

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



TESIS DE GRADO

**“EVALUACIÓN PRELIMINAR *IN VITRO* DEL EFECTO DE
LOS RAYOS GAMMA (CO-60) EN VARIEDADES DE
CRISANTEMO (*Chrysanthemum sp*)”**

Nelly Sandra Ventura Goyzueta

La Paz – Bolivia
2007

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“EVALUACIÓN PRELIMINAR *IN VITRO* DEL EFECTO DE
LOS RAYOS GAMMA (CO-60) EN VARIEDADES DE
CRISANTEMO” (*Chrysanthemum sp.*)**

*Tesis de grado presentado como
requisito parcial para optar el
título de Ingeniero Agrónomo*

Nelly Sandra Ventura Goyzueta

TUTOR:

Ing. Ph. D. Victor Hugo Mendoza Condori

ASESOR:

Ing. M. Sc. Jorge Pascuali Cabrera

COMITÉ REVISOR:

Ing. M.Sc. Celia Fernández Chávez

Ing. M.Sc. Hugo Bosque Sánchez

Ing. Victor Paye Huaranca

APROBADA

Presidente:

**Gestión
2007**

Dedicado A:

Mis dos amores Nyls y Adriana que son mi razón de vivir y me dan fuerzas para seguir adelante.

A mi mamita Braulia ejemplo de amor, superación y perseverancia. A mis hermanos; Gonzalo, Doris y Heidy. Y A mis queridos cuñados; Amílkar, Marcelo y Gladys.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al Padre Celestial por haberme dado el suficiente conocimiento para encarar la vida y dar satisfacciones a mí familia.
- A la facultad de Agronomía, de la Universidad Mayor de San Andrés por haberme permitido formarme profesionalmente.
- Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía por la acogida en sus instalaciones y el uso de sus materiales y equipos.
- Al Dr. Ing. Victor Hugo Mendoza C. por la desinteresada colaboración y dedicación durante la realización de la Tesis.
- Al Hospital General - Unidad de Radio-Terapia por facilitarme el equipo de la Bomba de Cobalto - 60.
- Al Dr. Ing. Félix Marza por la orientación y los valiosos consejos brindados en todo este tiempo.
- A mi mamita querida Braulia Ines Goyzueta que me brindo su amor, comprensión y sus consejos que me ayudaron en mi formación personal y profesional.
- A la memoria de mi papá Isaac Ventura le doy gracias por la formación recibida en el tiempo que nos toco compartir.
- A un amigo en especial Ángel Cadena que supo estar en los momentos más difíciles de mi vida y brindarme todo su apoyo moral.
- A mis dos amores Nylson y Adrianita que son mi razón de vivir y que en todo este tiempo supieron entenderme y apoyarme.
- A mi hermana Dorita más que hermana amiga por su apoyo y cariño no solo en la etapa de formación profesional sino también en toda mi existencia.
- A mis dos hermanos Gonzalo y Heidi que me ayudaron y me apoyaron en todo este tiempo.
- A mis amigas Susy, Celia, Aquilina, Sandra, Martha, Maria Luisa, Irene Alicia, Beatriz, Verónica, con quienes compartí momentos tristes y alegres.
- A mis amigos Angel, Fredy, Gerardo, Jhony, Marcelo, Miguel Angel, Jhusty, Limber, Juan, Jaime, Javier y Rafita por haberme brindado su amistad y comprensión. Al grupo los Corderitos y Semillas.
- Y a todos ustedes que de una forma u otra me alentaron para seguir adelante.....Les doy gracias desde el fondo de mí corazón y nunca les olvidaré.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía (UMSA) de la ciudad de La Paz - Bolivia.

Se trabajó con dos variedades de crisantemo Reguire y Vega de las cuales en la introducción *in vitro* del material vegetal se utilizaron esquejes de tallo de 2 a 3 cm, de los cuales posteriormente se obtuvieron meristemos de 1 a 2 mm. La desinfección de explantes se realizó con alcohol al 70 % (v/v) durante 10 segundos, e hipoclorito de sodio al 4 % (v/v) durante 10 minutos y 3 enjuagues en agua destilada estéril.

El establecimiento y la multiplicación de los explantes de crisantemo se realizaron en el medio basal de Murashige y Skoog (1962). Para la investigación se evaluó el comportamiento morfológico de las variedades en estudio en 3 medios de cultivo (M1=MS+0,8mg kin/l⁻¹+0,05mg AIA/l⁻¹; M2=MS+2mg kin/l⁻¹ +4mg AIA/l⁻¹; M3= MS + 0,1mg BAP/l⁻¹+0,01mg ANA/l⁻¹). Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14 y 21 días.

Del análisis de datos se determinó que el mejor medio de cultivo para la multiplicación y desarrollo de vitroplantas fue el medio 3, para ambas variedades.

La irradiación de los explantes se realizó en el Hospital de Clínicas – Unidad de Radioterapia, con las siguientes dosis: 0 Gy - 0 min; 15 Gy – 10,27 min; 30 Gy – 20,53 min y 45 Gy - 30,78 min.

La evaluación del material vegetal irradiado se realizó a los 7, 14 y 21 días. Se observó que con dosis bajas (15 Gy) existe aún desarrollo normal de las vitroplantas a los 30 Gy baja el crecimiento y a los 45 Gy existe una elevada mortalidad. Con los datos obtenidos se estableció la dosis letal media (DL-50).

Con la tesis se determinó que las dosis óptimas para la inducción de mutaciones en la variedad Reguire es de 20,5 Gy y para la variedad Vega 22,5 Gy.

SUMMARY

The present investigation work was developed in Biotechnology Plant laboratory at the Agronomic Faculty (U.M.S.A.) from La Paz city, Republic of Bolivia.

This work have been developed with two chrysanthemum varieties Reguire and Vega using by their growth, into a medium *in-vitro*, suckers from stem of two to three centimeters of diameter, which after got meristems of one to two millimeters. The explants desinfection was done with 70% of alcohol (v/v) by 10 seconds, and 4% of sodium hipocloritum (v/v) by 3 minutes, after that three rinses with distilled sterile water.

The chrysanthemum stablishment and explants multiplication have been done into a basal medium on Murashige y Skoog (1962). Was evaluate the morphologic behaviour of the varieties studied in three cultivation mediums (M1=MS+0,8mg kin/l⁻¹+0,05mg AIA/l⁻¹; M2=MS+2mg kin/l⁻¹ +4mg AIA/l⁻¹; M3= MS + 0,1mg BAP/l⁻¹+0,01mg ANA/l⁻¹). The tests was made to 7,14 and 21 days.

In the analysis data, was determinate that the best cultivation medium by the multiplication and development of vitro-plants was the number three, for both varieties.

The explants's irradiation was done at the Hospital de Clínicas – Radiotherapy Unit, with the next doses 0 Gy - 0 min; 15 Gy – 10,27 min; 30 Gy – 20,53 min y 45 Gy - 30,78 min.

The evaluation of vegetal material irradiated was done to 7,14 and 21 days. Was viewed with low doses (15 Gy) there is a normal vitro-plants develop, to 30 Gy the growth is down and at 45 Gy there is a hight mortality. With the recorded data was got the letal mean doses (DL-50).

With the present thesis, was determinate that the best doses by the mutation induction in Reguire variety is 20,5 Gy and for the Vega variety is 22,5 Gy.

INDICE GENERAL

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	18
<i>Objetivo general.....</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>19</i>
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	20
2.1. Características generales del cultivo.....	20
2.1.2. Clasificación taxonómica	21
2.1.3. Botánica del crisantemo	21
2.1.4. Mercado.....	22
2.1.5. Clasificación de los cultivares según su respuesta fisiológica.....	23
2.1.5.1. Crisantemos de floración veraniega o temprana.....	23
2.1.5.2. Crisantemos de todo el año.....	23
2.1.6. Cultivares de crisantemo, clasificados por la respuesta de la floración a la temperatura	24
2.1.6.1. Cultivares de termocero	24
2.1.6.2. Cultivares termopositivos.....	24
2.1.6.3. Cultivares termonegativos	24
2.1.7. Multiplicación	24
2.1.8. Suelos.....	25
2.1.9. Riego.....	25

2.1.10. Fertilizantes	26
2.1.11. Necesidades nutricionales del cultivo	26
2.1.12. Reguladores de crecimiento	26
2.1.13. Plagas y enfermedades más frecuentes en el crisantemo	27
2.1.13.1. Mosca del crisantemo (<i>Liriomyza trifolli</i>)	27
2.1.13.2. Nematodo del crisantemo (<i>Aphelencoides ritzemabosi</i>)	27
2.1.14. Enfermedades	28
2.2. Cultivo de tejidos	28
2.3. Medios de cultivo	29
2.3.1. Sales inorgánicas	29
2.3.2. Vitaminas	30
2.3.3. Reguladores de crecimiento	31
2.3.4. Aminoácidos	32
2.3.5. Carbohidratos	33
2.3.6. Agentes gelificantes	33
2.3.7. Agua	34
2.4. Preparación de soluciones stock	34
2.5. Preparación de Medios de Cultivo	35
2.6. Explante	35
2.7. Micropropagación	36
2.7.1. Métodos de micropropagación	37
2.8. Factores físicos	38
2.8.1. Intercambio gaseoso	38

2.8.2. Luz.....	38
2.8.3. Temperatura.....	39
2.9. Factores químicos.....	39
2.9.1. pH... ..	39
2.10. Cultivo de Meristemas.....	39
2.11. Producción de plantas libres de hongos y de bacterias por cultivos de meristemas.....	40
2.12. Producción de plantas libres de virus.....	40
2.13. Cultivos in vitro en flores.....	43
2.14. Introducción del material vegetal de crisantemo.....	43
2.14.1. Medio adecuado para el crisantemo.....	44
2.15. Mutaciones.....	45
2.15.1. Mejoramiento genético por mutaciones.....	45
2.15.2. Agentes mutagénicos	46
2.16. Cobalto - 60.....	47
2.17. Mutaciones inducidas en crisantemos.....	47
2.17.1. Obtención de colores a través de mutaciones inducidas en crisantemos.....	48
2.17.2. Inducción de rayos gamma en el crisantemo a diferentes dosis	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1. Ubicación.....	51
3.2. Materiales y métodos.....	51
3.2.1. Material vegetal.....	51

3.2.2. Metodología.....	52
3.2.2.1. Preparación de medios de cultivo.....	52
3.2.2.2. Introducción del material vegetal a condiciones in vitro	54
3.2.2.3. Primera etapa de la investigación	5555
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	63
4.1. Establecimiento del material vegetal.....	63
4.1.1. Contaminación y supervivencia	63
4.2. Efecto de los medios de cultivo en el desarrollo y multiplicación de las vitroplantas de crisantemo.....	65
4.2.1. Efecto de los medios de cultivo en la velocidad de crecimiento semanal de la variedad Reguire.	65
4.2.2. Efecto de los medios de cultivo en la velocidad de crecimiento semanal de la variedad Vega.....	68
4.2.3. Comportamiento morfológico de las variedades de crisantemo por efecto de los medios de cultivo a la tercera semana.....	72
4.2.3.1. Altura de vitroplanta en los medios de cultivo.....	73
4.2.3.2. Número de nudos en los medios de cultivo	75
4.2.3.3. Variable número de brotes en los medios de cultivo	76
4.2.3.4. Grado de enraizamiento en los medios de cultivo.....	78
4.2.4. Comportamiento morfológico in vitro de las variedades de crisantemo a diferentes dosis de irradiación.....	80
4.2.5. Efecto de la irradiación en las variables de respuesta de la variedad Reguire y Vega.....	83
4.2.5.1. Altura a diferentes dosis de irradiación	83

<i>4.2.5.2. Número de nudos a diferentes dosis de irradiación</i>	<i>85</i>
<i>4.2.5.3. Número de brotes a diferentes dosis de irradiación</i>	<i>86</i>
<i>4.2.5.4. Grado de enraizamiento a diferentes dosis de irradiación</i>	<i>88</i>
<i>4.3. Dosis letal media (DL-50) de irradiación - variedad Reguire y Vega.</i>	<i>89</i>
<i>4.4. Dosis adecuada de irradiación para las variedades en estudio</i>	<i>92</i>
<i>5. CONCLUSIONES.....</i>	<i>93</i>
<i>6. RECOMENDACIONES.....</i>	<i>94</i>
<i>7. BIBLIOGRAFIA.....</i>	<i>95</i>

INDICE DE CUADROS

	Pág.
<i>Cuadro 1. Clasificación de las inflorescencias según su forma.</i>	22
<i>Cuadro 2. Composición del medio Murashige Skoog (MS),1962</i>	53
<i>Cuadro 3. Medios de cultivo de multiplicación utilizados para la primera etapa de la investigación.....</i>	55
<i>Cuadro 4. Dosis de irradiación de las vitroplantas con la Bomba de Cobalto -</i>	60 58
<i>Cuadro 5. Velocidad de crecimiento de la variedad Reguire en el Medio 1 (MS + 0,8ppm Kin/l¹ + 0,05 ppm AIA/l¹); Medio 2 (MS+2mgkin/l¹+4mgAIA/l¹) y Medio 3 (MS + 0,1mgBAP + 0,01mgANA/l¹) a los 7, 14 y 21 días.....</i>	66
<i>Cuadro 6. Velocidad de crecimiento de la variedad Vega en el Medio 1 (MS + 0,8ppm Kin/l¹ + 0,05 ppm AIA/l¹); Medio 2 (MS+2mg kin/l¹+4mgAIA/l¹) y Medio 3 (MS + 0,1mgBAP + 0,01mgANA/l¹) a los 7, 14 y 21 días.....</i>	69
<i>Cuadro 7. Altura, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento de vitroplantas de la Variedad Reguire y Vega en diferentes medios de cultivo a la tercera semana de evaluación.....</i>	72
<i>Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable altura de planta.....</i>	73
<i>Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable número de nudos.....</i>	75
<i>Cuadro 10. Análisis de varianza para la variable número de brotes.....</i>	77
<i>Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable grado de enraizamiento.....</i>	78
<i>Cuadro 12. Supervivencia y comportamiento morfológico de las variedades de crisantemo Reguire y Vega por efecto de diferentes dosis de irradiación a la cuarta semana de evaluación.</i>	80

<i>Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable altura</i>	<i>84</i>
<i>Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable número de nudos.....</i>	<i>85</i>
<i>Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable número de brotes.....</i>	<i>87</i>
<i>Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable grado de enraizamiento.....</i>	<i>88</i>
<i>Cuadro 17. Dosis óptimas de irradiación de la variedad Reguire y Vega con Co-60 para la inducción de mutaciones.</i>	<i>92</i>

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1. Inflorescencias de la variedad Reguire (a) y Vega (b).....</i>	51
<i>Figura 2. Porcentaje de contaminación y supervivencia, a los 7 días de la introducción in vitro de explantes de la variedad Reguire y Vega.....</i>	64
<i>Figura 3. Comportamiento del crecimiento (altura, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento de la variedad Reguire en los medios: Medio 1 (MS + 0,8ppm Kin/l¹ + 0,05 ppm AIA/l¹); Medio 2 (MS+2mgkin/l¹+4mgAIA/l¹) y Medio 3 (MS + 0,1mgBAP + 0,01mgANA/l¹) a los 7, 14 y 21 días.....</i>	67
<i>Figura 4. Comportamiento del crecimiento (altura, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento de la variedad Vega en los medios: Medio 1 (MS + 0,8ppm Kin/l¹ + 0,05 ppm AIA/l¹); Medio 2 (MS+2mgkin/l¹+4mgAIA/l¹) y Medio 3 (MS + 0,1mgBAP + 0,01mgANA/l¹) a los 7, 14 y 21 días.....</i>	70
<i>Figura 5. Altura promedio de las vitroplantas de dos variedades de crisantemo (Reguire y Vega) bajo el efecto de tres medios de cultivo (M1 = MS+0,8ppm kinetina/l¹+0,05ppm AIA/l¹ M2 = MS+2mg kinetina/l¹+4mgAIA/l; M3 = MS+0,1 mgBAP/+0,01mgANA/l¹). Duncan al (1%).</i>	74
<i>Figura 6. Efecto de los medios de cultivo (M1=Ms+0,8ppm kinetina/l¹+0,05ppm AIA/l; M2=Ms+2mg kinetina/l¹ +4mg AIA/l¹; M3= Ms + 0,1mg BAP/+0,01mgANA/l¹) en la variable número de nudos a la tercera semana de evaluación. Duncan al 1%.</i>	76

Figura 7. Efecto de los medios de cultivo ($M1=Ms+0,8ppm$ kinetina/ $t^1+0,05ppm$ AIA/ l ; $M2=Ms+2mg$ kinetina/ $t^1 +4mg$ AIA/ t^1 ; $M3= Ms + 0,1mg$ BAP/ $+0,01mgANA/t^1$) en la variable número de brotes a la tercera semana de evaluación. Duncan al 1%.....	61
Figura 8. Efecto de los medios de cultivo ($M1=Ms+0,8ppm$ kinetina/ $t^1+0,05ppm$ AIA/ l ; $M2=Ms+2mg$ kinetina/ $t^1 +4mg$ AIA/ t^1 ; $M3= Ms + 0,1mg$ BAP/ $+0,01mgANA/t^1$) en la variable grado de enraizamiento a la tercera semana de evaluación. Duncan al 1%.....	79
Figura 9. Comportamiento morfológico de la variedad Reguire por efecto de diferentes dosis (0 = testigo, 15, 30 y 45 Gy) de irradiación a la cuarta semana de evaluación	65
Figura 10. Comportamiento morfológico de la variedad Vega por efecto de diferentes dosis (0 = testigo, 15, 30 y 45 Gy) de irradiación a la cuarta semana de evaluación.....	82
Figura 11. Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en la altura de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%).	84
Figura 12. Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en el número de nudos de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%).	86
Figura 13. Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en el número de brotes de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%)......	87

- Figura 14.** *Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en el grado de enraizamiento de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%).*..... **89**
- Figura 15.** *Dosis letal media (DL-50) de irradiación para la variedad Reguire.* **90**
- Figura 16.** *Dosis letal media (DL-50) de irradiación para la variedad Vega.*..... **91**

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, crisantemos de variados colores, formas y con otras características son el resultado de diferentes trabajos de investigación obtenidas por hibridación, mutación espontánea e inducida, así como selección. A través de técnicas convencionales esto hubiera sido imposible de obtener en tiempos relativamente cortos. Trabajos de mutación inducida representa una buena posibilidad para encontrar material genético de importancia en la explotación comercial.

Bolivia es considerada como un país con potencialidad para la exportación de flores, actualmente la misma es aún deficiente. Sin embargo esta situación posiblemente cambie a mediano plazo, ya que muchas empresas dedicadas a la floricultura están diversificando e incrementando sus volúmenes de producción, debido a que existe un mercado aún insatisfecho.

En la ciudad de La Paz, la demanda de las flores de corte depende además del precio, de las preferencias cualitativas que tienen los consumidores sobre el producto como ser el tamaño, largo-grosor del tallo, la forma-color de pétalos y el comportamiento en la etapa de post-cosecha.

En la producción de flores y plantas ornamentales la micropropagación por técnicas como cultivo de tejidos *in vitro* está causando un gran impacto a escala mundial. Las especies utilizadas para ese fin pueden ser herbáceas ó arbustivas y son propagadas tradicionalmente por vía vegetativa.

En el país se produce diferentes flores entre ellas principalmente rosa, clavel, crisantemo y otros.

El crisantemo es una flor de corte y tiene importancia en el mercado tanto, a nivel local como externo, posee variedades de mucho interés comercial en cuanto a

formas y colores, tienen mayor duración en la etapa de post-cosecha y se la puede comercializar durante todo el año.

Los crisantemos son propagados vegetativamente por yemas laterales enraizadas a través de sucesivas propagaciones, en esas condiciones la aparición de virus y otros patógenos es muy alta repercutiendo en su producción. Contar con un sistema que asegure una buena calidad sanitaria de las plantas y al mismo tiempo que ofrezca una alta tasa de multiplicación es muy importante, todo ello es posible a través de cultivo de meristemas (técnica de cultivos *in vitro*).

