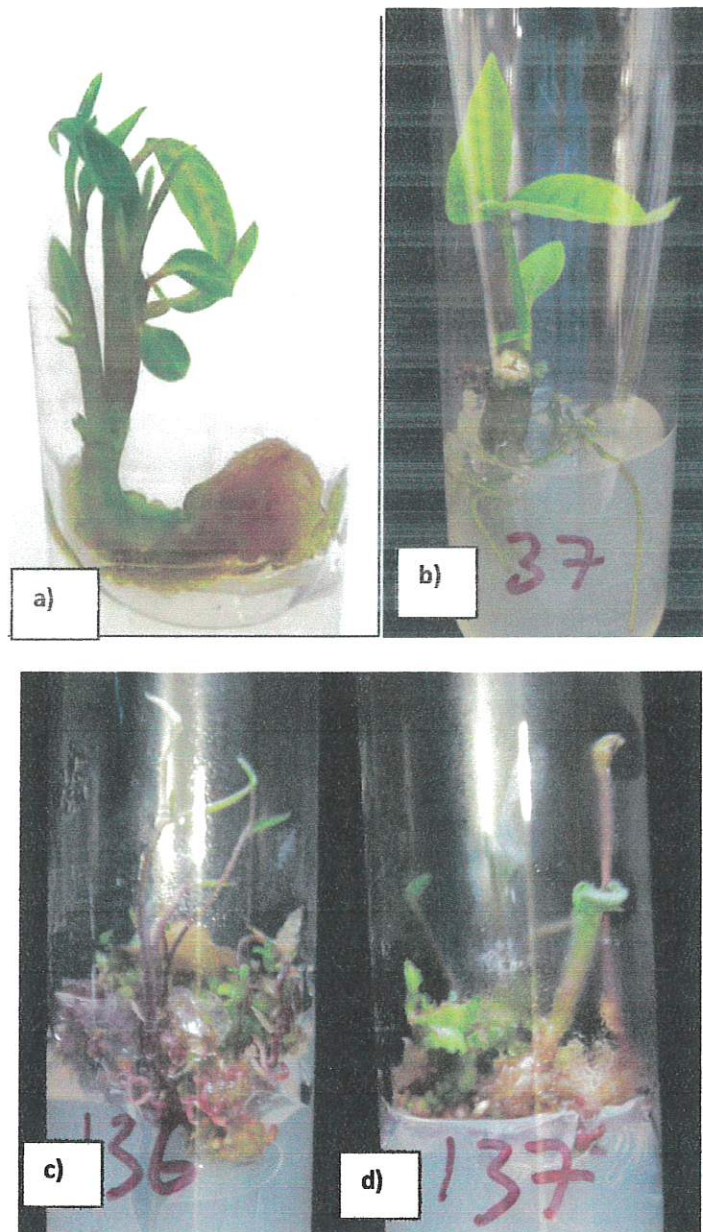


Figura 1. a) hipocótilo y b) radícula de *E. pulcherrima* 30 días después de establecidos en el medio cuatro, con diferenciación de yemas adventicias y desarrollo de brotes con hojas. c) cotiledón y D) radícula de *E. strigosa* 80 días después de establecidos con desdiferenciación celular (callo) y diferenciación a brotes de más de tres centímetros en el medio tres (2 mg L^{-1} de BA + 3 mg L^{-1} de AIA).

Cuando las radículas de *E. pulcherrima* fueron tomadas de plántulas obtenidas en el invernadero, no generaron ningún resultado. Sin embargo, al ser obtenidas de siembras *in vitro* en el medio cuatro tuvieron desarrollo de brotes los cuales alcanzaron una altura mayor a los seis centímetros a los 45 días después de establecidos (Figura 1-b). A partir de la zona donde se realizó el corte de la radícula se inició la formación de brotes, con el desarrollo de solo uno a la vez aunque vigorosos (hasta ocho centímetros).

Se obtuvo un efecto diferente en la respuesta morfogénica *in vitro* en función del origen del explante dentro de la estructura de la planta, como lo indicó Osternack *et al.* (1999). Sin embargo, no se observó ninguna relación, ya que la diferenciación celular de callos (en hipocótilos) no fue limitante a la ubicación del explante, ya que en todas las ubicaciones se presentaron los diferentes tipos de callo. Por otro lado, también las condiciones de incubación pudieron influir, tales como la temperatura. El requerimiento de temperatura es específico para cada especie, generalmente dentro de un rango de 20 °C a 32°C (Lozoya, 1985). En el presente estudio la temperatura presentó fluctuaciones de 25° C a 35° C en un día.

