



COLEGIO DE POSGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

**ORGANOGENESIS INDIRECTA EN EXPLANTES DE PÉTALOS
DE CUATRO CULTIVARES DE *Begonia elatior*
CULTIVADOS *IN VITRO***

MARÍA FERNANDA MARTÍNEZ VELASCO

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISTO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis, titulada: **Organogénesis indirecta en explantes de pétalos de cuatro cultivares de *Begonia elatior* cultivados *in vitro***, realizada por la alumna María Fernanda Martínez Velasco, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. HÉCTOR GONZÁLEZ ROSAS

ASESORA



DRA. ANA MARÍA CASTILLO GONZÁLEZ

ASESORA



M.C. ELDA ARACELY GAYTÁN ACUÑA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

ORGANOGENESIS INDIRECTA EN EXPLANTES DE PÉTALOS DE CUATRO CULTIVARES DE *Begonia elatior* CULTIVADOS *IN VITRO*

María Fernanda Martínez Velasco, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Esta investigación se llevó a cabo con los objetivos de conocer la totipotencia del pétalo para generar plántulas, las condiciones nutrimentales y hormonales que pudieran permitir la clonación masiva de cuatro cultivares de *Begonia elatior*. Se emplearon pétalos completos que fueron cultivados en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), utilizando un diseño experimental completamente al azar con un factorial 4⁵, donde los factores a evaluar fueron: cultivares de *Begonia elatior* y concentraciones de los reguladores de crecimiento ANA y BA, 1) 0 mg L⁻¹ (ANA) + 0 mg L⁻¹ (BA) fue utilizado como testigo, 2) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 1.0 mg L⁻¹ (BA), 3) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), 4) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA) y 5) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 3.0 mg L⁻¹ (BA) generándose 20 tratamientos. Los cultivares que mostraron respuesta en regeneración de brotes/callo, fueron el cv. 'Heidi' con un promedio de 13.2 brotes suplementado con el tratamiento 1.0 mg L⁻¹ ANA+ 1.0 mg L⁻¹ BA y en el cv. 'Gloriosa' se obtuvieron, en promedio, de 8.4 brotes/callo con el tratamiento 1.0 mg L⁻¹ ANA+ 1.0 mg L⁻¹ BA, después de 65 días de cultivado en medio de cultivo MS. La inducción de raíces ocurrió en medio MS sin hormonas. Ocasionalmente, en el cultivar 'Gloriosa' se pudo observar la formación de yemas florales. Los cultivares Clara y Tacora Geel no expresaron ningún tipo de respuesta. Es posible que el pétalo se utilice como explante en cultivo *in vitro* para la propagación intensiva.

Palabras clave: organogénesis indirecta, yemas florales, *Begonia x hiemalis*.

**ORGANOGENESIS INDIRECT EXPLANTS PETALS *Begonia elatior* FOUR
CULTIVARS GROWN *IN VITRO***

María Fernanda Martínez Velasco, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

This research was conducted with the objective to know the petal's totipotency for the generation of plantlets and to learn about the nutritional and hormonal conditions that could allow massive cloning of four varieties of *Begonia elatior*. Whole petals were used to be planted on Murashige and Skoog culture medium using a completely random experimental design with a factorial 4⁵, where the factors to be evaluated were: cultivars of *Begonia elatior* and ANA and BA growth regulators concentrations, 1) 0 mg L⁻¹ (NAA) 0 mg L⁻¹ (BA) was used as a control, 2) 1.0 mg L⁻¹ (NAA) 1.0 mg L⁻¹ (BA), 3) 0.5 mg L⁻¹ (NAA) 2.0 mg L⁻¹ (BA), 4) 1.0 mg L⁻¹ (NAA) 2.0 mg L⁻¹ (BA) and 5) 0.5 mg L⁻¹ (NAA) 3.0 mg L⁻¹ (BA) generating 20 treatments. The biggest regeneration of shoots/callus was, on average, 13.2 from completed petal cv. 'Heidi' and in the cv. 'Gloriosa' were, on average, 8.4 shoots/callus with treatment 1.0 mg L⁻¹ NAA 1.0 mg L⁻¹ BA, after 65 days in medium culture supplemented with the MS treatment of 1.0 mg L⁻¹ NAA and 1.0 mg L⁻¹ BA. Occasionally there were flower buds in the treatment 1.0 mg L⁻¹ ANA 1.0 mg L⁻¹ BA in the cv. 'Gloriosa' Induction of roots occurred in MS medium without hormones. The cultivars Clara and Tacora Geel did not express any kind of response. It is possible that petal could be used as explant in the organogenesis and intensive propagation.

Keys words: indirect organogenesis, in vitro flowering, *Begonia x hiemalis*.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** por permitirme realizar mis estudios de maestría y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada.

Al postgrado de **Recursos Genéticos y Productividad – Fruticultura** por haberme permitido formar parte de ellos.

A todos los **Maestros y Doctores**, que conforman el postgrado de **Fruticultura** muchas gracias, por sus valiosas aportaciones que ayudaron a mi formación profesional, por su amistad y disposición que siempre me ofrecieron para aclarar mis dudas durante mi estancia, infinitamente agradecida.

A mi **Consejero Dr. Héctor González Rosas**, con mucho cariño y respeto por haberme guiado hasta el final de mis estudios, por su valiosa amistad, apoyo profesional y moral, consejos profesionales y de vida, y por la paciencia que siempre me tuvo, muchas gracias.

A la **M.C. Elda Aracely Gaytán Acuña**, con mucho aprecio y respeto por el apoyo que siempre me ofreció, por sus sabios y valiosos consejos, por su amistad y el aprecio que me tiene usted que es mutuo, mil gracias.

A la **Dra. Ana María Castillo González**, con respeto y mucha estimación, por las valiosas aportaciones que realizó en mi trabajo y por todo el apoyo brindado, muchas gracias.

Al **laboratorio de Embriogénesis**, por la facilidades otorgadas para poder llevar a cabo esta investigación.