En otros ámbitos el mejoramiento genético de especies ornamentales es constante para la obtención de nuevos genotipos con características interesantes tanto desde el punto de vista fenotípico como genotípico.

Las mutaciones inducidas en especies ornamentales con rayos gamma (Co-60) han dado buenos resultados en el fitomejoramiento de plantas, ya que por estos procesos se pueden seleccionar y obtener nuevos genotipos con buenas características.

Bajo estos antecedentes en el presente trabajo de investigación los objetivos planteados fueron los siguientes:

OBJETIVOS.

Objetivo general

- Determinar el efecto que produce la irradiación con rayos gamma (Co-60) en dos variedades de crisantemo (*Chrysanthemum sp.*) para la obtención de genotipos mutantes con características deseables.

Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta morfológica de dos variedades de crisantemo a tres medios de cultivo para su multiplicación.
- Determinar la dosis letal media (DL-50) de irradiación para las dos variedades de crisantemo.
- Establecer la dosis adecuada de irradiación para la inducción de mutación en dos variedades de crisantemo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características generales del cultivo

A continuación se tocan los puntos más importantes del cultivo de crisantemo y su importancia económica para la agricultura.

2.1.1. Origen

Salinger (1991), menciona que el crisantemo en China es empleado como ornamental desde hace más de dos mil años; su cultivo se trasladó a Japón donde se convirtió en una flor santa que recibía una veneración divina. Fue introducido en Europa a través de Francia en el último tercio del siglo XVIII.

Los primeros cultivos en España coinciden con el inicio del siglo XIX. El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo y la mayoría de las especies de donde se han generado los cultivares actuales son originarias de China: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium* y *Chrysanthemum hortorum*.

Herreros (1995), menciona que el crisantemo es considerada como flor nacional de Japón y bastante popular en Estados Unidos, Inglaterra y Alemania. La introducción a algunos países como España tardo un poco, debido a que la consideraban como flor de cementerio, por sus características de florecer en los días cortos de octubre hasta el día de “Todos los Santos”.

En algunas zonas se inicio su cultivo en los años 60 principalmente como planta madre para exportar esquejes, y mas adelante como flor cortada para exportar durante los meses de invierno.

Asocoa (2005), indica que el crisantemo es una flor que se puede encontrar todo el año, debido a que se puede programar exactamente su floración. Ahí radica su mayor importancia.

2.1.2. Clasificación taxonómica

Escandon (2001), clasifica al crisantemo en:

División	:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	:	<i>Magnoliopsida</i>
Sub - clase	:	<i>Asteridae</i>
Orden	:	<i>Asterales</i>
Familia	:	<i>Asteraceae</i>
Genero	:	<i>Chysanthemum</i>
Especie	:	<i>Chysanthemum sp</i>

2.1.3. Botánica del crisantemo

Linares (2005), menciona que, el crisantemo es una herbácea perenne de características erectas, y que se cultiva sobre todo por su espectacular floración de una amplia gama, las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas de color variable entre el verde claro y oscuro, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas.

Así mismo Linares (2005), indica que, la flor, es una inflorescencia dicotiledónea en capítulo, existen diversos tipos de capítulos cultivados comercialmente, aunque en general, esta inflorescencia esta formada por dos tipos de flores: Femeninas (radiales; corresponden con la hilera exterior en las margaritas) y hermafroditas (concéntricas corresponden con las centrales). El receptáculo es plano o convexo y esta rodeado de una envoltura de brácteas.

Cuadro 1. Clasificación de las inflorescencias según su forma.

Clasificación	Características
Sencillas	Tipo margarita. Compuestas de una o dos hileras de flores radiales y con flores hermafroditas centrales.
Anémonas	Similares a las sencillas, pero con flores concéntricas tubulares y alargadas. El color de las flores radiales y concéntricas pueden ser el mismo o no.
Recurvadas	En forma globular, con las flores radiales recurvadas hacia dentro
Reflejas	En forma redondeada con las flores radiales doblándose hacia fuera y hacia abajo.
Araña, Pluma, Cuchara, hirsuta, etc.	Las flores radiales se encorvan y son tubulares excepto en el caso de la cuchara.
Pompones	En forma globular, constituidos por flores radiales cortas y uniformes. No presenta flores concéntricas.
Decorativas	Similares a los pompones; se componen principalmente de flores radiales, aunque las hileras exteriores son más largas que las centrales, dándole a la inflorescencia una forma plana e irregular

Fuente: Linares, (2005).

2.1.4. Mercado

Linares (2005), menciona que, el crisantemo puede ser comercializado casi todo el año como flor cortada y como planta ornamental en maceta, es por eso que existen nuevas variedades en el mercado que se conservan mejor. En Europa Central, Japón y Estados Unidos, ha tenido siempre una gran demanda; lo que ha generado que los trabajos de mejora genética sean importantes; logrando así que existan numerosos cultivares con formas y colores.

Según Salinger (1991), el crisantemo es una de las especies ornamentales más cultivadas de todo el mundo, después de la rosa, el crisantemo sigue siendo la flor cortada más vendida. En cuanto a los colores el blanco es el color más vendido, con una participación en el mercado del 40%; tiene que ver con el hecho de que los crisantemos blancos se prestan mejor para pintarse, en segundo lugar están los crisantemos amarillos (31%), seguidos de los violetas (11%).

2.1.5. Clasificación de los cultivares según su respuesta fisiológica

Salinger (1991), menciona que, los cultivares pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a su respuesta ante la temperatura de crecimiento y la longitud del día (fotoperiodo).

2.1.5.1. Crisantemos de floración veraniega o temprana

Son aquellos que florecen en respuesta a temperaturas cálidas, mayores o iguales a 15°C, independientemente de la longitud del día (termopositivos). La temperatura de 15°C es la media de las temperaturas diurna y nocturna, con temperaturas diurnas que no excedan los 25°C y nocturnas superiores a 10°C.

2.1.5.2. Crisantemos de todo el año

Responden al fotoperiodo, concretamente a días cortos, y en menor medida a las temperaturas. Manipulando la longitud del día, pueden obtenerse flores en cualquier época del año. Se subdividen en grupos de respuesta, de acuerdo con el número de semanas necesarias entre la iniciación de la yema floral y la floración real. La mayoría de las flores para corte se obtienen de los cultivares de 10 a 12 semanas.

2.1.6 Cultivares de crisantemo, clasificados por la respuesta de la floración a la temperatura

2.1.6.1 Cultivares de termocero

Linares (2005), asevera que los cultivares termocero muestran poca inhibición floral entre los 10° y los 27°C, la floración se produce rápidamente a 15,5°C esa temperatura es la más adecuada para la floración de todo el año.

2.1.6.2 Cultivares termopositivos

La floración se inhibe cuando la temperatura es menor a los 15,5°C. A bajas temperaturas las yemas florales se pueden iniciar pero no se desarrollan mas allá de un estado de cabezuelas, si se mantiene la temperatura apropiada estos pueden florecer todo el año.

2.1.6.3 Cultivares termonegativos

La floración se inhibe cuando la temperatura es mayor a los 15°C, a temperaturas inferiores a 10°C pueden retardar la floración, pero no inhiben la iniciación. Se deben cultivar cuando las temperaturas nocturnas se controlen a 15°C o ligeramente por debajo, evitando el cultivo en verano.

2.1.7 Multiplicación

Linares (2005), menciona que, los crisantemos se multiplican por medio de esquejes que se obtiene de plantas madres, mantenidas bajo condiciones de día largo, para inhibir la formación de botones finales.

Herreros (1995), indica que, la multiplicación se realiza por medio de esquejes terminales partiendo de “planta madre”, seleccionada por meristemas y vitrocultivo para tenerla libre de virus.

Herreros (1995), asevera que, la multiplicación también se realiza por semillas, con la que se consiguen nuevas variedades haciendo una polinización cruzada y por división de planta que se realizan en el mes de marzo con algunas variedades.

2.1.8 Suelos

Herreros (1995), señala que los crisantemos prefieren en lo general una tierra suelta con un buen contenido en materia orgánica, un pH de 6,5 a 7 es mas tolerante a la salinidad que el rosal. Fuera de la tierra el crisantemo se cultiva también en cultivo hidropónico, con sustrato de picon (material volcánico), o en turba sola (con 10 cm de espesor) y en lana de piedra, separada del suelo por un plástico.

2.1.9 Riego

Salinger (1991), menciona que, el crisantemo es un gran consumidor de agua y de nutrientes; por tanto se debe elegir un sistema de riego localizado para mantener el sustrato próximo a la capacidad de campo. Es una de las pocas flores que se puede regar por aspersion, ya que generalmente el riego se interrumpe cuando se abren los botones florales. Los suelos se mantienen cerca de la capacidad de campo, ya que los crisantemos presentan una gran área foliar y ocupan el suelo con sus raíces.

Asocoa (2005), indica que, el crisantemo necesita mucho agua para vivir pero se debe tener precauciones por que es una planta que ante un exceso de agua llega a morir, los riegos deben ser copiosos y distanciados en el tiempo, regando en

épocas calurosas por las mañanas e incluso por las tardes, se debe pulverizar sobre las hojas al atardecer, de este modo el sol no llega a quemarlas.

2.1.10 Fertilizantes

Salinger (1991), menciona que, los crisantemos son exigentes en nutrientes especialmente, en nitrógeno y potasio. Durante los primeros meses de crecimiento es importante mantener niveles altos de nitrógeno para obtener flores y plantas de calidad.

Herreros (1995), indica que, al crisantemo se debe aplicar nitrógeno en forma nítrica y amoniacal como el nitrato amónico (33% N) colocando la mitad durante las dos primeras semanas y la otra mitad durante las dos últimas (antes de cortar la flor). El potasio a partir de la tercera semana (dependiendo del análisis de la tierra).

2.1.11. Necesidades nutricionales del cultivo

Linares (2005), asevera que, las necesidades de elementos, para un óptimo crecimiento y desarrollo de la planta, son: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, cobre, boro, molibdeno, zinc y manganeso.

2.1.12 Reguladores de crecimiento

Herreros (2005), menciona que, se pueden emplear las giberelinas para evitar que los tallos queden pequeños y se utilizan al atardecer en tratamientos dirigidos hacia la parte alta de la planta, en dosis de 25 a 100 ppm. En caso de repetición se debe combinar con nitrato potásico al 0,25% o con un abono foliar para evitar que las hojas nuevas queden muy pálidas.

Linaires (2005), indica que, para el aumento de la longitud del tallo pueden emplearse giberelinas, en forma de ácido giberélico. Para el inicio de la raíz la hormona mas utilizada es el ácido indol-butírico (AIB) mezclado con talco. La iniciación floral puede inhibirse con la aplicación de etileno.

2.1.13 Plagas y enfermedades más frecuentes en el crisantemo

Linaires (2005), señala que, los crisantemos son plantas que se ven afectadas por numerosas plagas y enfermedades, debiendo mantener un especial énfasis en la sanidad, ya que es importante tanto la calidad de las flores como de las hojas, por lo que es importante realizar un programa de manejo integrado de plagas y enfermedades ya que en la agricultura la prevención es la base del éxito. La información aquí descrita es una recopilación de experiencias de profesionales y técnicos especialistas en el ramo:

2.1.13.1. Mosca del crisantemo (*Liriomyza trifolii*)

La larva se desarrolla en el follaje del crisantemo, teniendo preferencia por el haz de las hojas. Su presencia se detecta por las minas serpenteantes en el follaje. A través de la epidermis es fácil observar las larvas y el excremento que van depositando a lo largo de la galería.

2.1.13.2. Nematodo del crisantemo (*Aphelencoides ritzemabosi*)

Los nematodos de las hojas, se diseminan por los estomas junto con las salpicaduras de agua, causando lesiones angulares, que van de color verde oscuro, a café en las hojas y se extienden de abajo hacia arriba. Los nematodos de la raíz, succionan la savia de las raíces, produciendo tumores (agallas) y debilitando así a las plantas.

2.1.14. Enfermedades

Según Herreros (1995), el crisantemo al igual que otros cultivos tiene diferentes enfermedades como ser la pudrición de la raíz (*Pythium sp.*), pudrición del tallo (*Rhizoctonia solani*), botritis o podredumbre gris (*botritis cinerea*), sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*), mycosphaerella liculicola (*Ascochyta chrysanthemi*), mancha foliar (*Septoria obesa*), roya (*Puccinia chrysantemi*), oidio (*Erysiphe cichoracearum*), tizón rayado (*Stemphylium sp.*), *agrobacterium tumefaciens*, *pseudomonas cichorii*.

Entre otros patógenos de importancia agronómica se considera el ataque de algunos virus como son el viroide del achaparramiento del crisantemo, el virus de la aspermia del crisantemo o *Chrysanthemum aspermy cucumovirus* (CAV) y virus del mosaico del crisantemo o *Chrysanthemum mosaic-B (Q) carlavirus* (CVB).

2.2 Cultivo de tejidos

Roca (1991), establece que, el cultivo de tejidos como técnica consiste en aislar una porción de la planta (explante) y cultivar asépticamente en un medio y proporcionar artificialmente las condiciones químicas y físicas.

López (1990), señala que, el cultivo de tejidos consiste en cultivar diferentes partes de la planta en un medio adecuado a través de las técnicas *in vitro* bajo condiciones asépticas.

Huang y Murashige (1988), indican que, el cultivo de tejidos vegetales hoy en día es ampliamente utilizado tanto en la agricultura como en la botánica, es un método establecido para una propagación clonal de plantas y para lograr la eliminación de patógenos. Sirve como una ayuda y alternativa en la hibridación y como una nueva fuente de germoplasma para el mejoramiento de plantas.

2.3 Medios de cultivo

Mejía (1988), menciona que, los medios de cultivo deben ser preparados con sumo cuidado ya que los diversos productos que lo forman intervienen en cantidades pequeñas. Un adecuado medio de cultivo debe contener sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos y otros suplementos orgánicos, los que varían ampliamente respecto a su composición y concentración.

Herrera (1985), indica que, los medios de cultivo son preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas que constituyen los elementos más importantes como ser los macronutrientes y micronutrientes de los microorganismos en condiciones de laboratorio.

López (1990), asevera que, el medio de cultivo contiene elementos importantes como los macronutrientes y micronutrientes que necesitan las plantas para un crecimiento adecuado además de carbohidratos, (sacarosa) para remplazar el carbono, que la planta normalmente fija de la atmósfera por medio de la fotosíntesis, y para obtener mejores resultados se debe incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades, como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento.

López (1990), menciona que, los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

2.3.1. Sales inorgánicas

- a) Macronutrientes**, constituidos principalmente por el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre.

- El nitrógeno, se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en forma de nitrato o iones de amonio, o la combinación de ambos iones.
- El sulfato de magnesio, ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre.
- El fósforo, puede adicionarse en cualquiera de las formas; fosfato ácido de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ó fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4).
- El potasio, se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza es un catión que se agrega en forma de cloruro de potasio (KCl), nitrato de potasio (KNO_3) ó fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4).
- Calcio, se adiciona con cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ó nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

b) Micronutrientes, los más esenciales son: hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno.

- Hierro es requerido para la formación de precursores de la clorofila.
- El manganeso necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético.
- El cobre y el zinc son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenolitos.
- El molibdeno y hierro forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa.
- El cobalto es el metal componente de la vitamina B_{12} .
- El boro es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática.

2.3.2. Vitaminas

Son necesarias para llevar una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridos en pequeñas cantidades.

- Tiamina (Vitamina B₁), se añade como tiamina-HCl en cantidades que varían de 0,1 a 30 mg/l, vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.
- Ácido Nicotínico (Niacina).
- Piridoxina (Vitamina B₆), se añade como piridoxina-HCl.
- Ácido Pantoténico, ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.
- Ácido fólico, disminuye la proliferación del tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzoico.
- Riboflavina, inhibidor del crecimiento de raíces.
- Vitamina E, ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células.

2.3.3. Reguladores de crecimiento

Constituidos de cuatro grupos que son: las auxinas, citocininas, ácido giberélico y ácido abscísico.

a) Auxinas, ayudan a la elongación de las células y promueven la división celular en el cultivo de tejidos y están incluidos: el AIA (ácido indol-acético) y el AIB (ácido indol-butírico) que se utiliza en un rango de 0,1 – 10 mg/l; el ANA (ácido naftalen-acético) se utiliza en concentraciones levemente mayores de (1 a 10 mg/l), con un punto óptimo cerca de 2 mg/l. 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), PCA (ácido paraclorofenoxiacético) que se utiliza en una rango de 0,001 – 10 mg/l.

b) Citocininas, promueven la división celular y organización de callos. Las más utilizadas son: BA benciladenina; cinetina y zeatina, en concentración de 0,003 – 30 mg/l. La BA es la citocinina de empleo más generalizada. La cinetina estimula la formación de brotes y de yemas adventicias.

Roca (1991), indica que, la kinetina es una sustancia estimuladora de la división celular, no se ha demostrado que este presente como un compuesto natural y generalmente se reconoce como un artefacto. Otra citocinina el BAP se utiliza actualmente tal vez más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente, a un costo más o menos razonable. Cuando se usa KIN en concentraciones de alrededor de 0,1 a 2 mg/l generalmente se añade AIA en concentraciones de de 0,1 a 1 mg/l.

Hartmann (1975), señala que, para la formación de yemas adventicias en cotiledones de abeto (*Pseudotsuga menziesii*) se colocan en un medio de 1ppm de BAP mas 0,001 ppm de ANA para iniciar yemas adventicias.

- c) **Ácido giberélico**, promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.

- d) **Ácido abscísico**, se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento.

2.3.4. Aminoácidos

López (1990), señala que, los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser mas rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio; también pueden actuar como agentes quelantes. Las funciones de los aminoácidos en sistemas *in vitro* son: La glutamina y la asparagina son transportadores de nitrógeno; L- arginina estimula raíces, L- serina es empleada en cultivos de microsporas y L- cisteina es un agente reductor.

Mejía (1988), menciona que, son compuestos que también intervienen como sustancias de desarrollo. Son muy importantes para la regulación de crecimiento y morfogénesis en cultivo de tejidos. Promueven la división celular y organización de callos las mas utilizadas son: bencil-adenina y cinetina.

2.3.5 Carbohidratos

López (1990), indica que, los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticas. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente y a esto le siguen la glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa, galactosa, manosa y lactosa. La concentración que se utiliza de la sacarosa es de 20 a 45 g/l.

Hurtado (1997), menciona que, la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada y se emplea a una concentración de 2 a 3 %; sin embargo en otras especies se emplea concentraciones muy elevadas (5 a 12%).

Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies.

2.3.6. Agentes gelificantes

López (1990), señala que el agar es como un sistema de soporte que generalmente se utiliza para la preparación de medios sólidos o semisólidos y las ventajas que presenta son:

- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C es decir que el gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Roca *et al.* (1991), señalan que, el agar es un agente gelificante que comúnmente se utiliza en medios sólidos entre los 0,6 y 1,0 %. Se han empleado otros compuestos y pocos han tenido éxito, el que mas popularidad a alcanzado es el “Gelrite” por ser menos costoso que el agar.

2.3.7. Agua

López (1990), menciona que, el agua es uno de los componentes químicos más importantes del medio de cultivo, aunque esta sea relativamente pura, puede contribuir con más impurezas al medio de cultivo. El método más común para liberar el agua de tales impurezas es la destilación.

Roca *et al.* (1991), indica que, el agua con alto grado de pureza y doblemente destilada es esencial para la preparación de medios de cultivo y para enjuagar el material de cristalería. Pero también puede ser una fuente potencial de impurezas que afecte al crecimiento de plantas *in vitro*.