Por otra parte, la intensidad luminosa es también un factor fundamental en la morfogénesis en condiciones controladas. Se ha reportado que esta influye en la diferenciación (Villalobos *et al.*, 1985). Los mismos autores reportaron que la luz interacciona con la citocininas para inducir el proceso morfogénico en cotiledones de *Pinus radiata*. También ha sido reportado que tanto el fotoperiodo como la longitud de onda e intensidad luminica son

importantes, ya que al influir en la síntesis y la acumulación de almidón y en las hormonas endógenas, entre otras sustancias, afectan el desarrollo del inóculo. Este último, según la especie, puede requerir más de 12 horas diarias de luminosidad, y de 1000 a 10 000 luxes de intensidad (Lozoya, 1985). Aunque los explantes fueron ubicados en la zona con mayor intensidad en un intento de proveerles condiciones similares a sus hábitat silvestre, no se pudo precisar si está influyó directamente en los resultados. La alta respuesta de organogénesis directa en radícula y medio cuatro en *E. pulcherrima* (Cuadro 1), pudo deberse a la gran capacidad de totipotencia de la radícula y posiblemente a la presencia de giberelinas y citocininas durante el desarrollo de la plántula en condiciones *in vitro*. Esta asociación la han reportado Salisbury y Ross (2000), donde los autores explican que una célula de parénquima de raíz puede iniciar su división para producir una yema secundaria y generar finalmente una planta madura con flores. En el presente estudio los brotes de las radículas, no presentaron pigmentación rojiza y las hojas presentaron un desarrollo completo. Adicionalmente, los resultados, coinciden con lo reportado por Castellanos *et al.* (2008) donde se indica que los brotes adventicios de nochebuena se originaron exclusivamente dentro de los tejidos que contienen clorofila y se desarrollaron directamente de la células de la capa subepidérmica.

E. strigosa

En el medio uno no se obtuvo respuesta; en el medio dos se obtuvieron dos plántulas con aproximadamente cinco centímetros de altura con cotiledones de aproximadamente ocho milímetros. A los 60 días solamente



dos cotiledones presentaron formación de callo (Cuadro 2). Los otros dos cotiledones además de presentar callo, mostraron diferenciación de más de 50 yemas adventicias entre ambos. Estos a los 100 días después de establecidos desarrollaron cinco brotes de 4.5 centímetros de altura (Figura 1-c), uno de ellos con un grosor de más de dos milímetros de color verde y con siete hojas. Dos de ellos de color verde y los otros tres blancos (Figura 1-d).

Los 45 brotes restantes presentaron la misma altura pero con un grosor de apenas un milímetro, con una pigmentación rojiza en la base y en la parte superior. Todos presentaron pequeñas hojas de color verde.

La radícula desarrolló un callo compacto con coloración verde-rojiza y presentó el desarrollo de la diferenciación de múltiples yemas adventicias (semejante al de los cotiledones) con la presencia de algunos brotes con hojas de tres centímetros de altura.

En el medio tres a los 60 días después del establecimiento, todos los explantes presentaron callo, así como diferenciación de 34 yemas adventicias con desarrollo de brote con hojas. Fue este medio el que mejores resultados presentó para la multiplicación de *E. strigosa* ya que presentó una morfogénesis muy prolífica la cual es descrita detalladamente en el Cuadro 3, estos brotes fueron muy delgados (un milímetro de grosor) con una ligera pigmentación rojiza.

Cuadro 2. Respuesta de seis tipos de explante de *E. strigosa* (en número) en cinco variables evaluadas a los 60 días después de establecidos en medio de cultivo con tres tratamientos.

TIPOS DE EXPLANTE																
MEDIOS DE CULTIVO																
Variables respuesta	Hipocótilo			Radícula			Mesocótilo			Epicótilo			Ápice			Cotiledón
	ANA	BA	T*	ANA	BA	T	ANA	BA	T	ANA	BA	T	ANA	BA	T	
	2iP	AIA	+	2iP	AIA	+	2iP	AIA	+	2iP	AIA	+	2iP	AIA	+	
(Nº)Contaminación	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Nº)Oxidación	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
(Nº)Sin respuesta	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	2
(Nº)Callo	2	3	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	3
(Nº)Brotes adventicios	0	3	1	2	3	1	1	3	1	2	1	0	2	1	1	2

*Testigo

En el medio cuatro a los 60 días después del establecimiento solamente se presentó organogénesis directa en la radícula, el mesocótilo y el ápice (Cuadro 3). La radícula presentó un mayor número de brotes y durante los primeros dos meses se observó la formación de callo.

Cuadro 3. Comparación de medias para número de yemas adventicias que se desarrollaron a tallos con hojas, de los diferentes explantes evaluados en el cultivo *in vitro* de *E. strigosa* en las diferentes combinaciones hormonales, 100 días después de establecidos.