Al **Laboratorio de Biotecnología** (sección cultivo de tejidos) de la **Universidad Autónoma Chapingo** (UACH), en especial y con mucho aprecio al **M.C. Isaías Gil Vázquez** y al **DR. Erick R. Navarro López**, por su amabilidad al permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio para llevar a cabo mi experimento muchas gracias.

Al **personal administrativo de Fruticultura** integrado por: **Elsa, Cristina, Sandy** y **Lupita** por su apoyo, amabilidad y amistad que me brindaron.

Al todo el personal de **servicios académicos** y **área de becas** por la atención brindada durante mi estancia.

Al **personal de Biblioteca** por la facilidad de otorgarme el material de consulta.

A TODOS MI MÁS ETERNO Y SINCERO AGRADECIMIENTO

DEDICATORIA

A Dios: por estar siempre a mi lado, guiando cada uno de mis pasos dándome fortaleza, paciencia y sabiduría necesaria para la culminación de este trabajo de investigación y por tantas bendiciones que me ha dado.

A mis padres: María Inés Velasco de los Ríos y Fernando Martínez Aparicio, con todo mi amor y respeto por todo su amor, confianza, consejos y el apoyo incondicional que siempre me han brindado, eternamente agradecida por todo lo que han hecho por mí. Le doy gracias a Dios por haberme dado a unos excelentes padres como lo son ustedes, los AMO infinitamente con todo mi corazón y este éxito también es de ustedes.

A mis preciosas hermanas: Marcela y Alejandra, muchas gracias por estar siempre conmigo apoyándome en todo momento, por creer en mí, y por el amor que nos tenemos, me siento muy dichosa por tenerlas a mi lado.

A mis amigas: Viviana, Liliana, Samanta, Gaby, Sinaí, Carmen, Yaneli y Saraí, muchas gracias por su preciosa amistad, por haber llenado mis momentos de soledad cuando más lo necesite, por las alegrías y tristezas que juntas pasamos, por todo el apoyo que me brindaron durante mi estancia en el colegio, le doy gracias a Dios por haber puesto en mi camino a unas mujeres increíbles como ustedes, soy muy afortunada por tenerlas como mis amigas, las quiero mucho niñas.

“No fue fácil, pero lo logré”

CONTENIDO

Resumen	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	xi
Índice de cuadros	xii
I. Introducción	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivo particular	3
1.2 Hipótesis	3
II. Revisión de literatura	4
2.1 La floricultura en México.....	4
2.2 Principales estados florícolas	4
2.3 Superficie florícola.....	5
2.4 Antecedentes de las begonias	6
2.4.1 División taxonómica.....	6
2.4.2 Origen	6
2.4.3 Descripción botánica..	6
2.4.4 Especies de begonias.	7
2.5 Temperatura.....	8
2.6 Humedad ambiental.	9
2.7 Propagación de begonias.....	9
2.8 Plagas y enfermedades.	9
2.8.1 Plagas	9
2.8.2 Enfermedades.	10
2.9 Biotecnología en ornamentales	10
2.10 Cultivo de tejidos vegetales	11
2.10.1 Historia de tejidos vegetales.....	11

2.11 Micropropagación	11
2.11.1 Tipos de explantes usados en la micropropagación	12
2.11.2 Organogénesis.....	13
2.12 Regeneración a partir de estructuras florales	14
2.12.1 Clavel <i>Dianthus Caryo Phyllus</i>	14
2.12.2 Tipos de explantes usados en la micropropagación de crisantemo.	16
2.12.3 Regeneración a partir de estructuras florales	17
2.12.4 <i>Aster spp.</i>	18
III. Material y Métodos	20
3.1 Localización	20
3.2 Material biológico.....	20
3.3 Medio de cultivo	21
3.4 Desinfección del material vegetal.	21
3.5 Siembra de pétalos.....	23
3.6 Condiciones de incubación.....	23
3.7 Obtención de plántulas.....	23
3.7.1 Inducción de la raíz	23
3.8 Diseño experimental.....	23
3.8.1 Combinación de los tratamientos.....	24
3.9 Variables evaluadas	24
IV. Resultados y Discusión	25
4.1 Porcentaje de callo formado en pétalos de <i>Begonia elatior</i>	25
4.2 Días para formación de brotes.....	27
4.3 Número de pétalos formadores de organogénesis	30
4.4 Número de brotes en pétalos de <i>Begonia elatior</i>	31
4.5 Formación de raíces	36

V. Conclusiones	37
VI. Literatura Citada	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cultivares de <i>Begonia elatior</i>	20
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso para desinfección de pétalos de <i>Begonia elatior</i>	22
Figura 3. Callo formado a partir de pétalos de <i>Begonia elatior</i> en cuatro cultivares, con influencia de dosis diferentes de ANA y BA	25
Figura 4. Callo formado en la zona basal del pétalo de <i>Begonia elatior</i> cv. Heidi, con influencia del tratamiento 2) 1.0 mg L^{-1} (ANA) + 1.0 mg L^{-1} (BA), cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).	26
Figura 5. Formación de primordios en la zona basal de pétalos de <i>Begonia elatior</i> cv. Heidi, con influencia del tratamiento 2) 1.0 mg L^{-1} (ANA) + 1.0 mg L^{-1} (BA), cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).	28
Figura 6. Formación de brotes en la zona basal de pétalos de <i>Begonia elatior</i> cv. Heidi, a los 90 días después de la siembra con influencia del tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA+ 1.0 mg L^{-1} BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).	28
Figura 7. Formación de brotes con tallos independientes en la zona basal de pétalos de <i>Begonia elatior</i> cv. Heidi, a los 120 días después de la siembra con influencia del tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA+ 1.0 mg L^{-1} BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).	29