2.4. Preparación de soluciones stock

Uria (1994), indica que, la preparación de medios de cultivo es continua, lo cual resulta ser incomoda al estar pesando constantemente. Para esto se recurre a la preparación de soluciones stock o soluciones madre, que son soluciones con concentraciones más altas de lo normal, de las cuales se toman medidas cabales que luego son diluidas.

El procedimiento debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Al preparar las soluciones stock, las sales se deben disolver por separado.
- No se deben mezclar sulfatos con fosfatos para evitar que se precipiten.

- La solución stock de hierro debe ser guardada en frasco color ámbar puesto que éstas se llegan a precipitar con la luz directa.
- Las soluciones stock de vitaminas deben ser guardadas en congelación, las otras soluciones se deben guardar en refrigeración a 4°C.

2.5. Preparación de Medios de Cultivo

Roca *et al*, (1991), menciona que, para el preparado del medio se debe tener agua destilada, y dependerá en primera instancia del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. En general se pueden distinguir:

- Incorporación del medio basal, de los reguladores de crecimiento o de otros compuestos. Ajuste del pH.
- Adición y disolución del agar. Distribución en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas petri, magentas, etc.).
- Esterilización en autoclave.

2.6. Explante

Roca *et al*, (1991), señala que la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, y esta determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

Ochoa (1990), indica que el explante constituye la fuente inicial para el establecimiento de los cultivos. Comúnmente se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas.

Lucas (2004), señala que los explantes mayores son a veces mas difíciles de regenerar que los pequeños., quizás debido a la presencia de una mayor cantidad

de reservas alimenticia. Por otro lado los explantes pequeños presentan una superficie lesionada relativamente mayor, cosa que se ha demostrado que promueve la regeneración en el caso de los catáfilos de azucena.

2.7. Micropropagación

Zamudio (2005), señala que, la micropropagación es la” multiplicación conforme” de individuos selectos, que es llevada a cabo *in vitro* a partir de embriogenesis somática (embriones de células no sexuales).

Calderón (1990); citado por Pereira (1999), señala que, la micropropagación es obtener un gran número de plantas por fracción de un tejido u órgano que se extrae de la planta en un periodo corto.

Roca et al., (1991), indica que, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro*, cultivando asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta.

La micropropagación ofrece las siguientes ventajas:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- 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.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos.

2.7.1. Métodos de micropropagación

Lucas (2004), indica que existen dos métodos para la micropropagación y estas son:

a) Esquejes de segmentos nodales

Con este nombre se conoce el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más natural de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro*.

b) Método de las yemas axilares

En principio este método es muy similar al de los segmentos nodales; siendo la diferencia más importante el que en este último caso se utilizan casi exclusivamente plantas con tallos largos, ya que generalmente no se necesitan las citoquininas para el desarrollo de las yemas.

Cuando se utiliza el método de las yemas axilares, se aísla un ápice del vástago, a partir del cual se desarrollan las yemas axilares, de las axilas de las hojas, bajo la influencia de una concentración relativamente alta de citoquininas. Esta elevada concentración de citoquininas frena la dominancia apical y permite el desarrollo de las yemas axilares.

2.8. Factores físicos

Eyerbe (1990); citado por Pereira (1999), indica que, se conoce poco sobre la influencia de la humedad de la cámara de crecimiento, sobre el desarrollo y crecimiento *in vitro*, la humedad de la cámara de crecimiento probablemente sólo influirá en la pérdida de agua desde los tubos, sin embargo una elevada humedad en la cámara produce como resultado una mayor cantidad de infecciones.

Abdelnour y Vincent, (1994). En condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es casi el 100 %, por eso la planta *in vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas y cutícula.

2.8.1. Intercambio gaseoso

(Bergmann, 1987), señala que, los gases mas corrientes son: el oxígeno y el dióxido de carbono, que proporciona una buena aireación, siendo importante para el crecimiento de células y tejidos, el oxígeno facilita la formación de órganos, pero especialmente la formación de raíces adventicias; en medio líquido el oxígeno es mas fácil de obtener pero por lo general se obtiene con dificultad cuando se encuentra en medio sólido (agar), la formación de raíces resulta mucho mas fácil en medios líquidos.

2.8.2. Luz

Silva (1990); citado por Pereira (1999), afirma que la luz influye en el metabolismo de las células, promueve la iniciación y el crecimiento de la parte aérea de la planta, se debe proporcionar luz por medio de lámparas fluorescentes de tipo Gro lux o blancas similares con intensidad de 300 a 10000 lux.

Lucas (2004), indica que la luz generalmente tiene un efecto negativo sobre la formación de raíces, las plantas que han sido cultivadas en la oscuridad, enraízan con más facilidad que las crecidas en luz.

2.8.3. Temperatura

Roca *et al*, (1990), indica que la temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28°C. Se han variado los regimenes de temperatura en el día y en la noche, y se ha encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa. La formación de raíces adventicias es estimulada generalmente por elevadas temperaturas

2.9. Factores químicos

2.9.1. pH

Abdelnour; (1994), señala que, el grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo, es importante y específico para cada tipo de planta, al igual que ocurre en el suelo, es necesario ajustar el pH a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo el pH adecuado estará en un rango de 4,5 a 7,0.

2.10. Cultivo de Meristemos

Lucas (2004), indica que, para la realización es aconsejable usar vástagos en crecimiento, siempre que sea posible, cuando se vaya a hacer cultivos de meristemos, cuando el meristemo que se va a aislar está activo (compuesto de una zona meristemática y una sub-apical que crece rápidamente), la posibilidad de eliminar virus es mayor. Aunque en principio todos los meristemos de vástago de una planta son adecuados como material inicial, en realidad, la posibilidad de éxito depende del tipo de yema o vástago (terminal o axilar) y/o de la posición de la yema (basal o terminal).

Lozoya (1990), indica que, los términos “meristemos” y “ápices” debe estar condicionado al tamaño del inoculo y al tipo de tejido contenido en el .Anatómicamente el meristemo consiste del domo (células no diferenciadas de

carácter embrional), y con dimensiones no mayores de 0,1 mm de longitud. Ápices meristemáticos se refiere entonces al domo, con uno o varios primordios foliares y de tamaño variable.

Andrada (1997), menciona que el desarrollo de ápices *in vitro* a contribuido significativamente al conocimiento a aplicación practica en tres aspectos: a) estudio del funcionamiento del meristemo; b) multiplicación masiva de clones; c) obtención conservación y establecimiento de plantas libres de patógenos.

2.11. Producción de plantas libres de hongos y de bacterias por cultivos de meristemas

Zamudio (2005), indica que se pueden obtener también plantas libres de hongos y de bacterias por el cultivo de meristemas. Los géneros importantes de bacterias que se pueden eliminar son: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Bacillus*. Los géneros mas importantes de hongos son: *Fusarium*, *Verticillium*, *Phialophora* y *Rhizoctonia*. Se puede utilizar un medio rico en nutrientes, en algunas ocasiones conteniendo peptona, triptona y extracto de levadura, para determinar de una forma rápida si una planta esta libre o no de bacterias y hongos.

2.12. Producción de plantas libres de virus

Lucas (2004), menciona que una de las características necesarias para la propagación es que las plántulas obtenidas deben estar libres de virus. Se sugiere que por medio del cultivo de meristemas, se obtienen de forma automática plantas libres de virus, pero en realidad no ocurre así. Las investigaciones llevadas a cabo por Moore (1960), con *Cymbidium* demostraron que se obtenían plantas libres de virus, sólo en el caso de que se utilicen meristemas (de aprox. Un 1 mm) con dos primordios foliares. El clonado que se hace actualmente, con porciones apicales de vástago mucho más grande que las utilizadas por Moore, tiene pocas probabilidades de producir plantas libres de virus.

Existen 5 métodos utilizados para producir plantas libres de virus:

a) Tratamiento por calor

El tratamiento por calor es un método eficaz de inactivar algunos virus. El tratamiento por calor es eficaz solamente contra virus isométricos y contra los micoplasmas. El hecho de que el tratamiento por calor sea a veces ineficaz, puede ser debido a que la planta sea demasiado sensible al calor, o que los virus y micoplasmas no sean afectados por el calor, por razones desconocidas. Se debe elegir una temperatura y tiempo de tratamiento tales que la planta (vástago, rama) sea capaz de sobrevivir, pero que permita la inactivación del virus. Este método suele producir un porcentaje relativamente alto de plantas libres de virus.

b) Cultivo de Meristemos

Para la realización es aconsejable usar vástagos en crecimiento, siempre que sea posible, cuando se vaya a hacer cultivos de meristemos, cuando el meristemo que se va a aislar está activo (compuesto de una zona meristemática y una sub-apical que crece rápidamente), la posibilidad de eliminar virus es mayor. Aunque en principio todos los meristemos de vástago de una planta son adecuados como material inicial, en realidad, la posibilidad de éxito depende del tipo de yema o vástago (terminal o axilar) y/o de la posición de la yema (basal o terminal).

c) Tratamiento por calor y cultivo de meristemos

Para aumentar las posibilidades de obtener plantas libres de virus en los casos difíciles (especialmente cuando hay más de un virus presente), se da con frecuencia por calor, al principio del cultivo de meristemos; así se puede disminuir la concentración de virus y/o aumentar la zona libre de

virus. La duración del tratamiento por calor (35 - 38 °C) puede ser entre 5 y 10 semanas.

Este procedimiento ha sido utilizado con éxito en papa, crisantemo, clavel y fresa. Morel aconsejó que se almacenen los tubérculos de papa, a 37°C, durante un mes, antes de iniciar el cultivo de meristemos.

d) Formación de vástagos adventicios, seguida de cultivo de meristemos.

La obtención de plantas libres de virus, por el método de los vástagos adventicios *in vitro*, ha tenido éxito con azucena y también jacinto. Los explantes de brácteas de azucena, infectados con virus, regeneran bulbillos *in vitro*; cuando el tamaño de los meristemos es de alrededor de 1mm se transfieren a otro medio para su posterior desarrollo.

Hakkaart *et al.* (1983); citado por Lucas (2004), indicaron que utilizando el método de vástagos adventicios, combinando con el del cultivo de meristemos, se podían producir plantas de Kalanchoe. Yucatan, libres de síntomas de virus. El método de los vástagos adventicios, se utiliza de diferente forma, para obtener plantas libres de virus, con algunas otras especies como petunia, tabaco y col.

e) Plantas libres de virus obtenidas a partir de callos y protoplastos.

Cooper (1962); citado por Lucas (2004), demostró que, después de unos cuantos repicados, los callos de tabaco puedan quedar libres de virus; aparentemente los callos pueden escapar a la infección vírica; las células meristemáticas, activas y jóvenes, son mucho más resistentes al TMV que la células mas viejas e inactivas. Los resultados de la investigación de Cooper, fueron mas tarde corroborados por Chandra y Hildebrandt (1967);

citado por Lucas (2004), quienes aislaron anteras de *Pelargonium*, y obtuvieron de ellas callos y plántulas que resultaron libres de virus.

Sin embargo, es poco realista pensar que la producción de plantas libres de virus, por medio de callos y protoplastos, pueda tener importancia práctica, ya que en este tipo de cultivos las mutaciones son muy frecuentes.

2.13. Cultivos *in vitro* en flores

Roca *et al.*, (1991) menciona que, el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro*. En flores y plantas ornamentales la micropropagación en escala, ha causado un gran impacto en la producción. En el campo las especies estas sujetas a estrés ambientales o ataque de plagas y enfermedades que pueden comprometer seriamente la calidad de la muda. La multiplicación *in vitro* continua siendo una técnica poderosa con ejemplos reales en la agro floricultura.

Villalobos, *et al.*, (1991), menciona que, la multiplicación intensiva de plantas empleando las técnicas desarrolladas *in vitro* ha sido una poderosa herramienta en la floricultura del siglo XX.

2.14. Introducción del material vegetal de crisantemo

Roca *et al.*, (1991) menciona que, los crisantemos son propagadas vegetativamente por yemas laterales enraizadas y a través de sucesivas propagaciones, la infestación de virus y otros patógenos es muy alta, y por ello es necesario contar con una buena calidad sanitaria de las plantas y al mismo tiempo ofrezca una alta taza de multiplicación, logrando a través del cultivo de ápices meristemáticos con un corte de meristemo de 0,1-0,5 mm de tamaño luego

sumergiendo en alcohol al 70% por unos segundos y luego en hipoclorito de sodio al 10% por 5 min dependiendo de la variedad y luego se enjuaga 3 veces para luego sembrar en el medio de MS (Murashige y Skoog, 1962).

Lucas (2004), menciona que, el paso previo y obligado para obtener el material vegetal libre de microorganismos es la esterilización de la superficie de éste, el proceso de esterilización puede resumirse en los siguientes pasos: Lavado del material con agua corriente, para retirar restos de tierra u otras partículas (opcional), eliminar las partes muertas e infectadas de la planta, Introducir la porción de planta en alcohol diluido al 70% durante unos segundos, luego sumergir la planta en una solución de hipoclorito de sodio (por ejemplo al 1%) durante 10-30 minutos.

La fuente más utilizada de hipoclorito de sodio es la lejía. Contiene un 5% de hipoclorito de sodio como agente activo, con lo que la solución estará formada por un 10-20% (v/v) de lejía. Para una mayor eficacia se recomienda agitar la solución mientras dura el proceso, por ultimo enjuagar el material con agua estéril para eliminar la solución de hipoclorito de sodio. El enjuague debe tener lugar bajo condiciones de asepsia, y suele realizarse en tres veces sucesivas de unos 2 minutos cada una.

2.14.1. Medio adecuado para el crisantemo

Hartmann (1975), menciona que, los ápices de las ramas se remueven sin esterilización, reteniendo el ápice y dos primordios foliares a unos 0,2 mm bajo del ápice. Este es cultivado en frascos en medio de MS más el 10 % de agua de coco ó 25 ppm de inositol mas 0,8 ppm de kinetina y 0,5 ppm de AIA en agar. Después de seis semanas los explantes son transferidos a una vasija rotatoria usando el mismo medio pero sin agar.

Atienza *et al.*, (2005), estudió la regeneración de 2 cultivares de crisantemo (Red-Reagan y Refocus) mediante vías distintas partiendo de cultivo de meristemas de plantas mantenidas en invernadero, para ello se ensayó dos medios de proliferación de distinta comparación: medio 1 = MS+0,2 mg/l BAP+0,1 mg/l de ANA y el medio 2 = MS+4 mg/l de AIA+2 mg/l de kinetina, los cultivos de proliferación se mantuvieron durante 6 meses con repicados mensuales al mismo medio de cultivo.

2.15. Mutaciones

Según Vries (1975); citado por Cruz-Coke (2003), propuso el vocablo mutación para designar los cambios grandes y discontinuos de genotipos, esto a finales del siglo XIX antes del descubrimiento de los trabajos de Mendel, y lo conceptúa como al cambio que sufre el material genético, que trae como consecuencia la formación de un genotipo alterado.

Borrego *et al.*, (1998), indica que, el mejoramiento de una especie por mutación se diferencia de otro tipo de mejora solamente en la primera fase o sea en la reacción de la variabilidad genética y provoca cambios genéticos en los materiales mediante tratamiento del material de partida con diferentes agentes mutagénicos.

Robles (1991), conceptúa a la mutación como una variación brusca que es hereditaria y que resulta por cambios en el gen o genes afectados. El término se usa más bien indefinidamente para designar mutaciones de un solo gen y deleciones, reacomodos, duplicaciones, cambios quimeras y aun cambios en el número de cromosomas.

2.15.1. Mejoramiento genético por mutaciones

Según Vries (1975); citado por Cruz-Coke (2003), indica que, las mutaciones se pueden originar de irradiaciones gamma, X u otras, ó por el uso de sustancias

mutagénicas; y se pueden provocar mutaciones en semillas o en formas de reproducción vegetativa.

El mismo autor también indica que, se han comprobado que la frecuencia de mutaciones es mayor en semillas envejecidas, pero es más recomendable que sea en semillas nuevas para asegurar mayor porcentaje de germinación.

Zamudio (2005), menciona que, al aplicar genes mutágenos (sustancias químicas o naturales, radiaciones ionizantes, etc.) a los granos, a los brotes jóvenes, a los granos de polen, o aún a las plantas enteras, se pueden obtener variaciones genéticas hereditarias por la vía sexual o transmisibles por multiplicación vegetativa. Las variantes genéticas surgen espontáneamente en la naturaleza, y son más frecuentes en ciertas especies (crisantemos).

2.15.2. Agentes mutagénicos

Robles (1991), mencionan que, existen dos tipos de agentes mutagénicos estos pueden ser: físicos y químicos.

Físicos; los cuales son capaces de ocasionar mutaciones, si estas son aplicadas en dosis exactas cuando estas se aplican en un lugar adecuado y momento oportuno dentro de estos mutágenos físicos se encuentran varios tipos de irradiaciones: como rayos X, luz ultravioleta, rayos gamma y algunas veces el efecto de centrifugación en general se clasifican en radiaciones ionizantes y no ionizantes.

Los efectos inmediatos de las radiaciones ionizantes son la fisión (ruptura) o la fusión (ligamento) de las moléculas de cadena larga como el ADN. Los rayos gamma son de longitud de onda corta y por lo tanto poseen más energía por fotón que los rayos X. El poder de penetración de los rayos gamma se obtiene de

radioisótopos como lo son el Co-60 y el Cs-137, que son las fuentes principales usadas en trabajos radiobiológicos.

Químicos; son todos aquellos productos químicos que son mutagénicos tanto en animales como en plantas y que pueden afectar solo en algunos organismos y en otros no por presentar una acción restringida a estadios específicos del desarrollo o sexo. Las más usadas son: ácido nitroso, sulfonato dietílico (DES), sulfonato de etilmetano (EMS), colchicina, etil-etano, sulfato, proflavina, nitrosaminas, gas de mostaza y otros.

2.16. Cobalto – 60

Robles (1991), menciona que, el Co-60 es un isótopo radioactivo emitido en un reactor nuclear. Para uso práctico se fabrica encapsulado en cilindros de acero inoxidable y siempre en el interior de un contenedor de plomo o hierro que blindo la radiación.

2.17. Mutaciones inducidas en crisantemos

Donini y Micke (1984), mencionan que, las mutaciones inducidas pueden ser vistas como una herramienta en el mejoramiento genético convencional o como un potencial alternativo en ciertos aspectos del cultivo. La mutación del cultivo también podría ser el método de ampliar y proveer la variabilidad genética.

Tulmann (1997), afirma que, existen diferencias en la radiosensibilidad de varias partes de la planta, la reacción de un tipo de célula va a depender de las condiciones fisiológicas, el tiempo de irradiación, así como de las condiciones pre y post irradiación. La decisión sobre la dosis debe ser hecha por el investigador de acuerdo a la parte a irradiar y el estado de desarrollo de la misma, sobre la base del conocimiento del organismo y los objetivos del programa.

Otahola *et al.*, (2001), indican, mediante registros que el crisantemo es una de las plantas donde se ha obtenido mayor número de cultivares a través de las mutaciones inducidas.

Yamaguchi (1987), reporta que, al revisar los registros sobre los cultivares desarrollados a través de las mutaciones inducidas encontró que del total de 272 nuevos cultivares ornamentales 106 corresponden a cultivares de crisantemo, lo cual nos indica la importancia de esta metodología en la obtención de cultivares mejorados.

Broertjes y Van Harten (1988), señalan que, la inducción de mutaciones en el mejoramiento de crisantemo puede ser utilizada a través de los métodos “*in vivo*” e “*in vitro*”. La técnica de irradiación “*in vivo*”, consiste en la irradiación de brotes enraizados, con posterior propagación de este material en el campo, antes del florecimiento (época de selección). Este método explora las posibilidades de irradiación de meristemos multicelulares apicales y axilares causando la aparición de sectores mutantes.

El otro método está basado en la irradiación seguido de cultivos “*in vitro*” de diversos tipos de explantes (pedicelos florales, hojas, pedicelos de botones jóvenes). La característica principal de este método consiste en la irradiación de tejidos que darán origen a yemas adventicias.

