

DIFERENCIACION Y OBTENCION DE PLANTAS A PARTIR DEL CULTIVO DE YEMAS DE Rosa montezumae*

Miguel Angel Serrato Cruz**

RESUMEN

Yemas de Rosa montezumae de 5 mm de longitud fueron cultivadas in vitro utilizando el medio de cultivo de Cresswell y Nitsch que contiene una sola auxina, el ácido indol-3, butírico (AIB); los citocultivos se incubaron bajo condiciones de obscuridad y luminosidad. La inducción de raíces fué debida a la presencia del AIB y es estimulada por la obscuridad. La transferencia a la luz de las yemas previamente enraizadas en la obscuridad ocasionó la expansión foliar y finalmente se obtuvieron plantas bien diferenciadas.

INTRODUCCION

El tener establecido un sistema de obtención de plantas a partir del cultivo de partes vegetales como en el caso del cultivo de meristemas en orquídea con el propósito de mantener un fenotipo deseable que por vías de reproducción sexual se perdería (Intuwong y Sagawa, 1974), al igual que la rápida multiplicación de crisantemos a nivel comercial a partir del cultivo de yemas de tallo (Ben'Yaacov y Langhans, 1972), o la producción masiva de plantas para establecer huertos con altas densidades como en el caso del manzano (Abbott y Whiteley, 1976; Jones et al., 1977) etc. así como también la obtención de plantas libres de virus logradas en fresa (Smith et al., 1970), papa (Nielson, 1960), frambuesa (Putz, 1971), cítricos (Bitters et al., 1972), zarzamora (Carrillo¹) etc., representa amplias probabilidades en la propagación vegetativa en el campo de la fruticultura, floricultura, y en general la importancia que pueden tener los citocultivos en la agronomía.

Para establecer este tipo de sistemas de propagación se requieren fijar ciertas condiciones químicas como hormonas, sales inorgánicas, vitaminas, pH, etc., paralelamente a las condiciones físicas

* Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Rama de Genética, Colegio de Postgraduados, SARH, Chapingo, México.

** Estudiante del Departamento de Fitotecnia, UACH, Chapingo, México.

¹ Trabajo en publicación. Rama de Genética, Colegio de Postgraduados, SARH, Chapingo, Méx.

como temperatura, luminosidad, etc.

Actualmente no se han reportado trabajos acerca del manejo de condiciones físicas de oscuridad-luminosidad que intervengan en la diferenciación de plantas a partir de yemas en el género Rosa, y especialmente en Rosa montezumae.

En el género mencionado anteriormente se tiene bastante información sobre el cultivo de células en suspensión con fines de estudios bioquímicos (Ibrahim y Grisebach, 1976), en Fisiología (Jones et al., 1976), en Botánica (Wallner y Nevins, 1973) etc., existiendo pocos trabajos acerca de cultivo de partes vegetales (yemas, tallos, etc.). De éste último se han registrado en la literatura trabajos realizados con médula (Jacobs, 1968), yemas (Jacobs et al., 1969, 1970; Elliot, 1970), embriones (Asen y Larson, 1951; Grainferberg, 1973), tejido de tallo (Hill, 1967). En tales trabajos se han empleado distintos medios de cultivo con diferentes clases de hormonas (solas y combinadas) y también diversas concentraciones de las mismas.

En todos los casos se han utilizado condiciones similares de temperatura ($25-26 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y luminosidad ($3000-6000 \text{ lux/m}^2$). Los resultados que se han logrado son los siguientes: desarrollo de callosidades únicamente, diferenciación parcial de tallo ó raíz y la total diferenciación de la planta.

En el presente trabajo se tuvo como objetivo el observar los efectos que pudieran tener la luminosidad y oscuridad sobre la diferenciación en yemas de Rosa montezumae probando el medio de cultivo Cresswell y Nitsch.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron en el verano de 1977 segmentos de tallo de 7 a 10 cm con 2 ó 3 yemas de Rosa montezumae Humb. et Bonpl., comunmente llamada rosa montezuma o rosa silvestre, que es muy utilizada como porta injerto por los jardineros en Chapingo, México. Los segmentos de tallo se lavaron varias veces con agua y posteriormente se dieron 2 lavados con alcohol al 70%. La esterilización se hizo con hipoclorito de calcio (CaCl_2) durante 15 minutos e inmediatamente se lavaron los trozos de tallo con agua tridestilada, por lo me-

nos 5 veces.