Figura 8. Pétalos de cultivares de <i>Begonia elatior</i> con respuesta de organogénesis, con influencia de dosis diferentes de ANA y BA	30
Figura 9. Pétalos de <i>Begonia elatior</i> de cuatro cultivares formadores de organogénesis, con influencia de dosis diferentes de ANA y BA	32
Figura 10. Pétalo de <i>Begonia elatior</i> cv. Gloriosa. Letra A indica la yema floral formada con efecto del tratamiento 2 (1.0 mg L ⁻¹ ANA + 1.0 mg L ⁻¹ BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).	35
Figura 11. Formación de raíces adventicias en el cv. Gloriosa tratamiento 2 (1.0 mg L ⁻¹ ANA + 1.0 mg L ⁻¹ BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	36
Figura 12. Formación de raíces en el cv. Heidi con influencia de tratamiento 2 (1.0 mg L ⁻¹ ANA + 1.0 mg L ⁻¹ BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	37

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Estructuras vegetativas utilizadas en la propagación <i>in vitro</i>	13
Cuadro 2. Tratamientos obtenidos con la combinación de cuatro cultivares de <i>Begonia elatior</i> (Clara, Heidi, Gloriosa y Tacora Geel) y las concentraciones de ácido naftalen acético (ANA) y bencil amino purina (BA).	24
Cuadro 3. Días para formación de brotes en los cultivares de <i>Begonia elatior</i> , bajo el efecto de los tratamientos combinados con ANA y BA.	27
Cuadro 4. Número de brotes en pétalos de <i>Begonia elatior</i> en los cultivares Heidi y Gloriosa promovidos en 5 tratamientos con ANA y BA	34

I. INTRODUCCIÓN

La familia begoniácea comprende cinco géneros y 920 especies de las cuales la mayoría pertenecen al género *Begonia* (Kabirnataj *et al.*, 2012, Mendi *et al.*, 2009). El género *Begonia* comprende aproximadamente 2000 cultivares y alrededor de 200 especies que han sido introducidas por cultivadores comerciales, entre ellas *Begonia tuberhybrida*, *Begonia rex*, *Begonia semperflorens*, *Begonia x hiemalis*, *Begonia x elatior*, *Begonia x cheimantha* y *Begonia x socotrana* (Takayama, 1982). Las begonias forman parte de nuestras plantas de adorno más bonitas y variadas y ha sido, durante años, la primera planta de flor en Europa Central y aunque en la actualidad ya no es tan vendida se mantiene en una posición privilegiada entre las 10 primeras comercialmente (Rout *et al.*, 2006). Las begonias son importantes como plantas ornamentales perennes que están distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se emplean en los jardines y como plantas de maceta. En general, son propagadas por semilla o vegetativamente por esqueje de hoja, rizomas, tubérculos y principalmente por esqueje de hoja con peciolo (Mendi *et al.*, 2009). No obstante, es posible que métodos convencionales de propagación sean problemáticos debido a la rápida aparición de enfermedades. Además, La producción de grandes cantidades de plantas genéticamente homogéneas es también muy difícil. *Begonia elatior* es el producto de la cruce de *Begonia socotrana x Begonia tuberhybrida*, se conoce como *Begonia hiemalis* y es considerada como una flor con gran potencial por la gran aceptación en el consumo local, pero con un buen manejo en su comercialización se puede considerar para el mercado internacional. En el mercado nacional, *Begonia elatior* es la predominante, entre las begonias, puesto que las ventas señalan que es de alrededor del 90% y posiblemente su demanda se incremente. Sin embargo, por ser un producto de importación, el costo por esqueje es de 0.45 €, un equivalente a \$9.00 costo que resulta alto al productor. Ante esta situación se requiere de un método que permita la obtención de material vegetativo a un bajo costo de producción.

Siendo la biotecnología, específicamente la micropropagación, una herramienta para la propagación masiva para la horticultura, en general, y para las plantas ornamentales en particular y por los objetivos que están originando este trabajo, pensamos que fue conveniente utilizarla. Para esta investigación se escogió al pétalo como explante porque creemos que tiene la misma capacidad morfogénica que la hoja, tallo raíz, etc. sembrado en un medio de cultivo apropiado. Además, a pesar que las begonias han sido estudiadas por diversos investigadores (Takayama y Misawa,1982; Simmonds y Werry; Bowes y Curtis, 1991; Nakano *et al.*,1999; Bouman y Klerk, 2001; Kishimoto *et al.*, 2002; Burritt *et al.*, 2003; Espino *et al.*, 2004; Nhut *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 2006, 2007; Mendi *et al.*, 2009; Kabirnatay *et al.*, 2012) hasta donde sabemos, no hay evidencias suficientes que demuestren que el pétalo de *Begonia elatior*, tiene la totipotencia necesaria para ser utilizado como explante en un programa de micropropagación con orientación comercial. Consideramos que *Begonia elatior*, como planta madre, puede tener mayor posibilidades para ser un mejor tipo de explante sobre todo por la cantidad de flores y pétalos que se tiene en una planta y por lo tanto es excelente material para una propagación masiva de interés comercial. Por lo anterior, este trabajo se orientó, como un método alternativo de propagación masiva de *Begonia elatior* y se pretendió establecer un protocolo para conocer por un lado, la totipotencia del pétalo para la generación de plántulas y por otro lado, las condiciones nutrimentales y hormonales que puedan permitir la clonación masiva de *Begonia elatior*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general:

Conocer la capacidad de regeneración que tienen los pétalos de *Begonia elatior* para producir plántulas.

1.1.2 Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto de cuatro cultivares de *Begonia elatior* en el proceso de organogénesis *in vitro*.
- Determinar la respuesta organogénica en pétalos de cuatro cultivares de *Begonia elatior*, con cinco concentraciones distintas de ANA (ácido naftalen acético) y BA (bencil amino purina).

1.2 Hipótesis:

- El pétalo de *Begonia elatior* tiene la capacidad de regenerar brotes en condiciones *in vitro*.
- La capacidad de organogénesis del pétalo *Begonia elatior* está influenciada por el cultivar y la concentración hormonal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La floricultura en México

México ha tenido una tradición florícola desde hace muchos siglos, el mercado interno es altamente demandante de flores, en la actualidad, cerca del 90% de la producción nacional se consume internamente y el resto se exporta.