2.17.1. Obtención de colores a través de mutaciones inducidas en crisantemos

Latado (1993), indica que, las variedades de color rosa en plantas de crisantemo son las mejores para obtener mutantes de nuevos colores, seguidas de las variedades de color blanco, bronce, rojo, amarillo con rojo, salmón y naranja. Asociado a esto la selección de material para un programa de mejoramiento

genético debe tener otras características agronómicas tales como vigor, resistencia a enfermedades y déficit hídrico, alto valor comercial y otras.

2.17.2. Inducción de rayos gamma en el crisantemo a diferentes dosis

De Jong y Custer (1986), usaron una metodología de inducción de mutación “*in vitro*” en crisantemo, utilizando mutágenos físicos (rayos gamma). Los autores observaron modificaciones en el florecimiento y en la producción de la variedad “Spider” blanco comparando dos tipos de explantes (pedicelos florales y pétalos).

Matsumoto y Onozawa (1989), utilizaron rayos gamma para inducir mutaciones “*in vitro*” en crisantemo, con dosis de 3,25 a 3,50 Krad y cultivando los explantes (pedicelo) en medio MS, indicando que de 45 regenerantes sobrevivientes, 16 fueron de color de flores variables y 8 fueron mutantes no quiméricos.

Bowen (1965), realizó diferentes trabajos en plantas ornamentales comparando la eficiencia de diversos tipos de mutágenos y las dosis ideales para cada uno de ellas. La dosis óptima obtenida para trabajos de irradiación con rayos gamma en crisantemo está en el rango de 10 a 20 Gy (1,0 a 2,0 Krad).

Latado (1993), indica que, al irradiar pedicelos con dosis de 0; 6,0; 8,0; 10,0 y 12,0 Gy de rayos gamma, encontró que la dosis que reduce el crecimiento de los explantes en un 50% (GR_{50}) se encuentra cercana a 8 Gy. Al irradiar con esta dosis encontró un promedio de 5,98% mutantes para color de la flor.

Datta *et al.*, (2005), señalan que, la mutación *in vitro* en *Chrysanthemum morifolium* con dosis de 500 y 1000 rad produjo un desaceleración en la frecuencia de regeneración de vástagos tratados con rayos gamma y también influyo en la altura de planta, tamaño de hojas y flores. Mutaciones somáticas en el color y forma de la flor fueron reportadas en función a tratamientos con rayos gamma;

pero ninguna mutación fue de naturaleza quimérica. La frecuencia de mutación vario entre 10 y 20%, con una dosis de 500 a 1000 rad.

La regeneración de plantas enteras a partir de mutaciones sectoriales es la etapa más difícil dentro de todo este proceso, y una gran cantidad de mutaciones inducidas y espontáneas son perdidas debido a esa dificultad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía (UMSA), se encuentra a una altitud de 3630 msnm entre 16°30'00'' de latitud Sur y 68°80'00'' de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich (Solíz, 2004).

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material vegetal

El material vegetal para la investigación se obtuvo a partir de plantas desarrolladas en macetas de dos variedades de crisantemo: Reguire y Vega de las cuales se utilizaron solo la parte media del tallo en crecimiento.

La variedad Reguire (a) es procedente de Colombia, posee inflorescencias de color amarillo con una altura de 30 a 40 cm, su ciclo vegetativo es de 4 a 5 meses. La variedad Vega (b) también es procedente de Colombia posee inflorescencias de color rojo con una altura de 40 a 50 cm, su ciclo vegetativo al igual que la variedad Reguire es de 4 a 5 meses.

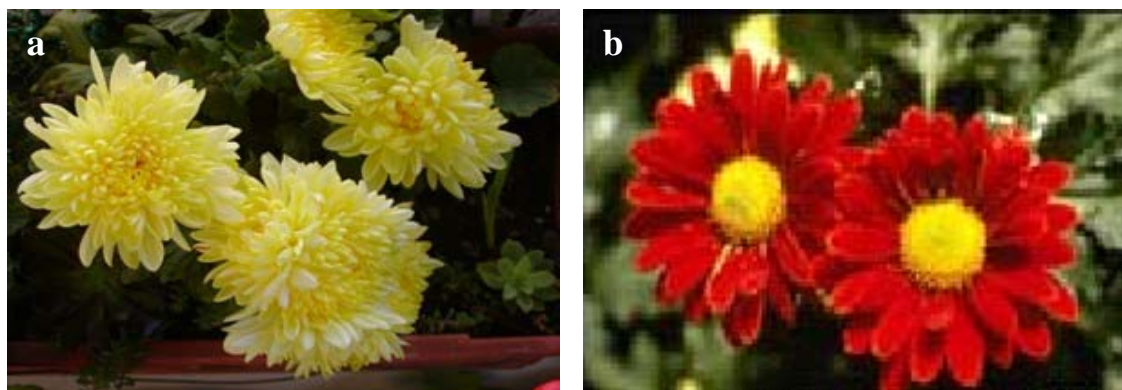


Figura 1. Inflorescencias de la variedad Reguire (a) y Vega (b)

3.2.2 Metodología

La metodología de la investigación, consistió en dos fases; en la primera parte se realizó la introducción del material vegetal a condiciones *in vitro* y la evaluación del efecto de los medios de cultivo y en la segunda parte la irradiación de vitroplantas con el uso de una bomba de cobalto – 60, según el siguiente procedimiento:

3.2.2.1 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo previamente se prepararon soluciones stock. Para ello se pesaron en una balanza analítica diferentes reactivos (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y hormonas) según las cantidades requeridas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Cuadro 2) las mismas se disolvieron por separado en agua destilada para luego depositarlos en frascos y almacenarlos en un refrigerador.

Posteriormente, de acuerdo a las necesidades a partir de las soluciones stock se prepararon los diferentes medios de cultivo en base al medio MS ajustando el pH a 5,7 en todos los casos.

Como fuente de energía se utilizó sacarosa al 3% (w/v) y para el soporte agar al 0,7% (w/v). El medio de cultivo fue dispensado según el caso en tubos de ensayo a razón de 2ml y en vasos de vidrio pequeños 5 ml.

La esterilización del medio de cultivo se realizó en un autoclave (tipo olla de presión) por un tiempo de 15 minutos a una 1 atmósfera de presión y 121°C. Los medios de cultivo e instrumentos como pinzas, bisturís, agua destilada y otros, se esterilizaron normalmente 1 día antes de ser utilizado.

Cuadro 2. Composición del medio Murashige Skoog (MS), (1962)

Compuestos	Concentración final (mg/l)	Solución concentrada	Concentración de la solución concentrada (mg/l)	Volumen de la solución concentrada para 1 l de medio (ml)
Macronutrientes				
NH ₄ NO ₃	1650.00		16500.00	
KNO ₃	1900.00		19000.00	
CaCl ₂ *2H ₂ O	440.00	A	4400.00	100
MgSO ₄ *7H ₂ O	370.00		3700.00	
KH ₂ PO ₄	170.00		1700.00	
Micronutrientes				
H ₃ BO ₃	6.20		6200.00	
MnSO ₄ *7H ₂ O	22.30		22300.00	
KI	0.83		830.00	
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.25	B	250.00	1
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.025		25.00	
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.025		25.00	
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60		8600.00	
Fuente de hierro				
Na ₂ EDTA	37.25	C	3725.00	10
FeSO ₄ *7H ₂ O	27.80		2780.00	
Vitaminas y compuestos orgánicos				
Mioinositol	100.00		10000.00	
Tiamina HCl	0.10		10.00	
Piridoxina HCl	0.50	D	50.00	10
Acido nicotínico	0.50		50.00	
Glicina	2.00		200.00	

Fuente: Murashige y Skoog (1962)

3.2.2.2. Introducción del material vegetal a condiciones *in vitro*

Para esta parte del experimento se eligieron plantas con buenas características fenotípicas, con vástagos jóvenes y que estaban en etapa de crecimiento. Con la ayuda de tijeras previamente desinfectadas se procedió a cortar explantes (esquejes de tallo medio) de 2 a 3 cm que contenían por lo menos una yema, los mismos que fueron lavados con agua del grifo.

Posteriormente los esquejes fueron trasladados a la cámara de flujo laminar donde fueron tratados para el proceso de desinfección con alcohol al 70% (v/v) por el lapso de 10 segundos, después pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 4% (v/v) durante 10 minutos y luego se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril, la inmersión en agua destilada fue de 3 minutos en cada enjuague.

Posterior a ello los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo que contenían el medio MS, el sellado se realizó con plastifilm. Posteriormente se hizo el etiquetado correspondiente y los explantes fueron incubados en la sala de crecimiento que tenía una temperatura de 23° C, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una irradiancia de 50 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$.

Establecido el material vegetal, de las vitroplantas con buena apariencia, se extrajeron meristemas de aproximadamente 1 a 2 milímetros de tamaño con el afán de controlar la posible contaminación de virus.

Posteriormente a ello del material regenerado de los meristemas se realizó 4 propagaciones sucesivas hasta obtener un número acorde de vitroplantas de crisantemo para iniciar el experimento.

De esta forma se partió de un material homogéneo y “libre de patógenos”. En trabajos de investigación de micropropagación de crisantemos, llevadas a cabo por Moore (1960), se determinó que las plantas se liberan de agentes viróticos

cuando se utilizan meristemos de aproximadamente 1 mm (con dos primordios foliares). La concentración de virus en una planta enferma disminuye al utilizar explantes de 5 mm (ápices terminales del brote) aumentando la probabilidad de obtener plantas libres de virus. La regeneración de los explantes mejora si se utilizan meristemos con dos primordios de hoja (Barba, *et al.* 2001).

3.2.2.3 Primera etapa de la investigación

a) Preparación de medios de cultivo de multiplicación

Los medios preparados para la evaluación de la capacidad de multiplicación de las variedades Reguire y Vega fueron realizados en base al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con diferentes proporciones de reguladores de crecimiento. El uso de los mismos para el experimento fue después de 24 horas de haberse preparado (Cuadro 3). La composición fue la siguiente:

Cuadro 3. Medios de cultivo de multiplicación utilizados para la primera etapa de la investigación

Medios	Formulación
A	MS + 0,8mg/l Kin + 0,05mg/l AIA
B	MS + 2mg/l Kin + 4mg/l AIA
C	MS + 0,1mg/l BAP + 0,01mg/l ANA

Fuente: Elaboración propia

En todos los casos el medio fue ajustado a un pH de 5,7, se utilizó sacarosa al 3% (w/v) y agar al 0,7% (w/v).

b) Siembra y seguimiento de los explantes de crisantemo para evaluar su comportamiento en los medios de cultivo de multiplicación

Una vez preparado los medios de cultivo en cada medio de cultivo se sembraron explantes de las dos variedades de crisantemo (Reguire y Vega). El material vegetal sembrado fue obtenido de vitroplantas desarrolladas en medio MS por 3 semanas, las mismas que tenían entre 3 a 4 cm de largo. Para ello se tomó esquejes procedentes de la parte media de la vitroplanta que tenían dos entrenudos uno de ellos fue sumergido dentro del medio de cultivo y el otro nudo se colocó solo en contacto con el medio de cultivo para facilitar el desarrollo de la vitroplanta.

La evaluación de los mismos se realizó por espacio de 3 semanas y entre las variables de respuesta tomadas para la evaluación fueron la altura, el número de nudos, brotes y grado de enraizamiento de las vitroplantas de las dos variedades de crisantemo (más adelante se explica como fue evaluado cada una de las variables de respuesta).

c) Diseño experimental

Para el análisis de los datos de la investigación se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x3 (Ostle, 1977) donde el factor A correspondió a las variedades de crisantemo y el factor B a los distintos medios utilizados. El número de repeticiones fue de 30.

Para ello se utilizó el modelo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- Y_{ij} = Una observación cualquiera
 μ = Media de la población
 α_i = Efecto de la i-ésima observación de variedades de crisantemo
 δ_j = Efecto de la j-ésimo observación de los medios de cultivo
 $(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto debido a la interacción de los factores
 ε_{ij} = Error experimental total

d) Factores de estudio

Factor A	Factor B
a1 (Variedad Reguire)	b1 (Medio de cultivo 1)
	b2 (Medio de cultivo 2)
	b3 (Medio de cultivo 3)
a2 (Variedad Vega)	b1 (Medio de cultivo 1)
	b2 (Medio de cultivo 2)
	b3 (Medio de cultivo 3)

e) Tratamientos

Tratamientos	Combinación	Descripción
T1	a1b1	Reguire x Medio de cultivo 1
T2	a1b2	Reguire x Medio de cultivo 2
T3	a1b3	Reguire x Medio de cultivo 3
T4	a2b1	Vega x Medio de cultivo 1
T5	a2b2	Vega x Medio de cultivo 2
T6	a2b3	Vega x Medio de cultivo 3

3.2.2.4. Segunda etapa de la investigación

a) Radiosensibilidad con rayos gamma (Co-60)

Para esta etapa el material vegetal utilizado se multiplicó en medio MS sin fitoreguladores de crecimiento. Una vez obtenido material suficiente los mismos se sembraron en magentas (recipientes plásticos especiales para cultivo de tejidos *in vitro*) que contenían 25ml de medio de cultivo.

Los esquejes tenían unos 5mm de tamaño y dos nudos o yemas. El número de esquejes sembrados por magenta fue de 30. Pasado dos días (48h) de preparado este material fueron trasladados al Hospital de Clínicas a la Unidad de Radioterapia donde se realizó la irradiación de las vitroplantas. El equipo utilizado para este propósito fue una Bomba de Cobalto-60 de industria Argentina; marca TERADI 800 (Sonnino 1997; Mendoza 1998).

Las dosis de irradiación de las vitroplantas fueron las siguientes:

Cuadro 4. Dosis y tiempos de irradiación de las vitroplantas con la Bomba de Cobalto - 60

Dosis de irradiación (Gy)	Tiempo de irradiación (min)
0	0 (testigo)
15	10,27
30	20,53
45	30,78

Fuente: Elaboración propia

b) Diseño experimental

El análisis de los datos se realizó bajo un diseño experimental Completamente al Azar de 2x4, en el cual al factor A fueron las variedades de crisantemo y el factor B las diferentes dosis de irradiación. Con el siguiente modelo lineal aditivo.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Una observación cualquiera

μ = Media de la población

α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento niveles de dosimetría con rayos gamma

ε_{ij} = Error experimental total

c) Factores de estudio

Factor A	Factor B
a1 (variedad Reguire)	b1 Dosis de irradiación 0 Gy
	b2 Dosis de irradiación 15 Gy
	b3 Dosis de irradiación 30 Gy
a2 (variedad Vega)	b4 Dosis de irradiación 45 Gy

d) Tratamientos

Tratamientos	Combinación	Descripción
T1	a1b1	Reguire x Medio de cultivo 1
T2	a1b2	Reguire x Medio de cultivo 2
T3	a1b3	Reguire x Medio de cultivo 3
T4	a1b4	Reguire x Medio de cultivo 4
T5	a2b1	Vega x Medio de cultivo 1
T6	a2b2	Vega x Medio de cultivo 2
T7	a2b3	Vega x Medio de cultivo 3
T8	a2b4	Vega x Medio de cultivo 4

e) Dosis letal media (DL-50) de irradiación para las variedades de crisantemo (Reguire y Vega)

Luego de la irradiación de las vitroplantas, las mismas se trasladaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía-UMSA, el material vegetal irradiado fue incubado en la sala de crecimiento en condiciones normales de luz, temperatura y fotoperiodo. El desarrollo de las vitroplantas se evaluó por 4 semanas.

A partir de los datos obtenidos a la cuarta semana se determinó la dosis letal media (DL-50) de irradiación en función a la altura desarrollada por el testigo. Para el caso la variable determinante fue la altura. En base al promedio general de altura desarrollada por el testigo se tomó la mitad de la altura y con ella se graficó una recta que interseca con la curva de altura desarrollada de los demás tratamientos y de esa manera se logró obtener la dosis óptima de irradiación para cada una de las variedades de crisantemo.

f) Variables de respuesta

Primera y segunda etapa

- **Altura;** esta variable fue cuantificada tomando en cuenta el desarrollo de la vitroplanta (vástago) a partir de la yema sembrada. Para la medición se utilizó una regla milimetrada.
- **Número de nudos;** para esta variable se cuantificó el número de nudos formados en la vitroplanta luego de la siembra del explante en el medio de cultivo. El conteo se realizó por simple observación.
- **Número de brotes;** esta cuantificación se realizó tomando en cuenta el número de brotes que se originaba a partir de la yema (nudo) sembrada. Se realizó por simple observación.
- **Grado de enraizamiento;** en vista de que es dificultoso cuantificar las raíces para esta variable se designó valores de cuantificación tomando en cuenta la siguiente escala:
 - Poco = 1 a 3 raíces
 - Medio = 4 a 6 raíces
 - Mucho = 7 a > raíces
- **Porcentaje de supervivencia;** esta variable se realizó al introducir el material vegetal durante la primera etapa de la investigación y también en la segunda parte. Los datos se tomaron contabilizando las explantes vivos y muertos luego de la introducción y posterior a la irradiación.

g) Transformación de los datos

Debido a que algunos de los datos tomados estaban fuera de la curva normal se realizó la transformación de los datos con la raíz cuadrada de X (\sqrt{X}).

Los datos de la investigación fue analizada con el paquete estadístico SSPSWIN versión 11.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con los datos obtenidos en la investigación se llegó a los siguientes resultados:

4.1. Establecimiento del material vegetal

4.1.1. Contaminación y supervivencia

Un inconveniente para el inicio de cultivo *in vitro* de cualquier material vegetal es la posible contaminación por diferentes microorganismos como virus, bacterias y hongos sistémicos. Estos patógenos normalmente están presentes en los cultivos debido a que están dispersos en el medio ambiente.

Durante la introducción de material vegetal del crisantemo existió la presencia visual de algunos contaminantes como bacterias y hongos, pero no se pudo evidenciar la presencia de virus, como indica Barba *et al.*, (2001), para este cultivo, la presencia de virus en el material vegetal representa un porcentaje considerable de las pérdidas económicas para los floricultores, ya que los síntomas ocasionados, se manifiestan luego, en la fase de floración.

En la investigación, durante la introducción del material vegetal con el propósito de controlar la contaminación y lograr un material sano los explantes fueron tratados con alcohol (70%) e hipoclorito de sodio (4%) que son ampliamente utilizados en la descontaminación de agentes patógenos externos de diferentes explantes y especies. El tamaño del explante también es importante para la eliminación de patógenos, durante el estudio se introdujeron esquejes de tallo de 5 mm de diámetro.

A los 7 días después de la introducción del material vegetal a condiciones *in vitro* se hizo la primera evaluación de la contaminación y supervivencia de explantes. Del 100% de explantes introducidos de la variedad Reguire se observó una

contaminación del 23% y el 77% de supervivencia. En la variedad Vega la contaminación fue de 33 % y la supervivencia del 67%. La contaminación que se presentó fue principalmente debido a bacterias y a los 28 días en los mismos tubos se observó alguna contaminación de hongos. Los tubos contaminados a los 28 días de evaluación fueron desechados ya que el material vegetal contenido en los mismos no es apto para la utilización posterior.

Los porcentajes de contaminación se mantuvieron durante todas las evaluaciones (14, 21 y 28 días) como se evidencia en la figura 2. La contaminación observada pudo deberse a problemas del manejo del material vegetal el cual se atribuye al técnico y otro tanto al procedimiento.