Las yemas se cortaron a 5 mm de longitud bajo condiciones asépticas y se colocaron en el medio de cultivo de Cresswell y Nitsch (1975) sólido, que contiene 0,203 mg/l de ácido indol-3, butírico. Los citocultivos se mantuvieron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, las condiciones de incubación se realizaron en dos etapas.

Primera etapa. Consistió en observar los efectos independientes de luminosidad y oscuridad continua sobre el desarrollo de las yemas¹, para lo cual una parte de los citocultivos se incubaron en un cuarto luminoso con lámparas fluorescentes de luz blanca y la otra parte en la oscuridad.

Segunda etapa. Consistió en transferir una parte de los citocultivos mantenidos en el período de oscuridad al cuarto luminoso; la transferencia se realizó a los cuatro meses. En esta etapa no se sabía el efecto que pudiera causar la luminosidad sobre las yemas que enraizaron en el período de oscuridad (según resultados de la primera etapa).

RESULTADOS

Primera etapa. En una primera observación realizada a los 20 días después de haber sembrado, se notó que las yemas expuestas a oscuridad mostraban raíces de 2 cm de longitud y que variaban en número de 4 a 7 por yema mientras que las yemas expuestas a la luz presentaban el mismo número de raíces y de 7 mm a 1 cm de longitud. En ambos casos la formación de raíces ocurría después de haberse formado pequeñas callosidades en la superficie basal de la yema. La segunda observación, hecha a los 4 meses, mostró diferencias notables, ya que para las yemas incubadas en la oscuridad había un extenso desarrollo radicular (10 a 18 cm de longitud), mientras que para las yemas incubadas en luminosidad sólo se registraron longitudes de raíz entre 5 y 8 cm y en ninguno de los casos hubo desarrollo de hojas.

Segunda etapa. A los 40 días después de haberse hecho la transferencia de los citocultivos de la oscuridad a la luminosidad, las

¹ Dr. G. Carrillo C. Comunicación personal.

yemas enraizadas en el período de obscuridad exhibían ahora una expansión foliar (dos pequeñas hojas con 3 folíolos cada una); contrariamente a este resultado, las yemas que se mantuvieron en el período continuo de obscuridad no tuvieron ningún desarrollo foliar, sólo presentaban buen desarrollo radicular.

Todo el proceso de diferenciación se realizó en un sólo medio de cultivo es decir, no se necesitaron otros medios de cultivo ni de transplantar, ya que al obtenerse las plantas ya diferenciadas se pueden transferir a macetas con tierra esterilizada, y de aquí al campo u otro lugar según convenga.

DISCUSION

En el período continuo de luminosidad y obscuridad a los cuales estuvieron sujetos los citocultivos en la primera etapa, se considera que la inducción de raíces en las yemas fué debida a la presencia del AIB en el medio de cultivo, ya que se colocaron yemas en el mismo medio de cultivo pero sin hormonas y no sucedió la formación de raíz. Es posible que la obscuridad haya estimulado el desarrollo radicular, teniéndose de esa forma un efecto sinergista entre auxina-obscuridad para el crecimiento de raíz mientras que la luminosidad, en ésta primera etapa, posiblemente afecte al desarrollo radicular retardándolo. También es posible que la ausencia de expansión foliar en las yemas sujetas a el período oscuro y luminoso se deba a la presencia del AIB en una concentración que inhiba el desarrollo foliar, o bien que la ausencia de una fuente de luz no estimule la expansión foliar en el caso de las yemas que se mantuvieron en la obscuridad, u otro factor que no se ha estudiado.

Para la segunda etapa, la luz juega un papel importante para que exista expansión foliar, ya que las yemas que se mantuvieron en el período de obscuridad continua no manifestaron desarrollo foliar. Con seguridad la transferencia a la luz estimuló la actividad fotosintética de las yemas enraizadas en la obscuridad y con esto generó crecimiento de tallo y hojas, aunado a que posiblemente el AIB se haya consumido en el período de obscuridad (4 meses).