La producción de flores en cualquier país, al igual que la gran mayoría de los productos agrícolas, esta altamente relacionado con el clima y la rentabilidad económica. Es cierto que el clima podría no ser un problema, debido a las técnicas de producción en invernadero, donde se puede controlar las condiciones climáticas, además los buenos rendimientos y la calidad del producto dependen de temperatura, humedad relativa, radiación y condiciones del viento (Claridades Agropecuarias, 2006).

México está considerado como un país rico en recursos naturales, gracias a la gran diversidad de climas, la riqueza de sus suelos, el nivel de precipitación pluvial, etc. En casi 2,000.000 de km² de extensión se encuentran casi todos los paisajes naturales existentes en el mundo, tal es el caso de las zonas desérticas, hasta las selvas más impresionantes en las zonas húmedas, todo esto es resultado de la localización geográfica de México, dado que esta entre la zona tropical de América Central y la subtropical y templado de América del Norte.

Al tener estas condiciones climáticas y riqueza en suelos nuestro país tiene un amplio potencial para producir una gran cantidad de productos agrícolas entre ellos una gran diversidad de especies florales (Claridades Agropecuarias, 2006).

2.2 Principales estados florícolas

La mayor parte de los productores se encuentran en los Estados de México, Puebla, Morelos y Distrito Federal, entidades que concentran alrededor del 70% de los productores y de las unidades de producción (SAGARPA,2012).

La región de Xochimilco, en el Distrito Federal se ha caracterizado desde tiempos antiguos por la producción de flores, hortalizas, plantas medicinales y frutales, actualmente se produce una gran cantidad de plantas ornamentales (Fundación Produce Guerrero, 2012).

2.3 Superficie florícola

Reportes indican que existen a nivel nacional 30,000 has dedicadas a la horticultura ornamental, siendo el Estado de Morelos el principal productor de plantas de ornato y flores en maceta, ocupando el 32%, equivalente a 2,100 has con 2,200 viveros distribuidos en toda la entidad en los cuales se producen mas de 1,000 especies y generan 11,000 empleos, el 40% de estos lo ocupan mujeres. (Fundación Produce Guerrero, 2012). En estas 2,100 ha, el 58% son cultivos a cielo abierto (1,218 ha), el 20% bajo invernadero (420 ha) y 22% a media sombra (462 ha). Se cultivan flores de corte como: agapando, gladiola, liliium, nardo, ave del paraíso, rosa, girasol, lisianthus, alcatraz y estaticice; plantas de follajes como ficus, helechos, araucarias, teléfonos, hiedras, coleos, cedros, cissus y phylodendrum entre otros; plantas en maceta con flores como impatiens, petunias, kalanchoes, nochebuenas, anturios, crisantemos, cempaxúchitl, pensamientos, begonias, vincas, alcatraz, spathiphyllum, liliium, bromelias, orquídeas, hortensias, gerberas y cyclamen, entre otras (Fundación Produce Guerrero, 2012).

2.4 Antecedentes de las begonias

Las begonias, son llamadas así en honor a Michael Begon contribuyente de la botánica. Se cultivan como plantas en maceta para floración con diversas variaciones en los colores, tamaño floral, forma y textura de las flores.

Se clasifican de acuerdo a su sistema radical, como rizomatosas, tuberosas o fibrosas. Existen más de 1000 especies de begonias distribuidas originalmente en diversas áreas, como África, América Central y del Sur y Asia. Aproximadamente 200 especies se cultivan comercialmente, pero sólo unas pocas son prominentes. El género comenzó a figurar como un cultivo importante a mediados del siglo XIX pero los ingleses ya estaban mejorando los cultivos de begonia desde 1777 (Larson, 2004).

2.4.1 División taxonómica

Pertenece a la familia Begoniaceae, se encuentra compuesta por los géneros: *Begonia*, *Begonilla* e *Hillebrandia* (Gispert, 1989). Está clasificada dentro del género *Begonia*, el cual comprende alrededor de 1,000 especies (Valley, 1997).

2.4.2 Origen

La mayoría de las begonias provienen de un clima subtropical o tropical. Algunas especies son originarias de África o de Asia, pero la mayor parte de las especies tienen su origen en América. En la actualidad se encuentran distribuidas por todo el mundo (Watson y Dallwitz, 1997).

2.4.3 Descripción botánica

La familia de las begonias está formada por plantas herbáceas, pero también pueden presentarse formas arbustivas y rastreras. A su vez pueden ser plantas suculentas o no suculentas. En general son plantas perennes aunque también las

hay anuales. Pueden poseer agregados de hojas en la base o en las puntas, son de tamaño mediano, alternas y pecioladas, simples o compuestas (Brickell, 1992).

2.4.4 Especies de begonias

A. *Begonia semperflorens*: los cultivares más prominentes son del tipo enano, que raramente pasan de los 20 cm de altura, con follaje verde brillante o bronceado. Los colores de la flor varían de blanco a escarlata brillante.

B. *Begonia* de Navidad: las listas de nomenclatura y cultivares de las begonias de Navidad son confusas. Algunos autores clasifican a las cultivares como Lady Mac, Melior, simplemente como *Begonia socotrana*, mientras que otros los refieren como resultados de cruzas entre *Begonia socotrana* x *Begonia dregei*. Las begonias de Navidad fueron consideradas por (Post, 1950) como las más prominentes de las begonias cultivadas comercialmente, pero realizó esta afirmación antes de la introducción de la *Begonia elatior*.

Este grupo de begonias también está clasificado como “semituberosas” porque la porción basal del tallo aumenta en tamaño conforme la planta madura. Sin embargo, no es un tubérculo y no se vuelve latente como la verdadera *Begonia tuberosa*.

C. Begonias tuberosas (*Begonia tuberhybrida*): las begonias tuberosas pueden ser plantas para maceta de floración atractiva, especímenes de jardín o plantas de jardineras de ventana, se cultivan principalmente por sus flores y existen grandes variaciones en color, forma, tamaño y textura de la flor.