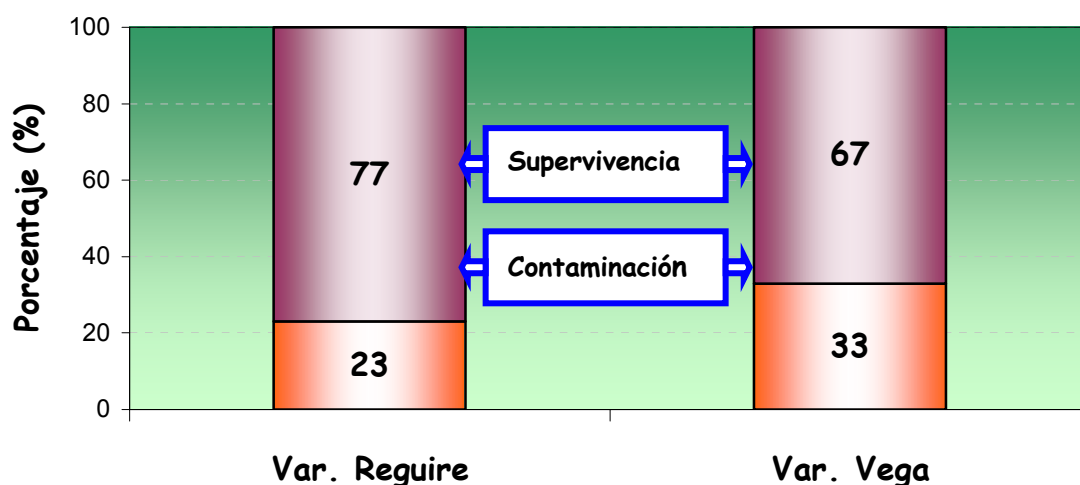


Figura 2. Porcentaje de contaminación y supervivencia, a los 7 días de la introducción *in vitro* de explantes de la variedad Reguire y Vega.

En diferentes trabajos de investigación se determinó que el mayor problema de contaminación lo presenta el técnico, muchas veces debido al poco entrenamiento otro tanto le corresponde al material vegetal ya que al estar a la intemperie y con el pasar del tiempo se va contaminando de diferentes patógenos tanto sistémicos como no sistémicos (Sonnino y Mendoza, 1998).

4.2. Efecto de los medios de cultivo en el desarrollo y multiplicación de las vitroplantas de crisantemo

El efecto producido por los medios de cultivo en el desarrollo y multiplicación de las vitroplantas fueron los siguientes:

4.2.1. Efecto de los medios de cultivo en la velocidad de crecimiento semanal de la variedad Reguire.

El efecto de los medios de cultivo en el desarrollo de las vitroplantas fue muy notorio. En el cuadro 5, se observa la respuesta de las variables altura, número de nudos, número de brotes y grado de enraizamiento a los 7, 14 y 21 días de evaluación.

Tomando en cuenta la velocidad de crecimiento se observa que en el medio 1(M1) la variable altura de vitroplanta tiene una velocidad de crecimiento de 0,6 mm/día, en el medio 2 (M2), 0,67 mm/día y 0,71 mm/día en el medio 3 (M3). Respecto a las otras variables de estudio presentaron los mismos resultados, en cada uno de los medios de cultivo se observó que el mejor medio fue el M3.

Como más adelante se menciona las dos variedades de crisantemo tienen mejor respuesta al medio 3, quizás ello se debe principalmente a un adecuado balance de fitoreguladores que posee el medio.

La variedad Reguire alcanza la mejor altura y número de nudos en el medio 3. La altura es de 38,96 mm en promedio, el número de nudos de 12,4 respecto a los medios M1 y M2 cuya altura de la variedad alcanza respectivamente 31,1 y 29,23 mm y el número de nudos 8,53 y 9,43 respectivamente.

El número de brotes y grado de enraizamiento fue muy similar en los tres medios aunque relativamente se observa un mayor desarrollo en el M3 (Cuadro 5 y figura 3).

Cuadro 5. Velocidad de crecimiento de la variedad Reguire en el Medio 1 (MS + 0,8ppm Kin/l⁻¹ + 0,05 ppm AIA/l⁻¹); Medio 2 (MS+2mgkin/l⁻¹+4mgAIA/l⁻¹) y Medio 3 (MS + 0,1mgBAP + 0,01mgANA/l⁻¹) a los 7, 14 y 21 días.

Tiempo de evaluación (días)	Variables			
	Altura (mm)	Número de nudos	Número de brotes	Grado de enraizamiento
Medio 1				
7	18,3	4,3	1,96	0,16
14	24,13	6,33	1,83	0,43
21	31,1	8,53	2,33	0,83
Velocidad de crecimiento	0,6 mm/día	0,2 nudos/día	0,02 brotes/día	0,03 raíces/día
Medio 2				
7	15,20	3,13	1,90	0,06
14	21,53	6,50	1,96	0,23
21	29,23	9,43	2,40	0,50
Velocidad de crecimiento	0,67 mm/día	0,3 nudos/día	0,02 brotes/día	0,02 raíces/día
Medio 3				
7	24,06	7,56	1,53	0,46
14	31,13	10,06	1,66	1,10
21	38,96	12,4	2,66	1,63
Velocidad de crecimiento	0,71 mm/día	0,2 nudos/día	0,05 brotes/día	0,05 raíces/día

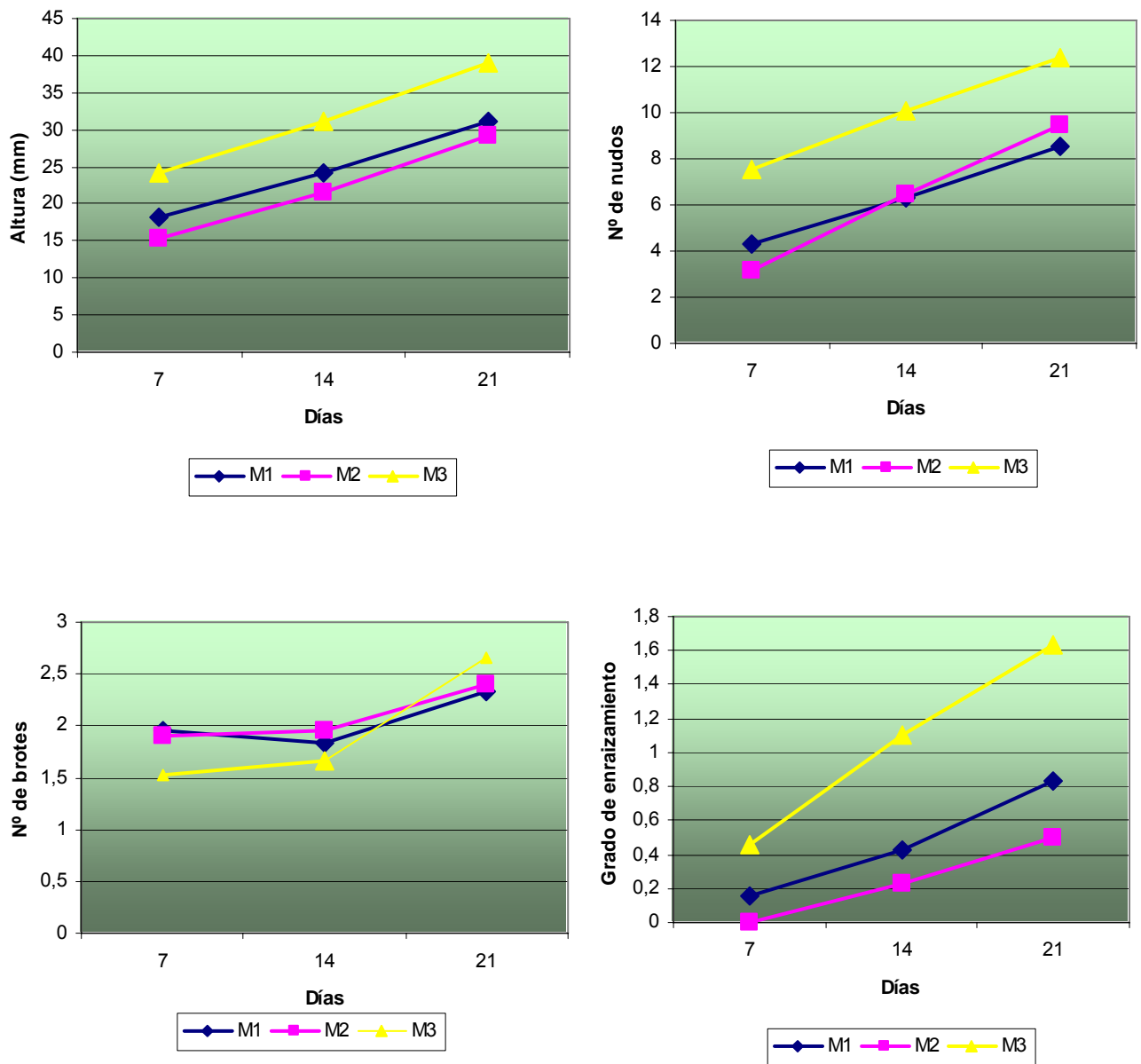


Figura 3. Comportamiento del crecimiento (altura, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento de la variedad Reguire en los medios; Medio 1 (MS + 0,8ppm Kin/l⁻¹ + 0,05 ppm AIA/l⁻¹); Medio 2 (MS+2mgkin/l⁻¹+4mgAIA/l⁻¹) y Medio 3 (MS + 0,1mgBAP + 0,01mgANA/l⁻¹) a los 7, 14 y 21 días.

En las figuras precedentes se observa gráficamente el comportamiento de las variables de estudio, en ellas al igual que el cuadro 5 los mejores valores presenta el efecto del M3, considerándose como el mas adecuado para el desarrollo en altura, número de nudos, número de brotes y grado de enraizamiento para el crisantemo.

En relación a la altura, en los tres medios de cultivo se observa un crecimiento exponencial a los 7, 14 y 21 días. Por otra parte en lo que se refiere al número de nudos también se observa el mismo comportamiento. Sin embargo en el medio 1 el número de nudos a partir de la segunda evaluación (14 días) tiene un decremento.

Respecto al número de brotes en el medio 1 se observa un ligero descenso en la segunda evaluación debido a que algunos explantes llegaron a morir. Sin embargo para la tercera evaluación nuevamente existió un aumento en el número de brotes. La mortandad de los brotes pudo deberse posiblemente a un ligero cambio en la temperatura de la sala de crecimiento. Respecto al grado de enraizamiento en los tres medios se observa un crecimiento exponencial, sin embargo el mejor medio para esta variable fue el medio 3. Más adelante se detalla el comportamiento de todas estas variables respecto al medio de cultivo.

4.2.2. Efecto de los medios de cultivo en la velocidad de crecimiento semanal de la variedad Vega.

En el cuadro 6 y figura 4 se observa el comportamiento morfológico de la variedad Vega a los 7, 14 y 21 días. Al igual que en la variedad Reguire las variables altura y número de nudos son las más representativas ya que en ellas se observan los mayores cambios por efecto del medio de cultivo. Ese comportamiento también puede deberse un tanto al genotipo. Ya que existen entre las variedades algunas que se destacan en relación a las otras debido a su carga genética.

Cuadro 6. Velocidad de crecimiento de la variedad Vega en el Medio 1 (MS + 0,8ppm Kin/l⁻¹ + 0,05 ppm AIA/l⁻¹); Medio 2 (MS+2mg kin/l⁻¹+4mgAIA/l⁻¹) y Medio 3 (MS + 0,1mgBAP + 0,01mgANA/l⁻¹) a los 7, 14 y 21 días.

Tiempo de evaluación (días)	Variables			
	Altura (mm)	Número de nudos	Número de brotes	Grado de enraizamiento
Medio 1				
7	19,90	5,26	1,73	0,03
14	24,80	8,16	1,43	0,23
21	29,43	10,56	2,16	1,86
Velocidad de crecimiento	0,45 mm/día	0,2 nudos/día	0,02 brotes/día	0,08 raíces/día
Medio 2				
7	15,23	2,23	1,80	0,00
14	20,16	6,83	2,03	0,40
21	27,60	11,33	2,33	0,93
Velocidad de crecimiento	0,58 mm/día	0,4 nudos/día	0,02 brotes/día	0,04 raíces/día
Medio 3				
7	21,16	7,43	1,26	0,70
14	27,33	9,96	1,5	1,10
21	35,86	12,36	2,16	1,70
Velocidad de crecimiento	0,7 mm/día	0,2 nudos/día	0,04 brotes/día	0,04 raíces/día

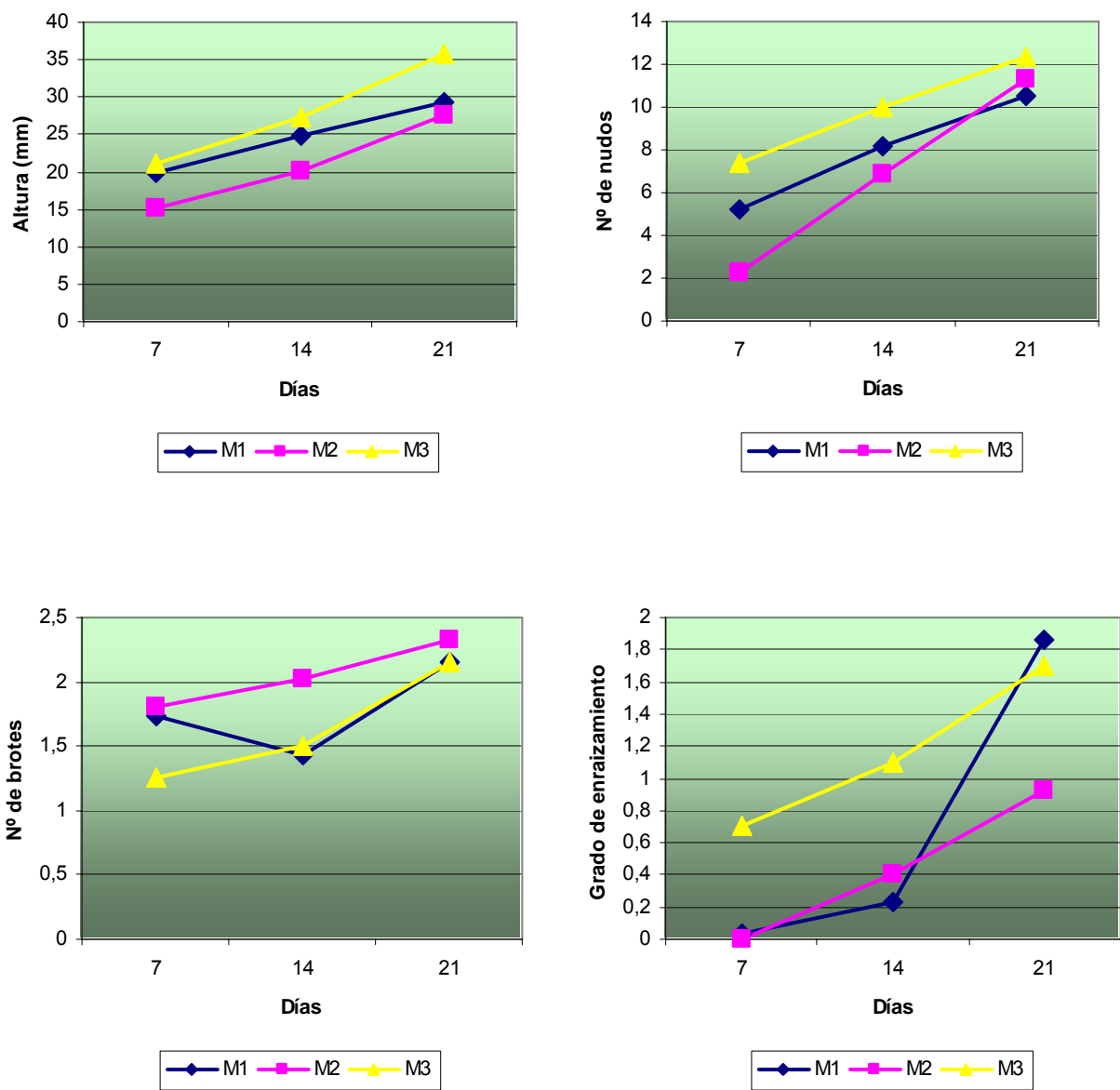


Figura 4. Figura 3. Comportamiento del crecimiento (altura, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento) de la variedad Vega en los medios; Medio 1 ($MS + 0,8\text{ppm Kin/l}^{-1} + 0,05 \text{ ppm AIA/l}^{-1}$); Medio 2 ($MS+2\text{mgkin/l}^{-1}+4\text{mgAIA/l}^{-1}$) y Medio 3 ($MS + 0,1\text{mgBAP} + 0,01\text{mgANA/l}^{-1}$) a los 7, 14 y 21 días.

La mejor altura y número de nudos se observa en el M3. La altura es de 35,86 mm en promedio, el número de nudos de 12,4 respecto a los medios M1 y M2 cuya altura de la variedad alcanza respectivamente 29,43 y 27,60 mm y el número de nudos 10,56 y 11,33 respectivamente. El número de brotes y grado de enraizamiento fueron muy similares en los tres medios.

El número de brotes tuvo un comportamiento diferente, con el tratamiento que resulto mejor fue con el medio 2; esto puede deberse al comportamiento del ácido-indol-ácetico (AIA) cuya acción podría estimular a la formación de los brotes de los crisantemos tanto en la variedad Reguire como Vega.

Realizada la valoración de la velocidad de crecimiento se observa un efecto positivo en el crecimiento de la variedad Vega en el medio M3 al término de los 21 días de evaluación. Como mas adelante se verá el efecto le corresponde mayoritariamente al medio de cultivo, en el M3 el crecimiento es mucho más elevado que en los medios 2 y 1. La proporción de los fitoreguladores del M3, pareciera ser el más adecuado para la propagación de las dos variedades de crisantemo.

Al igual que en la variedad Reguire el número de brotes para el medio 1 en esta variedad tuvo un pequeño descenso a los 14 días de evaluación debido a que algunos brotes llegaron a morir, posteriormente estos desarrollaron nuevamente de ahí que a la tercera evaluación existe un incremento del mismo que se lo podría atribuir a una baja de la temperatura en la sala de crecimiento. En los otros medios el crecimiento tuvo un comportamiento normal.

4.2.3. Comportamiento morfológico de las variedades de crisantemo por efecto de los medios de cultivo a la tercera semana

La respuesta promedio de las dos variedades de crisantemo en relación a la altura, número de nudos, número de brotes y grado de enraizamiento de las vitroplantas se observa en el cuadro 7.

Cuadro 7. Altura, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento de vitroplantas de la Variedad Reguire y Vega en diferentes medios de cultivo a la tercera semana de evaluación.

Medios de cultivo y variedad		Características evaluadas			
		Altura de (mm)	Nº nudos	Nº brotes	Grado de enraizamiento
Reguire	M1	31,1±6,19	8,53±2,41	2,33±0,80	0,83±0,79
	M2	29,23±7,34	9,43±2,44	2,40±1,10	0,50±0,62
	M3	38,96±6,02	12,40±2,23	2,66±0,71	1,63±1,61
Vega	M1	29,43±5,63	10,56±1,90	2,16±0,94	0,96±0,61
	M2	27,60±7,73	11,30±3,21	2,33±0,99	0,93±0,82
	M3	35,86±6,14	12,36±2,28	2,16±1,01	1,73±0,44

M1=MS+0,8ppmkin/l⁻¹+0,05ppmAIA/l⁻¹; M2=MS+2mgkin/l⁻¹+4mgAIA/l⁻¹; M3=MS+0,1mgBAP+0,01mgANA/l⁻¹).

A continuación se presentan los resultados de cada una de las variables estudiadas en forma individual.

4.2.3.1. Altura de vitroplanta en los medios de cultivo.

La altura promedio de las vitroplantas para la variedad Reguire en el M3, alcanzó $38,96 \pm 6,02$ mm y $35,86 \pm 6,14$ mm para la variedad Vega.

Realizado el análisis de varianza para la variable altura de vitroplanta (cuadro 8) se observa que esta variable es altamente significativa para el factor medio de cultivo en ambas variedades.

Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable altura de planta

Fuentes de variación	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Significancia
Medios de cultivo	5	23,269	4,654	12,925	**
Error	174	62,651	0,360		
Total	179	85,920			

La prueba de medias Duncan al 1% de significancia (Figura 5), reconoce 2 grupos distintos de acuerdo a la altura alcanzada por las variedades Reguire y Vega por efecto del M1 ($M1 = MS + 0,8\text{ppm Kinetina l}^{-1} + 0,05\text{ppm AIA/l}$); 2 ($M2 = MS + 2\text{mg Kinetina l}^{-1} + 4\text{mg AIA/l}$); y 3 ($M3 = MS + 0,1\text{mg BAP l}^{-1} + 0,01\text{mg ANA l}^{-1}$).

Como se había indicado anteriormente el efecto sobre el crecimiento del explante correspondió directamente al medio de cultivo, ya que la diferencia entre ellos radicó principalmente en que los dos primeros (M 1 y M 2) tuvieron como fuente de hormonas a la Kinetina (KIN) y ácido-indol-acético (AIA), mientras que el medio tres tenía 6-benzil-amino-purina (BAP) y ácido naftalen-acético (ANA), pudiéndose inferir el efecto positivo, la aplicación de BAP y ANA asociados con la mayor altura de *vitroplanta* alcanzada por la variedad Reguire.

El resultado obtenido en función a la utilización de BAP y ANA es coincidente con lo reportado por Weaver (1996), que indica que las citocininas son sustancias que

pueden ser naturales o sintéticas que provocan la división celular en ciertos tejidos vegetales al interactuar con la presencia de auxinas. Raven *et al.*, (1992) por su parte también indica que las auxinas juegan un papel importante en la regulación de la elongación celular de la misma forma las citocininas ayudan en el crecimiento de las yemas laterales.

La citocinina sola no tiene ningún efecto, o si la tiene es mínima pero al complementar con una auxina provocan una rápida división celular. Para asegurar el desarrollo y crecimiento en los tejidos vegetales es necesario que se produzca un equilibrio de las concentraciones de auxinas y citocininas en los medios de cultivo, la iniciación del crecimiento de vástagos ocurre generalmente cuando la relación auxina/citocinina es alta.

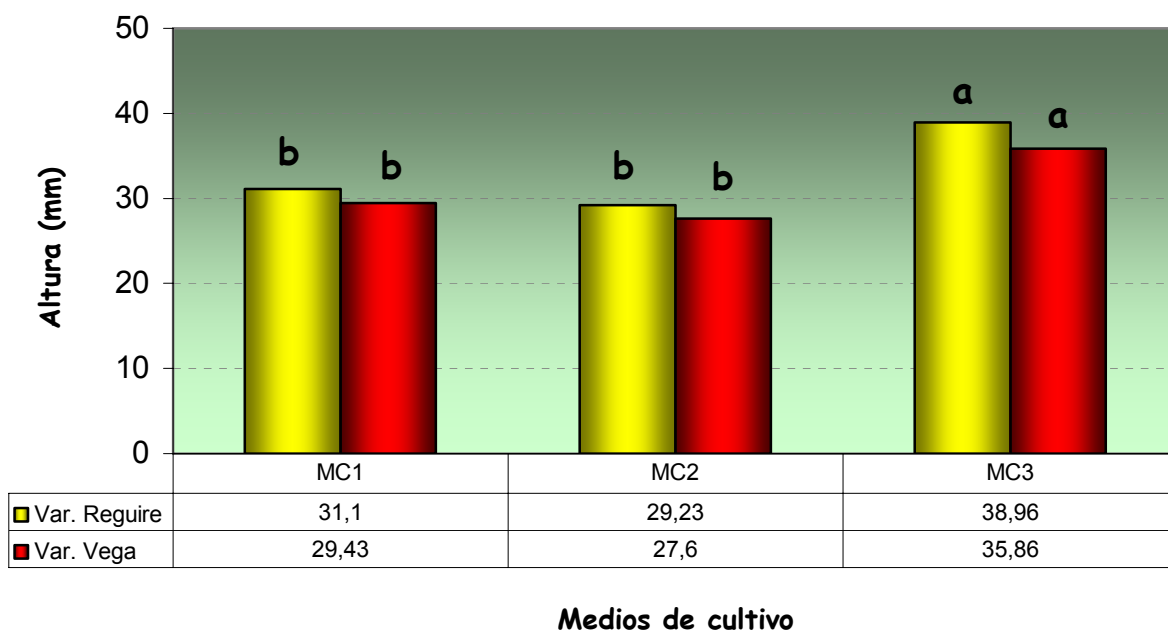


Figura 5. Altura promedio de las vitroplantas de dos variedades de crisantemo (Reguire y Vega) bajo el efecto de tres medios de cultivo (M1 = MS+0,8ppm kinetina/l⁻¹+0,05ppm AIA/l⁻¹ M2 = MS+2mg kinetina/l⁻¹+4mgAIA/l; M3 = MS+0,1 mgBAP/+0,01mgANA/l⁻¹). Duncan al (1%).

Por otra parte en el M3 (Figura 5) no existen diferencias significativas en el crecimiento de ambas variedades. Sin embargo se observa un crecimiento ligeramente superior de la variedad Reguire respecto a la variedad Vega. En el M1 y M2 ambas variedades no muestran diferencias significativas con relación al crecimiento. Este resultado confirma el efecto positivo que tiene el medio de cultivo respecto a las variedades de crisantemo ya que en ambas el resultado es el mismo.

4.2.3.2. Número de nudos en los medios de cultivo

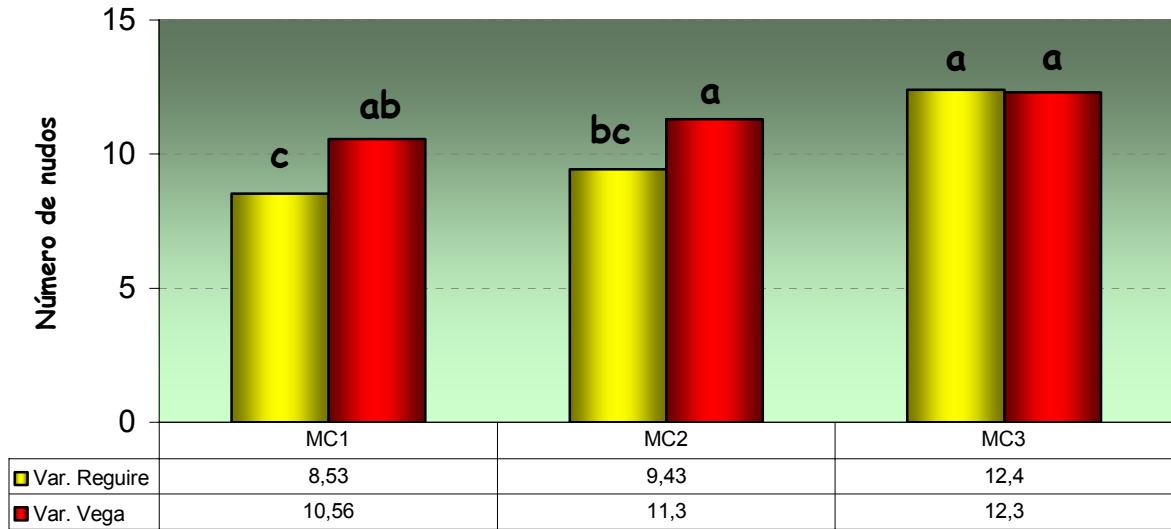
Según los promedios generales de la comparación de medias se observa que el mejor promedio de número de nudos por vitroplanta en ambas variedades es por efecto del medio de cultivo 3. En el caso de la variedad Reguire es de 12,40 y en el caso de Vega 12,36. En ambas variedades el efecto del medio de cultivo 1 fue la mas baja (cuadro 7).

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable número de nudos

Fuentes de variación	GI	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Significancia
Medios de cultivo	5	9,375	1,875	12,84	**
Error	174	25,392	0,146		
Total	179	34,767			

Realizado el análisis de varianza para la variable número de nudos (cuadro 9) se observa que el mismo es altamente significativo. Al igual que la variable altura de vitroplantas el efecto del medio de cultivo en la formación de nudos tiene que ver directamente con la influencia de las fitohormonas del medio de cultivo.

La prueba de Duncan (1%) realizado para el número de nudos diferencio 4 grupos estadísticamente diferentes (Figura 6)



Medios de cultivo

Figura 6. Efecto de los medios de cultivo ($M1=Ms+0,8\text{ppm}$ kinetina/ $l^{-1}+0,05\text{ppm}$ AIA/ l ; $M2=Ms+2\text{mg}$ kinetina/ $l^{-1}+4\text{mg}$ AIA/ l^{-1} ; $M3= Ms + 0,1\text{mg}$ BAP/ $+0,01\text{mgANA}/l^{-1}$) en la variable número de nudos a la tercera semana de evaluación. Duncan al 1%.

En la figura además se observa que en el M3 el número de nudos alcanzados por ambas variedades es el mismo por lo que estadísticamente no hay diferencias significativas entre ellas. En el M1 y M2 la variedad Vega es superior en el número de nudos respecto a Reguire. Esta respuesta puede deberse íntegramente a la carga genética de la variedad Vega. Sin embargo no debe restarse importancia al efecto de los reguladores de crecimiento que desde ya al igual que en la variable altura de vitroplanta tienen un efecto positivo en el crecimiento, debido tanto a las auxinas como las citoquininas que actúan en muchas ocasiones estimulando la formación de nudos, raíces, entrenudos y altura.

4.2.3.3. Variable número de brotes en los medios de cultivo

Respecto a esta variable como se observa en el cuadro 10 aparentemente no hay diferencias significativas entre ellas. Ya que el número de brotes en las dos

variedades en promedio es de 2. Por otra parte realizado el análisis de varianza de esta variable se observa que el mismo no es significativo.

Cuadro 10. Análisis de varianza para la variable número de brotes

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Significancia
Medios de cultivo	5	0,711	0,140	1,453	NS
Error	174	16,777	0,096		
Total	179	17,477			

La prueba de Duncan (1%) para esta variable solo distingue 1 grupo. El mejor resultado es para la variedad Reguire aunque ello solo sea en apariencia ya que estadísticamente todos los tratamientos son iguales.

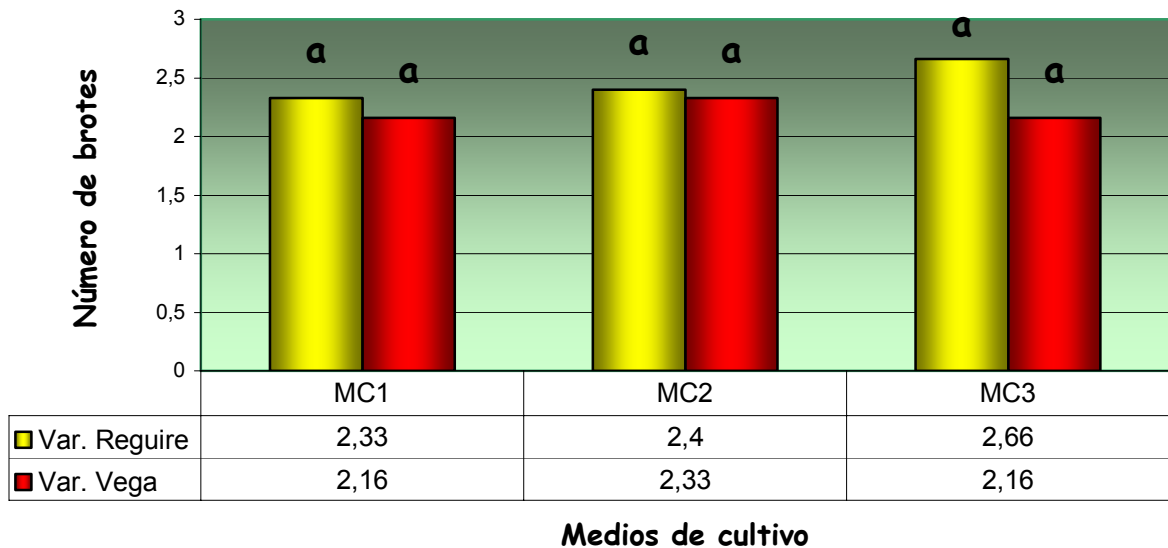


Figura 7. Efecto de los medios de cultivo ($M_1 = M_s + 0,8 \text{ ppm kinetina/l}^{-1} + 0,05 \text{ ppm AIA/l}$; $M_2 = M_s + 2 \text{ mg kinetina/l}^{-1} + 4 \text{ mg AIA/l}^{-1}$; $M_3 = M_s + 0,1 \text{ mg BAP} + 0,01 \text{ mg ANA/l}^{-1}$) en la variable número de brotes a la tercera semana de evaluación. Duncan al 1%.

Al igual que en los anteriores casos estos resultados tienen que ver con la respuesta del genotipo y el efecto de los reguladores de crecimiento. En un

estudio realizado por Pereira (1999), referido al comportamiento *in vitro* de fresa obtuvo numerosos brotes en presencia de altas concentraciones de citocinina y baja concentración de auxina. Weaver (1996), por su parte indica que si la cantidad de citocinina es baja en proporción con las auxinas produce un desarrollo en las raíces, pero si la cantidad de citocinina es mayor a la auxina llegan a desarrollarse tanto las yemas como los brotes.

Con estos resultados se puede aseverar que el BAP en altas concentraciones es el más adecuado para la formación de brotes. Así también se puede determinar que la adición de la auxina AIA favorece la emisión de hojas e inhibe la formación de brotes según lo observado en la investigación.

4.2.3.4 Grado de enraizamiento en los medios de cultivo

Para esta variable de estudio el mejor medio en ambas variedades fue el M3 en ellos se obtuvo mejor enraizamiento que en los medios 1 y 2.

Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable grado de enraizamiento

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Significancia
Medios de cultivo	5	15,985	3,197	13,872	**
Error	174	40,099	0,230		
Total	179	56,084			

Realizado el análisis de varianza la variable de estudio es altamente significativa.

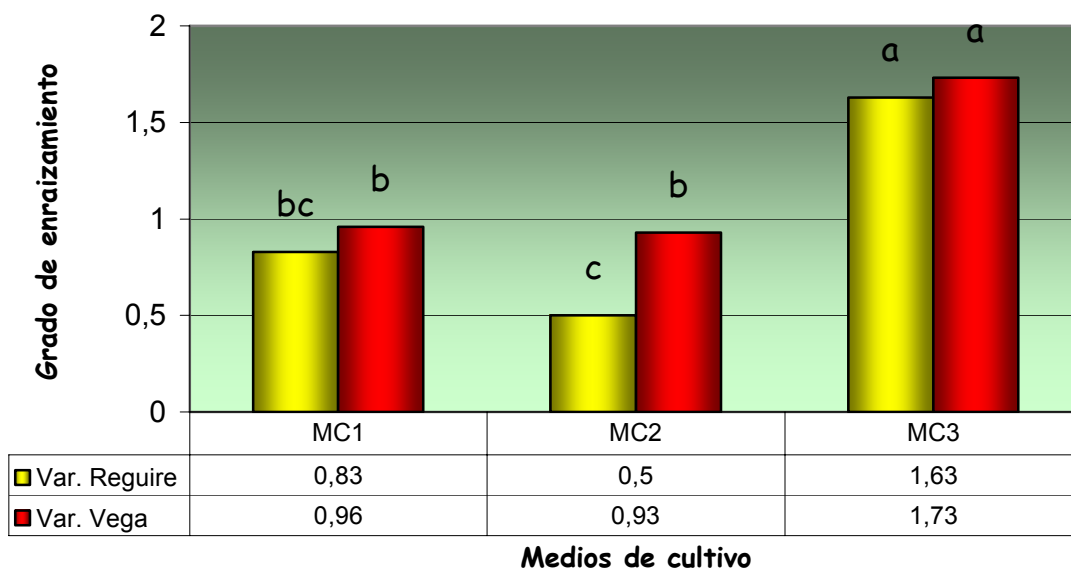


Figura 8. Efecto de los medios de cultivo ($M1=Ms+0,8\text{ppm}$ kinetina/ $l^{-1}+0,05\text{ppm}$ AIA/ l ; $M2=Ms+2\text{mg}$ kinetina/ $l^{-1} +4\text{mg}$ AIA/ l^{-1} ; $M3= Ms + 0,1\text{mg}$ BAP/ $+0,01\text{mgANA}/l^{-1}$) en la variable grado de enraizamiento a la tercera semana de evaluación. Duncan al 1%.

La prueba de Duncan (1%) para esta variable de estudio determinó cuatro grupos estadísticamente distintas. El mejor medio para el enraizamiento de las dos variedades fue el medio 3. Sin embargo, la variedad Reguire se comporta de diferente manera en los mismos medios resultando el peor medio para esta variedad el medio 2. En cuanto a la variedad Vega los medios 1 y 2 son diferentes estadísticamente. Al igual que en las otras variables de estudio el efecto de los reguladores de crecimiento de los medios de cultivo fue determinante para obtener estos resultados. Debido a que en el medio 3 se observan los mejores resultados.

Por otra parte Hartmann (1997), indica que para mejorar el desarrollo de las raíces por lo general se debe añadir concentraciones pequeñas de citocininas y una cantidad moderada de auxina.

Por otra parte Hurtado (1997), indica que las citocininas por si solas tienen un efecto limitado en el crecimiento de las raíces pero estas al ser combinadas con

una auxina dan como resultado una estimulación de la división celular, lo que normalmente no conducirá a la elongación de la raíz pero si a la estimulación de la división de las células que están destinadas a diferenciarse en tejidos vasculares.

4.2.4. Comportamiento morfológico *in vitro* de las variedades de crisantemo a diferentes dosis de irradiación

El comportamiento morfológico de las dos variedades de estudio luego de la etapa de irradiación con Co-60 fue diferente. Los resultados de esta fase de la investigación se presentan en los siguientes puntos.

Cuadro 12. Supervivencia y comportamiento morfológico de las variedades de crisantemo Reguire y Vega por efecto de diferentes dosis de irradiación a la cuarta semana de evaluación.

Variedad	Dosis de irradiación (Gy)	Características evaluadas			
		Altura de vitroplanta	Nro de Nudos	Nro de Brotes	Grado de enraizamiento
Reguire	0 (Testigo)	20,30±2,79	8,70±0,98	1,86±0,98	1,0±0,46
	15	16,10±2,42	7,56±1,43	1,63±0,88	1,0±0,57
	30	0,00 ±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,0±0,00
	45	0,00 ±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,0±0,00
Vega	0 (Testigo)	17,50 ±4,12	7,80±1,18	2,13±0,89	1,0±0,67
	15	15,70 ±2,81	7,43±1,07	2,26±0,78	1,0±0,53
	30	1,93 ±3,98	0,93±1,91	0,33±0,71	0,16±0,70
	45	0,00 ±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,0±0,00

El comportamiento morfológico en general de la variedad Reguire fue la siguiente:

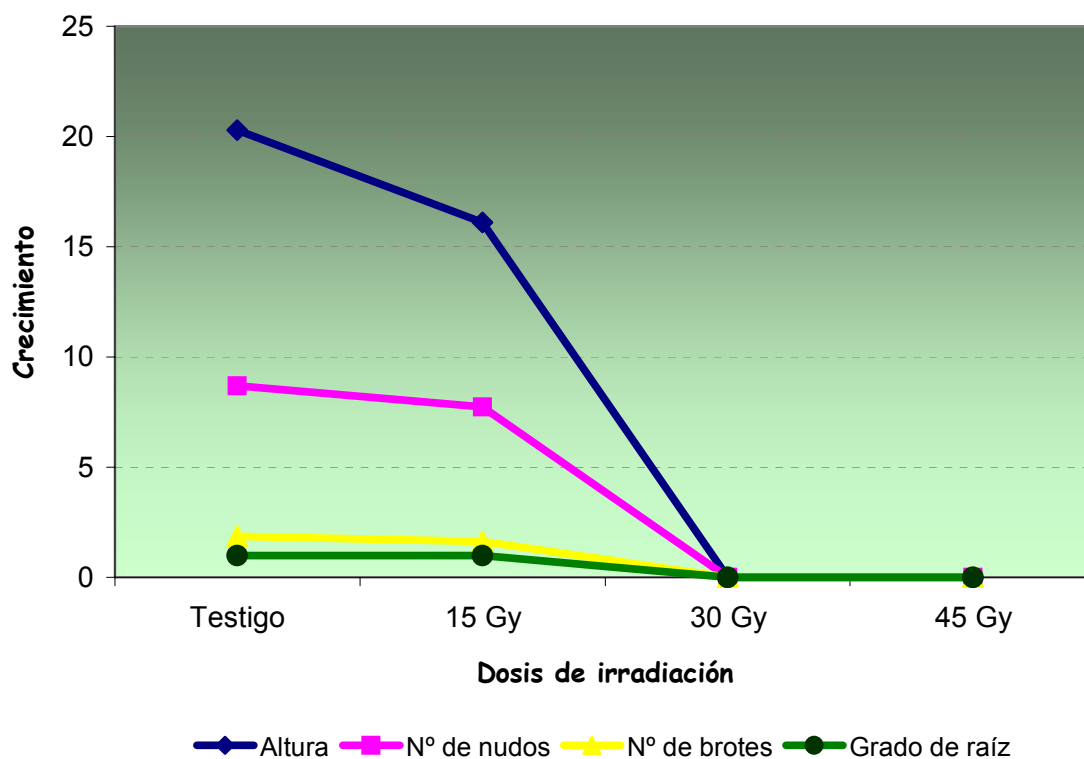


Figura 9. Comportamiento morfológico de la variedad Reguire por efecto de diferentes dosis (0 = testigo, 15, 30 y 45 Gy) de irradiación a la cuarta semana de evaluación.