El presente trabajo se encuentra sujeto a posteriores estudios para dar mayor apoyo a las ideas expuestas o bien modificarlas.

CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto se pueden concluir los siguientes puntos:

1. La obscuridad estimula el crecimiento radicular en yemas de Rosa montezumae.
2. La luz estimula el crecimiento foliar.
3. Todo el proceso de diferenciación se logró en el medio de Cresswell y Nitsch, lo cual facilita el manejo del material ya que sólo basta con sembrar las yemas en el medio de cultivo e incubarlos en obscuridad y posteriormente transferir el material a la luz hasta obtener las plantas diferenciadas. Además se evitan contaminaciones que pudieran ocurrir si se tuviése que transplantar.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco al Dr. Salvador Miranda Colín, Presidente de la Rama de Genética del Colegio de Postgraduados, el haberme concedido participar en mis trabajos de investigación en el Laboratorio de Genética Molecular. Asimismo al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda de la Rama de Genética por sus valiosas orientaciones y enseñanzas.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott, A. J. and E. Whiteley. 1976. Cultures of Malus tissues in vitro. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Sci. Hort.* 4(2):183-189.
2. Asen, S. and R. E. Larson. 1951. Artificial culturing of Rose embryos. *Penn. State Collage, Rep. n. 40.*
3. Ben'Yaacov, J. and R. W. Langhans. 1972. Rapid multiplication of chrysanthemum plant by stem-tip proliferation. *Hort. Science* 7:289-290.
4. Bitters, W. P.; T. Murashige; T. S. Rangan and E. Naver. 1972. Investigations on establishing virus-free citrus plant through tissue culture. p. 267-271. In: W. C. Price (ed.) *Proc. 5th Conf. Intern. Org. Citrus Virol. Univ. Fl.*
5. Cresswell, R. and C. Nitsch. 1975. Organ culture of Eucaliptus grandis L. *Planta* 125:87-90.
6. Elliot, R. F. 1970. Axenic culture of meristem tips of Rosa multiflora. *Planta* 95:183-186.

7. Grainferberg, A. 1973. Coltura "in vitro" di embrioni e di parte di seme in Rosa canina. Riv. Ortoflorofrutt It. 58: 374-380.
8. Ibrahim, R. K. and Grisebbach. 1976. Purification and properties UDP-glucose: conyferil alcohol glucosyltransferasa from suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Arch. Biochem. and Biph. 176(2):700-708.
9. Intuwong, O. and Y. Sagawa. 1973. Clonal propagation of Phaseo nopsis by shoot tip culture. Amer. Orchid. Soc. Bul. 43: 893-895.
10. Jacobs, G. 1969. Tissue culture studies on the genus Rosa with special reference to the root tip. M. Sc. (Agric.) Thesis. University of Natal Pietermaritzburg, Republic of South Africa.
11. _____ . C. H. Bornman and P. Allan. 1968. Tissue culture studies on rose: use of pith explants. S. Afr. J. Agric. Sci. 11:673-678.
12. _____ . P. Allan and C. H. Bornman. 1970. Tissue culture studies on rose: use of shoot tip explants. II. Cytokinin: gibberellins effects. Agroplantae 2:25-27.
13. _____ . P. Allan and C. H. Bornman. 1970. Tissue culture studies on rose: use of shoot tip explants. III. Auxin: gibberellins effects. Agroplantae 2:45-49.
14. Jones, O. P., M. E. Hopgood and D. O'Farrel. 1977. Propagation in vitro of M 26 apple rootstocks. Jour. Hort. Sci. 52(2):235-238.
15. Jones, R. W., A. J. About, E. J. Hewitt, D. M. James and G. R. Best. 1976. Nitrate reductase activity and growth in Paul's Scarlet rose suspension cultures in relation to nitrogen source and molybdenum. Planta 133(1):27-34.
16. Nielson, L. W. 1960. Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweet potatoes. Phytopathology 50:840-841.
17. Smith, S. H., R. E. Hilton and N. W. Frazier. 1970. Meristem cultures for the elimination of strawberry viruses. Calif. Agric. 24(8):9-10.
18. Wallner, S. J. and D. J. Nevins. 1973. Formation and dissociation of cell aggregates in suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Amer. J. Bot. 60(3):255-261.