D. Begonias rizomatosas: fue la *Begonia* verdaderamente dominante en la floricultura comercial. Actualmente hay begonias rizomatosas que compiten con las begonias ‘Rex’ en belleza y en popularidad como la begonia ‘Iron Cross’ (*B. mansoniana*) que es una planta para maceta muy atractiva.

E. *Begonia elatior*: muy pocas flores en maceta han adquirido una popularidad tan rápida como esta especie, estas begonias resultaron de cruza entre *Begonia socranata* y begonias híbridas tuberosas. La historia de estas cruza fue reportada por (Doorenbos y White, 1973). En 1883 se realizó la cruza original entre *Begonia socotrana* y *Begonia tuberhybrida* y en 1954 Otto Rieger de Alemania, introdujo la *Begonia elatior* Rieger. Investigaciones de (Sandved, 1969 y White *et al.*, 1973) revelaron muchas cosas sobre la respuesta de las begonias Rieger al ambiente. En plantas de día corto con una duración del día crítica de poco menos de 13 horas. Se recomiendan cuatro horas de luz a media noche para los días de invierno cuando es necesario el crecimiento vegetativo, mientras que a principios de abril y septiembre una interrupción de 1 hora a media noche es adecuada (Larson, 2004).

2.5 Temperatura

La mayoría de las begonias son de origen tropical no resisten heladas. Su rango de temperatura óptimo se encuentra entre 10 y 27°C, pero pueden soportar temperaturas más frías por las noches y tolerar temperaturas más cálidas durante el día, siempre y cuando se protejan de los rayos solares directamente y de los vientos secos (Valley, 1997).

La temperatura tiene un efecto sorprendente en el crecimiento, la floración y la respuesta fotoperiódica (Sandved, 1969) reportó que las altas temperaturas nocturnas en el cv. 'Schwabenland Red' retardaron la floración, las flores resultaron pequeñas y las plantas demasiado altas. El cv. Liebesfeuer no fue afectada de manera negativa por las altas temperaturas (Mikkelsen, 1973) recomendó temperaturas nocturnas de 20 – 21°C durante las primeras etapas de la producción, 18°C tres semanas antes del comienzo de los días cortos y 16° - 17°C después de que se iniciaron los botones florales.

2.6 Humedad ambiental

Prefieren altas humedades, existen algunas que toleran el aire seco. La mayoría de las begonias se desarrollan bien en un rango de humedad de 40 a 70% (Valley, 1997).

2.7 Propagación de begonias

Pueden ser propagadas por esquejes de tallo, por esquejes de hoja, por tubérculos, rizomas o por semilla dependiendo de la especie. A nivel comercial, la mayoría de las begonias se propaga por esquejes, aunque en los programas de mejoramiento y obtención de nuevos cultivares la propagación por semilla es de gran ayuda (Berg, 1997).

2.8 Plagas y enfermedades

A pesar de que las begonias no son muy atractivas para los insectos entre los más importantes destacan los siguientes:

2.8.1 Plagas

- piojos harinosos (*Icerya spp.*)
- araña roja (*Tetranychus urticae*)
- áfidos (*Aphis spp;* *Breviconine spp.*)
- trips (*Thrips tabaci*)
- mosquitas blancas (*Trialeurodes spp.*)

(Adams, 1987; Larson, 2004; Nau, 1990 y Martin 1991).

2.8.2 Enfermedades

Los problemas de enfermedades en las begonias son más severos cuando hay humedad relativa alta, y cuando el control de la temperatura y la ventilación no son adecuados (Larson, 2004 y Tietz, 1991).

- cenicilla polvorienta (*Oidium begoniae*)
- tizón bacteriano (*Xanthomonas campestris pv. begoniae*)
- botritis (*Botrytis cinérea*)
- pudrición del tallo y la corona (*Phytium spp; Rhizoctonia spp.*)
- roya (*Coleosporiumsoidaginis*)

2.9 Biotecnología en ornamentales

La floricultura en México es un sector con bajos niveles de productividad, baja calidad y un volumen muy variado, tiene poca innovación, falta capital para inversión y desconocimiento de los requisitos para exportar. Además tiene problemas por el uso ilegal de semillas, falta de infraestructura para transporte y refrigeración (Funprover, 2008).

Sin embargo, el desarrollo de la actividad florícola mundial se ha favorecido por los adelantos de la ciencia y la tecnología. En los últimos años, se han implementado técnicas de mejoramiento vegetal basadas en procesos biológicos y/o genéticos con diferentes grados de sofisticación denominadas biotecnología. Estos avances han beneficiado el desarrollo de los productos ofrecidos en el mercado en cuanto a calidad y diversidad una de las técnicas más utilizada es la de cultivo *in vitro* o micropropagación (Zuñiga y Alarcón, 2010).

2.10 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de células y tejidos vegetales son un conjunto de técnicas utilizadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street, 1977; Calva y Ríos, 1999). Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Fert y Paul, 2000).

2.10.1 Historia de tejidos vegetales

En 1838 Schwann y Schleiden, postularon la teoría denominada de la totipotencia, la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa. Esta teoría fue el núcleo del que nació el cultivo de tejidos y células (Pierik, 1994).

2.11 Micropropagación

Es un término empleado para describir a la propagación asexual de plantas. Es una de las técnicas más utilizadas, debido a su enorme productividad al compararse con las técnicas tradicionales de propagación de plantas vía semilla o propagación vegetativa (Zúñiga y Alarcón 2010).

Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son en los campos de micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Fowler 1987, Carpita y McCann 2000).