En la figura precedente se puede advertir el efecto de las diferentes dosis de irradiación en el comportamiento morfológico de la variedad Reguire. En cuanto a la altura desarrollada por la variedad Reguire luego de la irradiación se observa que el menor efecto se produce a 15Gy en el cual la altura promedio alcanza a 16 mm, con relación al testigo que registró una altura promedio de 20. Así también en las otras variables estudiadas como en el número de nudos (8), brotes (2) y grado de enraizamiento (1).

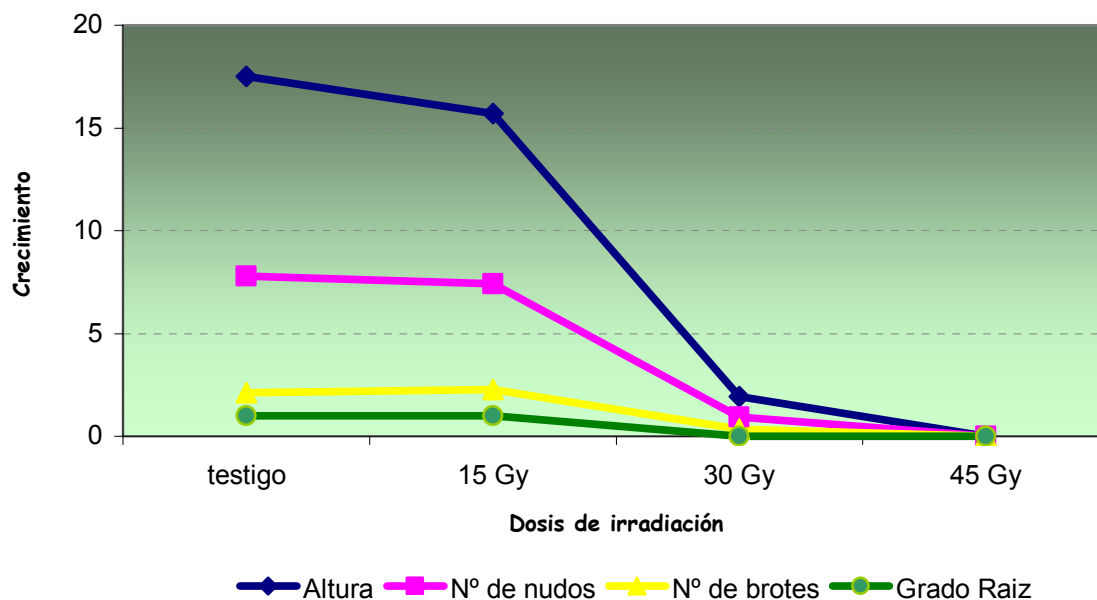


Figura 10. Comportamiento morfológico de la variedad Vega por efecto de diferentes dosis (0 = testigo, 15, 30 y 45 Gy) de irradiación a la cuarta semana de evaluación.

Al igual que en la variedad Reguire en la variedad Vega el menor efecto de la irradiación fue a la dosis de 15Gy. La altura promedio de crecimiento de esta variedad respecto al testigo fue de 16 mm a 17 mm.

Respecto a las otras variables de respuesta como el número de nudos (7), brotes (2) y el grado de enraizamiento tanto en el testigo como en la dosis de 15 Gy fue de 1.

A 30 y 45Gy en las dos variedades el efecto fue muy severo en el crecimiento de la altura, número de nudos, brotes y grado en enraizamiento. Al término de las cuatro semanas de evaluación no se observó ningún rasgo normal de desarrollo. El resultado observado se debe a que a dosis altas de radiación existe un mayor deterioro del material vegetal de ahí que a 45Gy no hubo ningún tipo de regeneración de los explantes, llegando a los pocos días a necrosarse en su integridad. En diferentes trabajos de investigación se observa que a dosis muy

altas de irradiación el efecto es letal para el explanto, llegando este prácticamente a morir al término de un determinado tiempo normalmente a la cuarta semana de evaluación (Mendoza, 2006).

4.2.5. Efecto de la irradiación en las variables de respuesta de la variedad Reguire y Vega

A continuación se presenta el efecto de las dosis de irradiación en las diferentes variables de estudio.

4.2.5.1 Altura a diferentes dosis de irradiación

Respecto a la altura en esta fase del experimento en el cuadro 7 se observa que el testigo de la variedad Reguire alcanza una altura 20 mm, mientras que la variedad Vega 17 mm. A 15 Gy el comportamiento de las dos variedades en altura es muy similar alcanzaron una altura de 16 mm. Mientras que a 30 y 45 Gy la altura se vio seriamente afectada. La variedad Vega fue la única que a 30 Gy tuvo algo de desarrollo sin embargo ello no fue importante ya que posteriormente llegó a morir.

Dosis altas influyen directamente en los ácidos nucleicos, citocromos, mitocondrias y membranas celulares de ahí a que a esas dosis de irradiación el material vegetal no tuvo respuesta (Marcano, 2006). Los resultados obtenidos son similares a diferentes trabajos realizados por otros autores que también trabajaron con rayos gamma como inductor de mutación, como es el caso de los trabajos de Broertjes *et al.*(1988); citado por Otahola (1999) que trabajó con irradiación de Co-60 en el rango de 10 a 20 Gy (1,0 a 2,0 Krad) en vitroplantas de crisantemo con el objeto de encontrar variabilidad en la coloración de la flor.

El análisis de varianza realizado para esta variable fue altamente significativo como se observa en el cuadro 13.

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable altura

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Significancia
Dosis de Irradiación	7	972,383	138,912	520,293	**
Error	232	61,941	0,267		
Total	239	1034,324			

La prueba de Duncan (1%) realizado para la variable altura diferencia 5 grupos diferentes estadísticamente. En el tratamiento testigo el mejor desarrollo en cuanto altura tiene la variedad Reguire. Mientras que a 15 Gy no existen diferencias significativas en la altura alcanzada por ambas variedades. A 30 y 45 Gy la variedad Reguire no presenta ningún desarrollo a excepción de la variedad Vega que a 30 Gy tiene algo de desarrollo pero sin embargo el mismo no prosperó posteriormente.

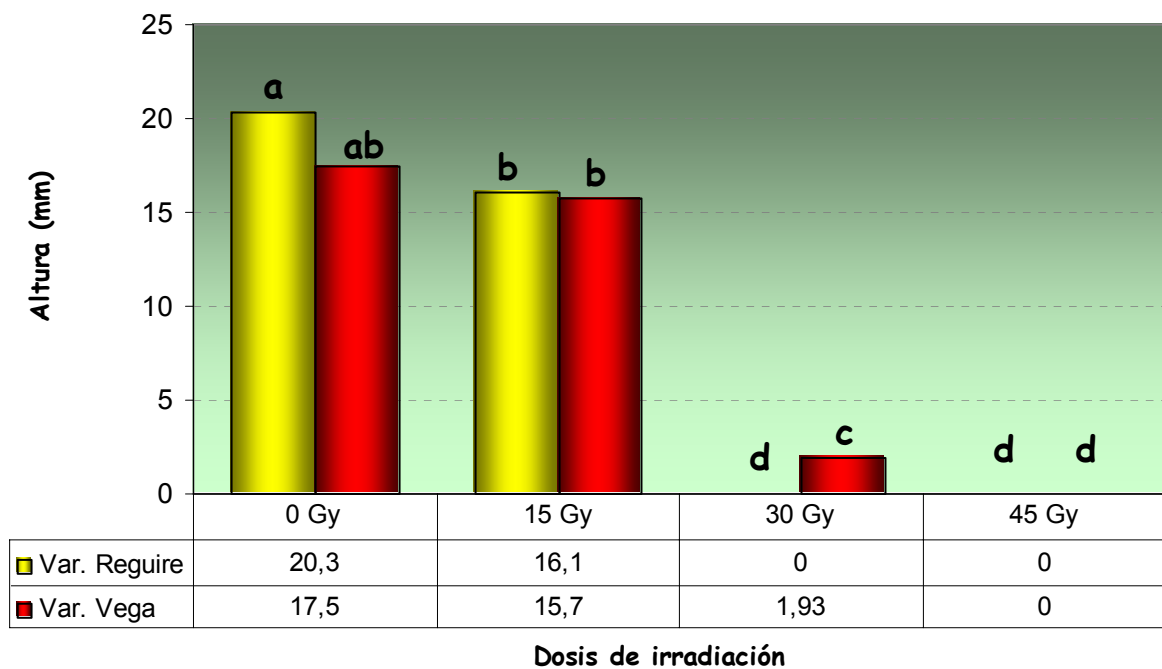


Figura 11. Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en la altura de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%).

4.2.5.2. Número de nudos a diferentes dosis de irradiación

En cuanto a la variable número de nudos se observa en el cuadro 6 que los tratamientos testigo de las dos variedades alcanzaron en el caso de la variedad Reguire 9 nudos y en Vega 8 nudos. A 15 Gy el número de nudos fue mejor en la variedad Reguire (8 nudos) respecto a Vega (7 nudos). En los otros tratamientos 30 y 45 Gy esta variable baja considerablemente, en el caso de la variedad Vega a 30 Gy se observa 1 nudo y ninguno para Reguire. Realizado el análisis de varianza de esta variable se observa en el cuadro 8 una alta significancia.

Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable número de nudos

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Significancia
Dosis de Irradiación	7	441,659	63,094	540,282	**
Error	232	27,093	0,117		
Total	239	468,752			

De acuerdo a la prueba de significancia de Duncan (1%) respecto a la variable número de nudos se agrupan 3 diferentes categorías estadísticamente similares. Para el testigo y a 15Gy en las dos variedades no existen diferencias estadísticamente. Ello puede deberse en este caso al genotipo ya que en muchos trabajos se observa este tipo de respuesta existiendo diferencias entre variedades de la misma especie

Al igual que en el anterior caso, a 30 y 45 Gy no existen diferencias significativas a excepción de la variedad vega que muestra el desarrollo de 1 nudo a 30 Gy. Algunos genotipos pueden ser más tolerantes a factores de estrés, la variedad Vega pareciera que tiene más tolerancia a las radiaciones lo cual se debe en su mayor parte al genotipo.

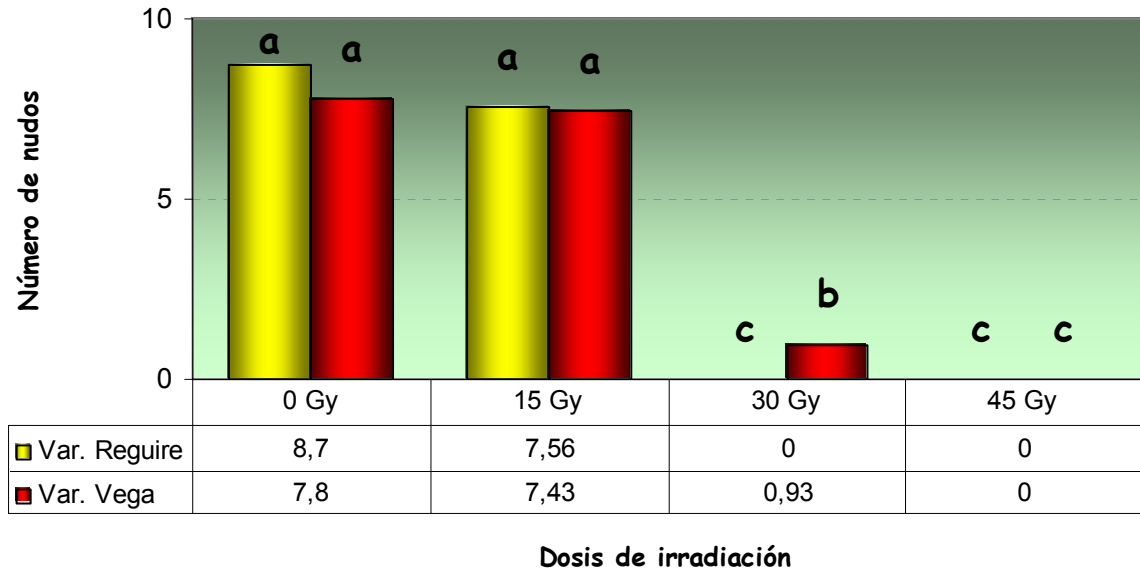


Figura 12. Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en el número de nudos de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%).

Otahola, (1999) determinó en trabajos similares de mutaciones que dosis bajas de irradiación pueden estimular el crecimiento no solo de nudos si no también de parámetros de evaluación como la altura y otros debido a que los mutágenos físicos en explantes “*in vitro*”, estimulan algunos reguladores de crecimiento naturales de las plantas, lo cual induce un mayor crecimiento en los mismos.

4.2.5.3. Número de brotes a diferentes dosis de irradiación

En esta variable tanto en el testigo como en el tratamiento de 15Gy de la variedad Reguire y Vega se observan 2 brotes. A 30 y 45 Gy en la variedad Reguire no se observa ningún brote. Sin embargo para la variedad Vega a 30 Gy aún se observa algún brote. Al igual que para las otras variables de estudio a 45 Gy no existe ninguna respuesta.

El análisis de varianza para el número de brotes, (cuadro 15) es altamente significativo.

Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable número de brotes

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Sig
Dosis de Irradiación	7	104,315	14,902	184,240	**
Error	232	18,765	0,081		
Total	239	123,08			

La prueba de Duncan separa esta variable de estudio en 5 grupos. Los testigos estadísticamente son iguales. Sin embargo a 15Gy el número de brotes estadísticamente son diferentes. Al igual que en los anteriores casos la variedad Vega presenta algo de desarrollo a 30Gy y no así a 45 Gy.

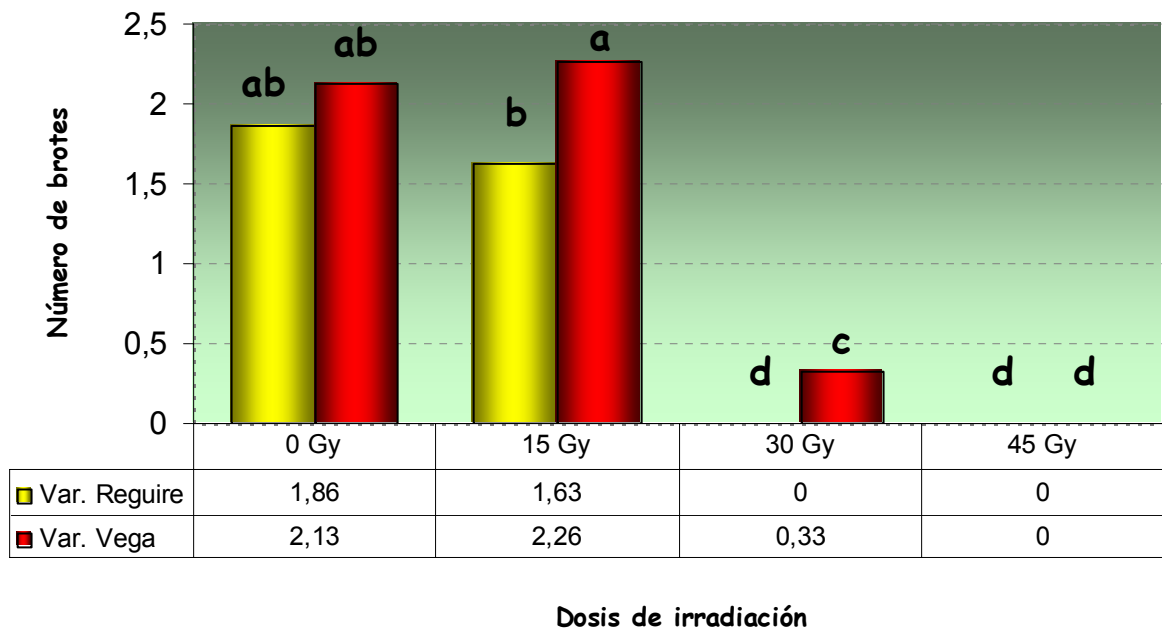


Figura 13. Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en el número de brotes de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%).

De forma similar que en los anteriores casos esto puede deberse al efecto de algunos reguladores de crecimiento como es el efecto de algunas citocininas que en muchos trabajos se observó, que si la cantidad es baja en proporción de las auxinas produce un desarrollo de raíces y si esa cantidad es mayor a la auxina llegan a desarrollarse los brotes (Weaver, 1996).

4.2.5.4. Grado de enraizamiento a diferentes dosis de irradiación

En el grado de enraizamiento los resultados son muy similares al de las anteriores variables de estudio. Este valor es mayor en el testigo y a la dosis de 15Gy. A las otras dosis de irradiación la respuesta es negativa salvo para la variedad Vega que a 30 Gy aún existe según el valor algo de enraizamiento.

Realizado el análisis de varianza para esta variable la misma es altamente significativa al igual que en los anteriores casos.

Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable grado de enraizamiento

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Significancia
Irradiación	7	55,729	7,961	443,286	**
Error	232	4,167	0,018		
Total	239	59,896			

La prueba de Duncan (1%) para esta variable de respuesta tiene como resultado 4 grupos de las cuales a 0 (testigo) y 15 Gy en las dos variedades no existen diferencias significativas estadísticamente se puede decir que son similares. A 30 Gy en la variedad Vega se observa un ligero enraizamiento sin embargo este no es significativo. A 45 Gy el efecto fue letal para ambas variedades.