EXPLANTES	COMBINACION HORMONAL	TALLOS CON HOJAS
Hipocótilo	Uno (BA-ANA)	0.00 b
Hipocótilo	Dos (ANA-2Ip)	0.00 b
Hipocótilo	Tres (BA-AIA)	11.33 ab
Hipocótilo	Cuatro (Sin hormonas)	4.67 b
Ápice	Uno (BA-ANA)	0.00 b
Ápice	Dos (ANA-2Ip)	3.00 b
Ápice	Tres (BA-AIA)	8.33 ab
Ápice	Cuatro (Sin hormonas)	1.00 b
Cotiledón	Uno (BA-ANA)	0.00 b
Cotiledón	Dos (ANA-2Ip)	1.67 b
Cotiledón	Tres (BA-AIA)	5.33 b
Cotiledón	Cuatro (Sin hormonas)	0.00 b
Radícula	Uno (BA-ANA)	0.00 b
Radícula	Dos (ANA-2Ip)	1.33 b
Radícula	Tres (BA-AIA)	11.00 ab
Radícula	Cuatro (Sin hormonas)	6.67 ab
Mesocótilo	Uno (BA-ANA)	0.00 b
Mesocótilo	Dos (ANA-2Ip)	8.33 ab
Mesocótilo	Tres (BA-AIA)	18.33 a
Mesocótilo	Cuatro (Sin hormonas)	1.67 b
Epicótilo	Uno (BA-ANA)	0.00 b
Epicótilo	Dos (ANA-2Ip)	2.67 b
Epicótilo	Tres (BA-AIA)	0.00 b
Epicótilo	Cuatro (Sin hormonas)	0.00 b

*Medias con la misma letra en cada columna, no son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de medias de DMS con α de 0.05.

Los demás explantes (mesocótilos, hipocótilos, epicótilos y ápices) desarrollaron una masa de callo pequeña sobre la que se presentó diferenciación de yemas adventicias, que llegaron a desarrollar brotes y hojas, excepto el hipocótilo. Los brotes presentaron coloración rojiza y desarrollo de al menos tres hojas alternas.

El número de brotes solo se evaluó en *E. strigosa* debido a que el desarrollo de tallo con hoja a partir de las yemas adventicias en *E. pulcherrima* solo fue vista en un tratamiento y con un solo tipo de explante; mientras que en *E. strigosa*, la diferenciación a yemas adventicias se presentó en diferentes tipos de explantes y combinaciones hormonales, como se describe en el Cuadro 3. Los tratamientos estadísticamente más productivos, en función del desarrollo del número de brotes a los 100 días después de establecidos, fue el medio tres (2 mg L^{-1} BA y 3 mg L^{-1} AIA) con la utilización de mesocótilos como explante, este cual arrojó una media de 18.33 brotes desarrollados. Este fue seguido del medio tres con hipocótilo como explante arrojó una media de 11.33 brotes/explante y el medio tres con radículas produjo una media de 11.0 brotes/explante. Finalmente, el medio tres con el ápice produjo una media de 8.33 brotes/explante.

Los brotes fueron largos (3 cm), delgados (1mm) de coloración rojiza, con una ligera pubescencia (estrigosa), característico de la especie, con hojas pequeñas alternas de color verde-amarillento, algunos con formación de uno o dos nudos.

CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* con eliminación de testa de la semilla tras su desinfección, disminuyó el tiempo de germinación de 15 días a tres días. Esto generó una mayor homogeneidad en las plántulas a los 10 días de establecidas. El medio tres (BA+AIA) fue, la mejor opción para *E. strigosa*, y medio cuatro (sin hormonas) para *E. pulcherrima* silvestres.

El medio cuatro (sin hormonas) fué el que mejor resultado presentó para la multiplicación *in vitro* de *E. pulcherrima* silvestre cuando se utilizaron explantes de radículas e hipocótilos de plántulas germinadas en condiciones *in vitro* en este mismo medio. Esta combinación presentó una respuesta de organogénesis directa, con diferenciación de más de 50 yemas a los 30 días después del establecimiento.

El medio tres (2 mg L⁻¹ de BA y 3 mg L⁻¹ de AIA) fue el que mejores resultados presentó para la multiplicación de *E. strigosa* silvestre, debido a la generación de yemas adventicias y desarrollo de tallo con hojas por medio de la utilización de explantes de hipocótilos, ápices, radículas y mesocótilos provenientes de plántulas germinadas en condiciones *in vitro* en este mismo medio. Estos tratamientos presentaron una media superior a los ocho brotes por explante a los 100 días después del establecimiento.