2.11.1 Tipos de explantes usados en la micropropagación

Entre los explantes usados para el cultivo *in vitro* se encuentran fragmentos de hojas, tallo, estructuras florales, entrenudos de tallo, hipocótilo y yemas apicales (Cuadro 1) Se han usado tejidos de tallos nodales cultivados *in vitro* o *in vivo*, para producir yemas, ha sido posible distinguir el origen de las yemas axilares o adventicias. Se ha obtenido una alta frecuencia regenerativa de tallos debido la edad y la etapa de desarrollo de las yemas; con tejidos más jóvenes, hay una mayor respuesta. En otros reportes se menciona la regeneración de yemas a partir de explantes de hojas. Existen más evidencias substanciales en la producción de yemas adventicias en meristemas apicales, acompañado de estudios histológicos detallados. Sin embargo, el éxito se obtuvo con la regeneración de brotes adventicios a partir de yemas axilares, la composición hormonal del medio, el tamaño del explante y el tiempo entre subcultivos influyeron en la producción de brotes. Este brote de células corticales y ocasionalmente epidérmicas cerradas se llevo a cabo en la zona basal debido a que es un sitio de activa división celular y formación de yemas adventicias (Hutchinson *et al.*, 1992).

En los sistemas de cultivo de tejidos hay cinco tipos fundamentales de regeneración vegetativa: a) alargamiento de las puntas meristemáticas, b) producción axilar de ramas, c) iniciación adventicia de ramas, d) organogénesis y e) embriogénesis (Hartmann y Kester, 1995).

Cuadro 1. Estructuras vegetativas utilizadas en la propagación *in vitro*.

ESPECIE	ÓRGANO	MORFOGÉNESIS	REGULADORES DE CRECIMIENTO	CITADO
Begonia	Hojas, pecíolos y pedúnculos florales	Formación de brotes y yemas florales	Citocinina, adenina y auxina.	Ringe and Nitsh. 1968.
Rhododendron	Estambres	Callos, yemas adventicias y estructuras florales adventicias.	Thidiazurón (TDZ) e Isopenteniladenina (2iP).	Shevade and Preece, 1193.
Saintpaulia ionantha	Pétalos de botones florales	Formación de yemas adventicias	BA y ANA	Molgaard <i>et al.</i> , 1991.
Crisantemo	Hojas y pétalos	Variación somaclonal	ANA y Cinetina	Khalid <i>et al.</i> , 1989. Cervantes, 1996
Clavel	Tallos y pétalos	Yemas adventicias	Thidiazurón y BA	Cervantes, 1996 Nugent <i>et al.</i> 1991; Miller <i>et al.</i> , 1991.
Cebolla	Cabezuela floral	Brotes	BA	Dunstan and Short, 1979.
Aster	Estrutucas florales	Callos y brotes	BA y ANA	Cervantes, 1996 García, 1999

2.11.2 Organogénesis

La organogénesis, se refiere a la iniciación de tallos y raíces adventicias dentro de masas de células de callo. Estas masas de células de callo son vacuoladas y en gran parte parenquimatosas, pueden desarrollar meristemoides, que en condiciones específicas de cultivo *in vitro*, inician órganos. El proceso es similar al de la iniciación

de brotes adventicios en explantes, excepto que ha ocurrido un período intermedio de crecimiento independiente de callo (Hartmann y Kester 1995).

2.12 Regeneración a partir de estructuras florales

La regeneración de yemas adventicias a partir de estructuras florales, se ha usado en diferentes especies vegetales, como clavel, crisantemo, violeta africana, gerbera, aster, etc.

2.12.1 Clavel *Dianthus caryophyllus*

Nugent *et al.*, (1991) citan que los primeros trabajos donde se usaron pétalos de clavel como explantes, fue en 1979, posteriormente (Gimeli *et al.*, 1984) reportaron una eficiencia de formación de yemas del 4.26 al 34.9% y de 0.5 a 7.8 brotes por pétalo.

De acuerdo con Hutchinson *et al.* (1992) en clavel se han usado exitosamente, tejidos florales (incluyendo anteras, óvulos y pétalos) como fuente de explantes para regeneración de brotes. Los trabajos más recientes con pétalos (Nugent *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1994) han mostrado ser una confiable y prolifera fuente de producción de yemas adventicias, usándose en una gran cantidad de cultivares. Se logra tener una buena regeneración de yemas si los pétalos se fragmentan. La formación de yemas nunca ocurre del corte distal surgido de los pétalos, pero puede estar restringido principalmente por el tejido verde proximal de piezas de pétalos individuales y fragmentos adheridos al receptáculo. Una revisión histológica de regeneración de pétalos mostró que las yemas provenían de células subepidérmicas con una activa división. Cuando se usaron pétalos como explantes *in vitro* se observaron floraciones anormales tales como el desarrollo de pétalos parecidos a hojas y deformaciones de botones florales. Los métodos para inducir floración *in vitro* comprenden la exposición de pétalos regenerados a días cortos (8 horas) o incluyendo giberelinas en el medio. Nugent *et al.* (1991) obtuvieron regeneración de plantas vía iniciación de yemas adventicias de explantes de pétalos y segmentos de tallos de diferentes cultivares de

clavel. La diferencia en la respuesta se observó con el cv. 'White Sim' teniendo la mejor respuesta para ambos tipos de explantes. Las plantas también fueron regeneradas de receptáculos de esta variedad. Se comparó el efecto de diferentes citocininas en la regeneración del pétalo y los explantes de tallos del cv. 'White Sim' con Thidiazuron fue más efectivo que 6-Benzilaminopurina o cinetina. En explantes de tallos la capacidad morfogenética se determinó por la etapa de desarrollo del explante. Se observó un alto porcentaje de formación de brotes en los segmentos de tallos más jóvenes en todas las pruebas con citocininas. Las plantas derivadas de tallos crecieron menos que las plantas derivadas de pétalos o receptáculos y su producción fue normal, las plantas florecieron 8 a 10 meses después de cultivadas.

Miller *et al.* (1991) al usar como explantes fragmentados de yemas florales de clavel, encontraron que la regeneración de yemas adventicias nunca ocurrió de la superficie del corte distal de los pétalos; sin embargo, en una revisión histológica los pétalos mostraron regeneración de brotes en las células próximas al final del pétalo (células subepidérmicas), mostrando una activa división celular.