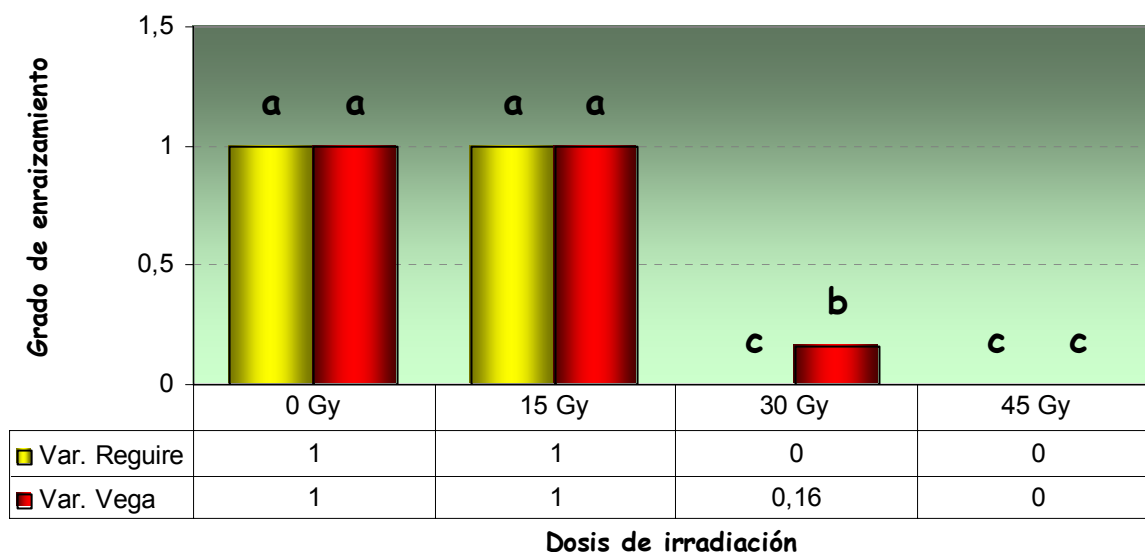


Figura 14. Efecto de diferentes dosis de irradiación 0, 15, 30 y 45 Gy en el grado de enraizamiento de la variedad Reguire y Vega al término de la cuarta evaluación. Prueba de significancia Duncan (1%).

Como en las anteriores variables en el grado de enraizamiento la respuesta fue igual que a dosis altas el enraizamiento fue muy pobre. A 30Gy la variedad Vega desarrolló algo de raíces debido a su mejor tolerancia a la irradiación. A 45 Gy el daño en esta variable fue muy severo.

4.3. Dosis letal media (DL-50) de irradiación – variedad Reguire y Vega

Con los datos obtenidos en los resultados se calculó la dosis letal media para cada una de las variedades de crisantemo, las mismas son las siguientes:

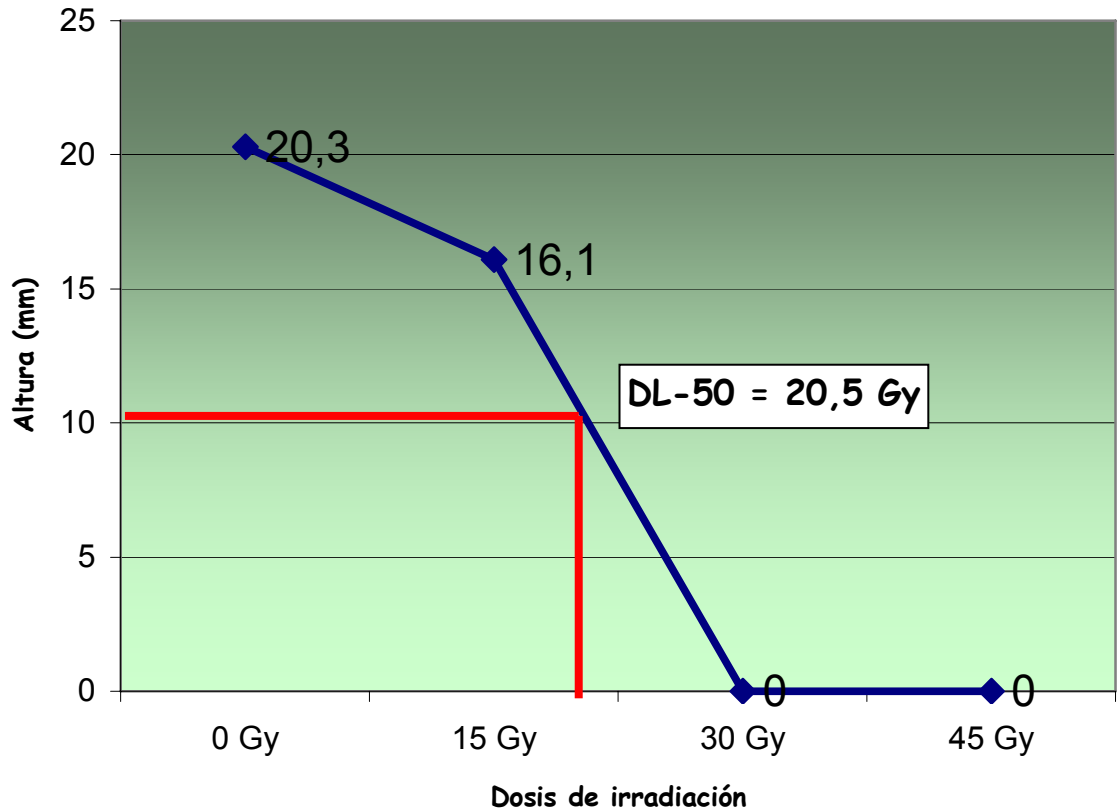


Figura 15. Dosis letal media (DL-50) de irradiación para la variedad Reguire

En la figura 18, se observa la dosis letal media para la variedad Reguire. A partir de esa dosis se puede diseñar trabajos de fitomejoramiento. A esta dosis la posibilidad de encontrar mutaciones favorables es muy amplia (Sonnino y Mendoza, 1998).

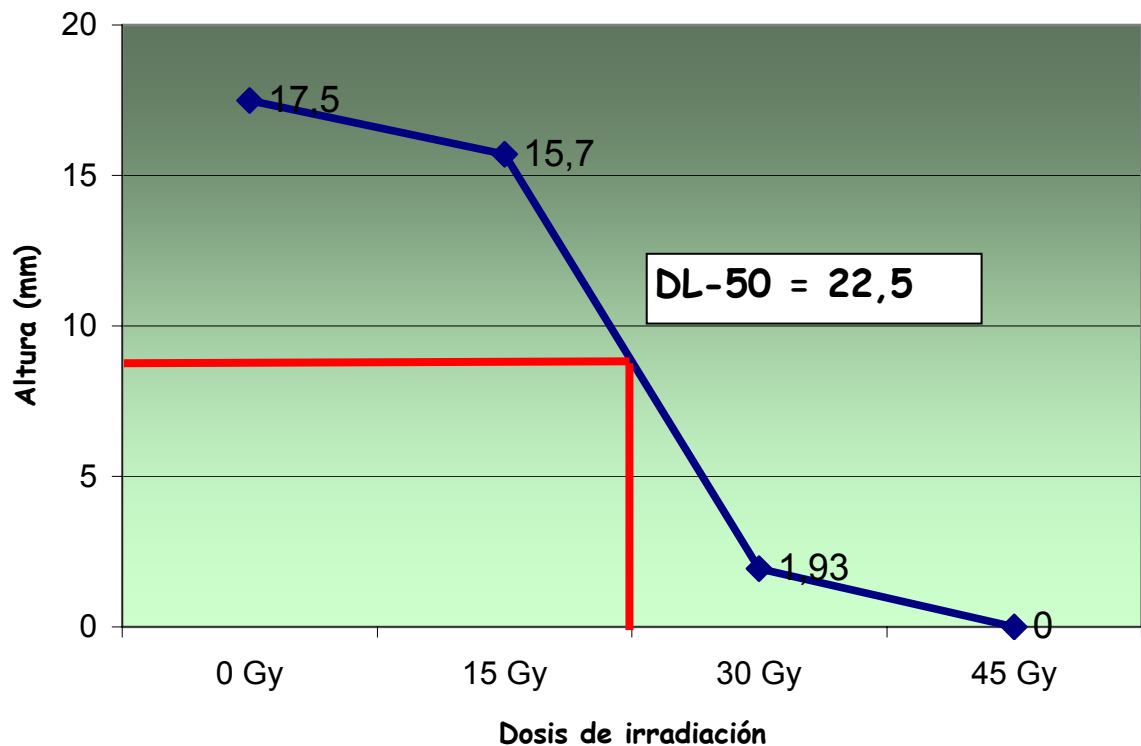


Figura 16. Dosis letal media (DL-50) de irradiación para la variedad Vega

En la figura 16 se observa que para la variedad Vega la dosis letal media es de 22.5Gy. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos por Broertjes *et al* (1980) que indica que la dosis letal media para la inducción de mutaciones en crisantemos en condiciones de cultivo “*in vitro*” esta entre 10 y 20 Gy (1,0 y 2,0 Krad). Sin embargo, Broertjes y Van Harten, (1988) indican que la dosis letal media para la mutación de crisantemos esta por encima de 25 Gy (2,5 Krad). Como se puede apreciar los resultados son muy similares.

Por otra parte esto hace notar que es importante realizar trabajos de dosimetría ya que dependiendo de la variedad dentro de una misma especie la dosis letal media puede ser diferente, todo ello ayuda de manera mas eficiente la realización de otros trabajos relacionados principalmente al fitomejoramiento.

4.4. Dosis adecuada de irradiación para las variedades en estudio

Tabulado los datos de los resultados obtenidos se puede aseverar que las dosis óptimas de irradiación para la inducción de mutaciones deseables para la variedad Reguire es de 20,5 Gy y en la variedad Vega 22,5 Gy.

Cuadro 17. Dosis óptimas de irradiación de la variedad Reguire y Vega con Co-60 para la inducción de mutaciones.

Dosis de irradiación óptima para la mutación	Variedades de Crisantemo	
	Reguire	Vega
	20,5 Gy	22,5 Gy

5. CONCLUSIONES

1. Durante la introducción de material vegetal *in vitro* de las dos variedades. La variedad Reguire (77%) fue la de mejor supervivencia respecto a la variedad Vega (67%).
2. En la etapa de multiplicación, se evidenció que las vitroplantas presentaron un mejor desarrollo en el medio 3 (MS+ 0,1mg BAP/l⁻¹+0,01mgANA/l⁻¹). Así también las variables de estudio (altura de vitroplanta, número de nudos, brotes, y grado de enraizamiento) fueron altamente significativos.
3. De las dos variedades en estudio, la variedad Reguire fue la de mejor comportamiento, destacando en altura de vitroplanta, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento.
4. En ambas variedades (Reguire y Vega), a la dosis de radiación de 15Gy el desarrollo en altura, número de nudos, brotes y grado de enraizamiento fue mayor que en las otras dosis respecto al testigo. A 45 Gy ambas variedades sufren una amplia mortandad.
5. La dosis letal media (DL-50) para la variedad Reguire fue de 20,5 Gy y para la variedad Vega de 22,5 Gy.
6. En base a los resultados obtenidos se afirma que a 20,5 y 22,5 Gy se pueden obtener genotipos mutantes importantes para el fitomejoramiento tanto de la variedad Reguire como Vega.

6. RECOMENDACIONES

Según los resultados y conclusiones realizados en el presente trabajo se llega a las siguientes recomendaciones:

1. Seguir trabajando con los resultados obtenidos en la investigación para la búsqueda de genotipos de importancia para la floricultura.
2. La adición de algunos reguladores de crecimiento en los medios de cultivo, como es el caso de la bencil-amino-purina (BAP) pareciera tener un efecto positivo en el desarrollo de las vitroplantas de crisantemo por lo que se recomienda probar ó formular medios con BAP como ingrediente principal.
3. Realizar la experiencia con otras variedades y especies de flores y otros cultivos de importancia económica.
4. Determinar el comportamiento *ex situ* de genotipos mutantes obtenidos por la técnica de mutaciones inducidas con cobalto-60 (Rayos gamma).

7. BIBLIOGRAFIA

- ABDELNOUR A. Y VINCENT J. 1994.** Conceptos básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. CATIE. La Paz. Pp. 14-27.
- AGRIOS, G. 1991.** Fitopatología. México. Editorial Limusa, S.A. Pp. 79-160 – 163-143.
- ASOCOA, 2006.** Disponible en: <http://www.asocoa.com/plantas/crisantemo.asp>. (visto por última vez el 12 de enero de 2007).
- ATIENZA G. et al. 2005.** Sociedad Española de Cultivo *in vitro* en Tejidos Vegetales Córdoba España. <http://www.adobe.com/acrobat>.
- BARBA, A. et al. 2001.** Micropropagación de Plantas. México. Editorial Trillas. Pp 55-56.
- BERGAMANN, E. 1987.** Techniques For Propagation and Breeding. Mac- Millan. Nueva York. Vol I. Pp. 45-56.
- BORREGO AGUAYO, M.J., GARCÍA DE LAS HERAS, R., GUEDE SIMÓN, B., HOCES PRIETO, R., MENÉNDEZ CORRALES, E., PACHECO CASTELAO, F. 1998.** Biología. “Colección de Materiales Curriculares para el Bachillerato nº 5”. Dirección General de Evaluación Educativa y Formación del Profesorado. Consejería de Educación y Ciencia. Junta de Andalucía. Pp. 59.
- BOWEN, H. J. M. 1965.** La mutación en los Crisantemos Hortícolas. La Botánica de la radiación. Pp. 695-700.

- BROERTJES, C. Y VAN HARTEN, A. 1988.** Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. Amsterdam, Elsevier Science Pub. Co, 345 p.
- CRUZ-COKE, M. R. 2003.** Valoración de trabajos clásicos en la historia de la genética. Rev Méd Chile 2003; 131: 220-224.
- DATTA, S. K. P. MISRA. AND MANDAL, A. K. A. 2005.** In vitro mutagenesis-a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. Current Science, 88: pp 155-158.
- DE JONG, J Y CUSTER, J. B. 1986.** Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and in vitro culture of pedicels and petals epidermis. *Euphytica* 35 (1): 137–148.
- DONINI, B. Y MICKE, A. 1984.** Use of induced mutations in improvement of vegetatively propagated crops. I.A. E .A., 305: 79– 98.
- ESCANDON, A. 2001.** w. w .w. INFOAGRO. Com./ flores/ flores/crisantemo.htm.
- FAO, 1990.** Fundamentos teórico – prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Estudio FAO producción y protección vegetal 105 Santiago – Chile. Pp. 3-41.
- HARTMANN, H. y KESTER, D. 1997.** Propagación de plantas. 5ª Reimp. México. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. Pp. 647 – 657- 740.
- HERRERA, G. A. 1985.** Manual de Medios de Cultivo. Editorial. Científico-Técnico. Ciudad de la Habana. Impreso en Cuba. Pp. 5

- HERREROS, L. M. 1995.** Cultivo del crisantemo. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). 2da Edición. España. Pp. 31.
- HUANG, L.G.; VAN GURDY, R; MURASHIGE, T. 1988.** Fundamentos Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales. En: VILLEGAS, L. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales Aplicados a la Producción Agrícola. Caracas, Venezuela. 160p.
- HURTADO, D. Y MERINO, M. 1994.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México D. F. S.A. Pp. 71-48; 79-135; 166
- ICHIKAWA, S. 1975.** Apuntes de Mutagénesis. México. Escuela Nacional de Agricultura. 67p.
- LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA. 1997.** Micropropagación *In Vitro* de Plantas. Ministerio de Agricultura y Ganadería Subsecretaria de Estado de Agricultura. Dirección de Investigación Nacional. CACUPE-PARAGUAY. Pp. 32-60.
- LATADO, R. 1993.** Inducao e uso de mutacoes “*in vivo*” e “*in vitro*” no melhoramento do *Chrysanthemum morifolium* Ram. Dissertacao apresentada a Escola Superior na Agricultura “Luis de Queiroz” da Universidade de Sao Paulo, para obtecao do título e Mestre en Agronomía, Area de Concentracao: Genética e Melhoramento de Plantas. Piracicaba. Estado de Sao Paulo, Brasil. 102 Pp.
- LINARES, H. 2005.** Curso en Cultivo de Crisantemo. Teórico-Práctico. Programa de Jóvenes Emprendedores Rurales. JER-S.R.A.
- LOPEZ, C. 1990.** Medio de Cultivo. En: FAO. Fundamentos Teórico-Práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales. Roma, Italia. Pp15-19.

- LOZOYA, S. H. 1990.** Cultivo *in vitro* de Ápices para la Obtención de Plantas libres de Patógenos. En: FAO. Fundamentos Teórico-Practico del Cultivo de Tejidos Vegetales. Roma, Italia. Pp. 37-41.
- LUCAS, E. 2004.** Manipulación de Plantas Madres para Enraizamiento-ilustrados. com. Código ISPN de la Publicación. EpZZpvLfKEvNcBLcZd. Elucas42@hotmail.com.
- MARCANO, J. 2006.** Los Recursos Naturales. Se encuentra en: <http://www.jmarcano.com/recursos/index.html> (Disponible, 29 de enero 2007).
- MATSUMOTO, H Y ONOSAWA, Y. 1989.** Development of no chimaeric mutation lines through *in vitro* culture of florets in Chrysanthemum. Scientific Report of de Faculty of Agriculture, Ibaraki University. N° 37, p. 63 – 69.
- MEJIA, R. Y VITTORELLI, C. 1988.** Manual de Laboratorio. Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agroindustrial. Pp. 51-54-59.
- MOORE, 1960.** Cytochemical studies with psittacosis virus by fluorescence microscopy. Texas Repts. Biol. and Med. 18: 501. 3
- MURASHIGE, T. AND SKOOG, 1962.** "A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture." *Physiologia Plantarum* 15: 473 - 497.
- OCHOA-ALEJO, N. 1990.** Establecimiento de cultivos *in vitro*. En fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Editor Codmo H. Rossell y Víctor M. Villalobos. 23-27. Roma: FAO.
- OSTLE, B. 1977.** Estadística Aplicada. Editor Limusa, México.

- OTAHOLA, G. V. A. 2001.** Inducción de Mutantes para el Color de la Flor en Crisantemos (*Dendranthema grandiflora* Ram. Tzvelev) Mediante Radiaciones Gamma. Revista Científica UDO Agrícola. Vol 1. N° 1. pp 56-63. Bioline International Official Site (site up-dated regularly).
- PEREIRA, R. 1999.** Determinación del Protocolo Adecuado para la Micropropagación de Fresa (*Fragaria chioensis, Duch*). Tesis de Grado. Oruro-Bolivia. pp 22-26.
- PIZANO, M. 1997.** Floricultura y Medio Ambiente. Editorial Hortitecnia Ltda. Bogota. Colombia. pp. 100-112.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R. F. Y EIEHHORN, S. E. 1992.** Biología de las plantas. Editorial Reverté, S. A., Barcelona.
- ROBLES, S. 1991.** Genética Elemental y Fitomejoramiento. México. LIMUSA. Pp. 400-4001.
- ROCA, W., MROGINSKI, L., MAFLA, G. 1991.** Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali – Colombia. Pp. 7 – 41.
- SALINGER, J. P. 1991.** Producción comercial de flores. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 324 p.
- SONNINO, A., MENDOZA, V.H. 1998.** Informe. Proyecto “Mejoramiento de la Papa Amarga por inducción de mutaciones con Co-60” *Solanum Juzepczukii. S. ajanhuiri*. CIN-Viacha IBTEN.

- TULMANN, N. A. (1997).** Mutaciones en el mejoramiento de plantas de propagación sexual. Curso Internacional de Mutaciones Inducidas en el Mejoramiento de las Plantas, Estado Monagas, Venezuela (s/p).
- URIA, V. 1994.** Biotecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia. pp. 21-25.
- VILLALOBOS, V.M., FERREIRA, P. Y MORA, A. 1991.** The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. *Biotech. Adv.* Vol. 9, pp.: 127-215.
- WEAVER, A. 1996.** Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Universidad de California Davis. México. Editorial Trillas. 622p.
- YAMAGUCHI, T. 1987.** Mutation breeding of ornamental plants. *Bulletin of the Institute of Radiation Breeding* 7: 49–67.
- ZAMUDIO, T. 2005.** Regulación Jurídica de los Biotecnólogos. Equipo de Docencia e Investigación. UBA. Derecho. [http:// www.bioetica.org/](http://www.bioetica.org/)

ANEXOS

Anexo 1. Metodología y procedimiento general de la investigación, desde la elección del material vegetal hasta la obtención de la dosis letal media de irradiación.