LITERATURA CITADA

- Castellanos, M., B. Power, M. Davey. 2008. Tissue culture technologies for micropropagation, *in vitro* regeneration and genetic improvement of poinsettia. Propagation of ornamental plants. 8(4): 173-185
- Clarke, J. L; S. S. Klemsdal, E. Floistad, A. K. Hvoslef-Eide, S. Haugslien, R. Moe, D. R. Blystad. 2006. Genetic engineering of Poinsettia with the aim of enhancing its resistance to *Poinsettia Mosaic Virus*. Acta Hort. 722: 321-326
- Colinas L., M. T; J. J. M. Mejía. 2006. La nochebuena. Extensión al campo. 1(2):31-33.
- D'Onofrio, C., S. Morini. 2001. Effect of light quality on *in vitro* production of callus in explants of three poinsettia cultivars. Acta Horticulturae. 560:449-452
- De Langhe, E., P. Debergh, R. Van-Rik. 1974. *In vitro* culture as a method for vegetative propagation of *Euphorbia pulcherrima*. Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie, 71: 217-274.
- Dressler, R. L. 1961. A synopsis of Poinsettia (Euphorbiaceae) Annals of the Missouri Botanical Garden. 48 (4): 329-341
- Fahn A. 1978. Anatomía Vegetal. García, A.F; Fernández. C. J; Fernández, P. J. (Trads). H. Blume ediciones. Madrid España. 643p.

- Jasrai, Y. T, K. N Thaker., M. C. D'Souza. 2003. *In vitro* propagation of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Through somatic embryogenesis. Plant tissue Cult. 13 (1): 31-36.
- Katja, S. S; W. Preil, J. P. Knox, R. Lieberei. 2000. Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. Physiologia plantarum 108:180-187.
- Litz R., W., R. L, Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. *In*. Cultivo de Tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M; Mroginski, L. A. (eds). CIAT. Colombia. Pp.143-172
- Lee, I. M., M. Klopmeier, I. M. Bartoszyk., D. E. Gundersen-Rindal, K. L. Thomson, R. Eisenreich. 1997. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. Nature Biotechnology. 15:178-182.
- Lozoya S, E. 1985. Micropropagación de especies herbáceas. En. El cultivo de tejidos vegetales en México. Robert M. L, V. M Loyola. (eds.) CICY-CONACYT. pp 65-80.
- Margara J.1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. Mundi-prensa. Madrid. 230 p.
- Mayfield, M. H. 1997. A systematic treatment of *Euphorbia* subgenus *Poinsettia* (Euphorbiaceae). Dissertation of Doctor Philosophy. University of Texas at Austin. United States. 230 p.
- Moreno N., P. 1984. Glosario botánico ilustrado. CECSA. Xalapa, México. 300 p.
- Mostul, B. L., B. M. J. Cházaro. 1996. Two geophytic euphorbias from western México. Cactus and Succulent Journal. 68 (3):153-155

- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166
- Murashige, T., F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Nataraja, K. 1975. Morphogenesis in embryonal callus of *Euphorbia pulcherrima in vitro*. Current Science, 44:136-137
- Nataraja, K., M. S. Chennaveerajah, P. Girigowda. 1973. *In vitro* production of shoot buds in *Euphorbia pulcherrima*. Current Science. 42: 577-578.
- Osternack, N., K. Saare-Suminiski, W. Preil, R. Lieberei. 1999. Introduction of somatic embryos, adventitious shoots and roots in hypocotyls tissue of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex. Klotzsch: comparative studies on embryogenic and organogenic competence. Journal of applied Botany. 73: 197-201.
- Pickens, K. A; Z. M. Cheng, R. N. Trigiano. 2005. Axillary bud proliferation and organogenesis of *Euphorbia pulcherrima* Winter Rose®. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 706:1-5
- Preil, W., A. Beck. 1991. Somatic embryogenesis in bioreactor culture. Acta Horticulturae. Plant biotechnology 289: 189-192
- Ripley, K.P; J. E. Preece. 1986. Micropropagation of *E. jathyris*. Linn. Plant Cell Tissue And Organ Culture. 5: 213-218.
- Roy, S. K., M. Jinnah. 2001. *In vitro* micropropagation of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd). Plant Tissue Culture, 11: 133-140.
- Sagawa, Y. 1976. Potential of *in vitro* culture techniques for improvement of floricultural crops. Acta horticulturae 63:61-66

- Salisbury F. B; C. W, Ross. 2000. Fisiología de las plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Thomson learning. España. pp 529-983.
- Villalobos A. V. 1985. Las bases morfogenéticas en la micropropagación de especies perennes. En. El cultivo de tejidos vegetales en México. Robert M. L, Loyola V. M. compiladores. CICY-CONACYT. México.