Robinson y Firoozabady (1993), regeneraron brotes de clavel por organogénesis directa en pétalos basales, filamentos, estilos, receptáculos y bases foliares cultivados *in vitro* en un medio MS con 2.5 μM de AIB y 0.75 μM de tidiazuron. El proceso tardó de 2 a 3 semanas, regenerándose de 3 a 19 brotes por explante. Estos brotes enraizaron fácilmente y se transfirieron al invernadero.

Nakano *et al.* (1994) observaron que los explantes de pétalos se alargaron en la primer semana de cultivo y algunos mostraron coloración verde en la zona basal, después de dos semanas los primordios empezaron a ser visibles en esta región y desarrollaron yemas adventicias después de tres y cinco semanas, sin observar regeneración en otra región del pétalo.

2.12.2 Tipos de explantes usados en la micropropagación de crisantemo

En crisantemo se ha regenerado de yemas adventicias de una gran cantidad de explantes, originándose de explante superficial o vía callo. Se han usado con éxito, callos derivados de flores liguladas, hojas y yemas apicales para producir yemas adventicias. Así mismo, se reporta la regeneración directa de tallos adventicios de explantes de pétalos, hojas, tallos y pedicelos florales; sin embargo, en cada caso no todos los cultivares respondieron favorablemente. En una comparación en regeneración de explantes de tallos y hojas de diferentes cultivares, en el mismo cultivo, la frecuencia de regeneración fue siempre mejor en tallos. Además, la respuesta a concentración de ácido naftalen acético (ANA) fue muy diferente para los dos tipos de explantes. La regeneración de brotes en explantes de hojas tuvo un incremento con concentraciones de ANA menores a 5 μM ; mientras que en segmentos de tallos, el incremento ocurrió con concentraciones de ANA mayores de 1 μM .

Una revisión histológica de regeneración de explantes, mostraron que las yemas adventicias provienen de diferentes tejidos, dependiendo del explante inicial. En explantes de tallos, los brotes se originan de células corticales, mientras que con pedicelos florales, las células epidérmicas se identificaron como las únicas promotoras de los brotes. Se ha obtenido embriogénesis somática de explantes de hoja ocurriendo una máxima respuesta después de transferido a la oscuridad, cultivado temporalmente en la luz. La concentración de sacarosa altera la respuesta morfogénica, con niveles bajos (3 a 6%) produce solo organogénesis de yemas y raíces, mientras que con niveles altos (12 a 18%) produce embriones somáticos. Los embriones se desarrollan de la epidermis hipodermal de la hoja (Hutchinson *et al.*, 1992).

2.12.3 Regeneración a partir de estructuras florales

Desde hace 21 años, se reporta el uso de flores liguladas de crisantemo, en la propagación *in vitro* de yemas adventicias (Bush *et al.*, 1976; Miyazaki y Tashiro, 1978), éstas se han regenerado principalmente para obtener variación somaclonal y la transformación de especies, siendo éste su uso más eficiente.

Khalid *et al.* (1989) obtuvieron plantas de crisantemo en el cv. 'Early Charm' a partir de hojas y pétalos mediante regeneración directa o por una etapa intermedia de callo, con el objetivo de obtener variación somaclonal. En sus resultados obtuvieron un total de 117 plantas de 10 explantes de pétalos de flores liguladas, siendo mayor que los obtenidos por hojas. Los explantes mostraron un fácil y eficiente sistema de regeneración; con pétalos se produjo una fuente superior de variación que el obtenido con hojas. Las variantes de un genotipo amarillo retuvieron su color normal, mientras que en las de genotipo blanco, se obtuvieron plantas con flores liguladas de color lila. Dos de las seis variantes obtenidas del genotipo blanco, fueron consideradas de valor comercial. El quimerismo, mutación de genes o los cambios cromosómicos, son considerados como una posible causa.

Cervantes (1996) utilizando estructuras florales de crisantemo, observó la formación de callo a partir de los 25 días de inoculación, notándose callos de color verde y de forma granular en la base del pétalo y en la punta de la lígula, mientras que el desarrollo de brotes se presentó a los 45 días de haberse sembrado, originándose de los callos que se formaron de la base del pétalo. Respecto al número y longitud de brotes en crisantemo, se empezaron a manifestar a los 45 días y a los 90 días, ya presentaba de 6 a 7 brotes por pétalo, aproximadamente de 5.4 cm de longitud; sin embargo, algunos callos no presentaron desarrollo de estos. Así mismo, los brotes presentaban de 10 a 12 hojas.

2.12.4 *Aster spp.*

Cervantes (1996) utilizó las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1.0 mg de L^{-1} de ANA + 1.0 mg L^{-1} de BA y se adicionaron 50 o 100 de mg L^{-1} de kanamicina. Los explantes usados fueron pétalos de color blanco del cv. Monte Casino, se detectó callo a partir de 20 días, de color blanco, después amarillo-verdoso y finalmente café claro; mientras que para el color morado cv. Blue Butterfly se tardó más, formándose hasta los 30 días y en poca proporción. Esta callosidad se originó a partir de la base del pétalos, llegando al 80% en el cv. Monte Casino y un 20% en el cv. Blue Butterfly. Por otro lado, los explantes de aster del cv. Monte Cassino, inicio brotación a los 40 días de la siembra originándose de toda la superficie donde había callo, mientras que para el cv. Blue Butterfly, a los 70 días, todavía no presentaba desarrollo de brotes. En el cv. Monte Casino, la brotación se manifestó a los 40 días de incubación y a los 65 días, ya se contaba con una cantidad de 6 a 7 brotes por explante de aproximadamente 2.7 cm de longitud, dichos brotes se originaron de toda la callosidad formada, presentando de 4 a 6 hojas por brote. Las plántulas obtenidas presentaron una alta capacidad de enraizamiento usando un medio MS con 0.5 mg L^{-1} de AIB, ya que a los 10 días de haberse transferido en el medio para enraizar, la mayoría de las plántulas tenían de 4 a 6 raíces y a los 25 días de enraizamiento, presentaban raíces de aproximadamente 6 cm de longitud, las cuales ya estaban listas para transplantar a macetas y seguir su restablecimiento en invernadero.

García (1999) utilizando como base las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog) obtuvieron 15 tratamientos con varias concentraciones de ANA y BA y un testigo. Utilizó tres concentraciones de ANA Y BA (0.5 , 1.0 y $3.0 \text{ mg}^{-1}\text{L}$) solas y en combinaciones. Teniendo los siguientes resultados; para la inducción de callo, obtuvo una mayor respuesta en el cv. Blue Butterfly, ya que sólo agregó auxinas al medio de cultivo para obtener una respuesta positiva. Para el caso del cv. Monte Cassino, la presencia de auxinas en combinación con citocininas en el medio de cultivo favoreció la respuesta en la formación de callo. Ya que, aunque en las proporciones 1:0 y 3:0

donde no se agregaron citocininas hubo presencia de callo y este se vio favorecido cuando se conservo la misma concentración de auxinas además de agregar citocininas. En ambos cultivares, en ausencia de auxinas en el medio de cultivo se presenta necrosamiento y muerte de tejidos. Para el cv. Monte Cassino, conforme aumentó la concentración de auxinas/citocininas en proporciones iguales al medio de cultivo, el porcentaje de flores liguladas que presentaron callo se incrementó, por el contrario en el cv. Blue Butterfly, al aumentarse la concentración de los mismos reguladores, el porcentaje de formación de callo se vio afectado presentándose una disminución en las flores liguladas que lo presentaron. Los explantes de aster del cv. Monte Cassino, iniciaron la formación de brotes adventicios a los 40 días después de la siembra, esto concuerda con Cervantes, (1996), originándose de toda la superficie donde había callo. Para el cv. Blue Butterfly, la formación de brotes adventicios se presentó a los 60 días después de la siembra, a diferencia de lo reportado por (Cervantes, 1996) mencionando que a los 70 días se observó la formación de brotes. Esto sugiere que existen diferencias entre cultivares para la respuesta en la brotación y permite vislumbrar cierto patrón de respuesta para color de flores liguladas de aster.

En cuanto a la inducción de la rizogénesis se observó que al pasar los brotes de aster a un medio de cultivo MS con 0.5 mg L^{-1} de AIB, estos desarrollaron los primordios de raíces de aproximadamente 1.5 cm de longitud a los 15 días de trasplantados a este medio. Para el día 20, un 30% ya contaba con tres raíces en promedio de 2 cm de longitud y las plántulas con unos 5 cm de altura. Alrededor de los 35 días, un 95% de las plántulas que habían sido trasplantadas al medio de enraizamiento tenían en promedio 10 raíces y una altura de 6-8 cm.

Motooka *et al.* (1992) compararon el crecimiento de plántulas de un tipo de aster *Gymnaster savatieri* de 3, 6, 9 y 12 semanas, en un medio MS con diferentes proporciones de macronutrientes (100, 50, 25 y 12%) con cuatro sustratos (lana de roca, vermiculita, mezclas de perlita-vermiculita y perlita-vermiculita-peat moss obtuvieron un mejor crecimiento de las plantas al usar perlita-vermiculita que en el

medio MS, así mismo la mejor proporción del medio MS fue con el 100% de macronutrientes a las tres semanas de edad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Texcoco, Estado de México. En las instalaciones del laboratorio de Biotecnología (sección cultivo de tejidos) área de Agronomía, también se trabajó en el laboratorio de Embriogénesis perteneciente al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

3.2 Material biológico

Las plantas de *Begonia elatior*, fueron compradas en el mercado Madre Selva delegación Xochimilco, para la propagación se emplearon los pétalos de cuatro cultivares (Clara, Heidi, Gloriosa, Tacora Geel) tomados del segundo y tercer piso de la flor.



Figura1. Cultivares de *Begonia elatior*.

3.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para esta investigación fue el medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Se suplementó con glicina 0.2 mg L^{-1} , ácido nicotínico 0.5 mg L^{-1} , mio-inositol 100 mg L^{-1} , piridoxina 0.5 mg L^{-1} , tiamina 0.4 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} de sacarosa y fue solidificado con 8.0 g L^{-1} de agar (Sigma Aldrich). Los reguladores de crecimiento empleados fueron ácido naftalen acético (ANA) y bencil amino purina (BA) (Sigma Aldrich) en las concentraciones siguientes: 1) 0 mg L^{-1} (ANA) + 0 mg L^{-1} (BA), 2) 1.0 mg L^{-1} (ANA) + 1.0 mg L^{-1} (BA), 3) 0.5 mg L^{-1} (ANA) + 2.0 mg L^{-1} (BA), 4) 1.0 mg L^{-1} (ANA) + 2.0 mg L^{-1} (BA) y 5) 0.5 mg L^{-1} (ANA) + 3.0 mg L^{-1} (BA) (Cuadro 2).

El pH se ajustó entre 5.7 – 5.8 con 1N de NaOH o 1N de HCl. El medio de cultivo se sirvió en frasco tipo gerber (20 ml/ frasco) se taparon con tapas de plástico y se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1 kg.cm^2 por 15 minutos.

3.4 Desinfección del material vegetal

Los pétalos se lavaron separando los cultivares, fueron desprendidos de la corola y colocados dentro de un vaso de precipitado al cual se le agregó un poco de detergente (Roma), se tapó con una gasa y se sujeto con una liga, posteriormente se colocó bajo el chorro de agua corriente de la llave durante 15 minutos; transcurrido el tiempo se enjuagaron perfectamente para quitar el exceso de jabón, se agregó alcohol al 70% y se sumergieron durante 10 segundos dando un ligero agitación, se desecho el alcohol y los pétalos se enjuagaron con agua bidestilada, el siguiente paso fue llevar el vaso de precipitado con los pétalos a la cámara de flujo laminar en donde se agregó hipoclorito de calcio al 4% mas dos gotas de tween 20, se agitó manualmente durante 15 minutos y se enjuagaron tres veces con agua bidestilada, en el último enjuague los pétalos se conservaron con un poco de agua para evitar la deshidratación al ser sembrados (Figura 2).

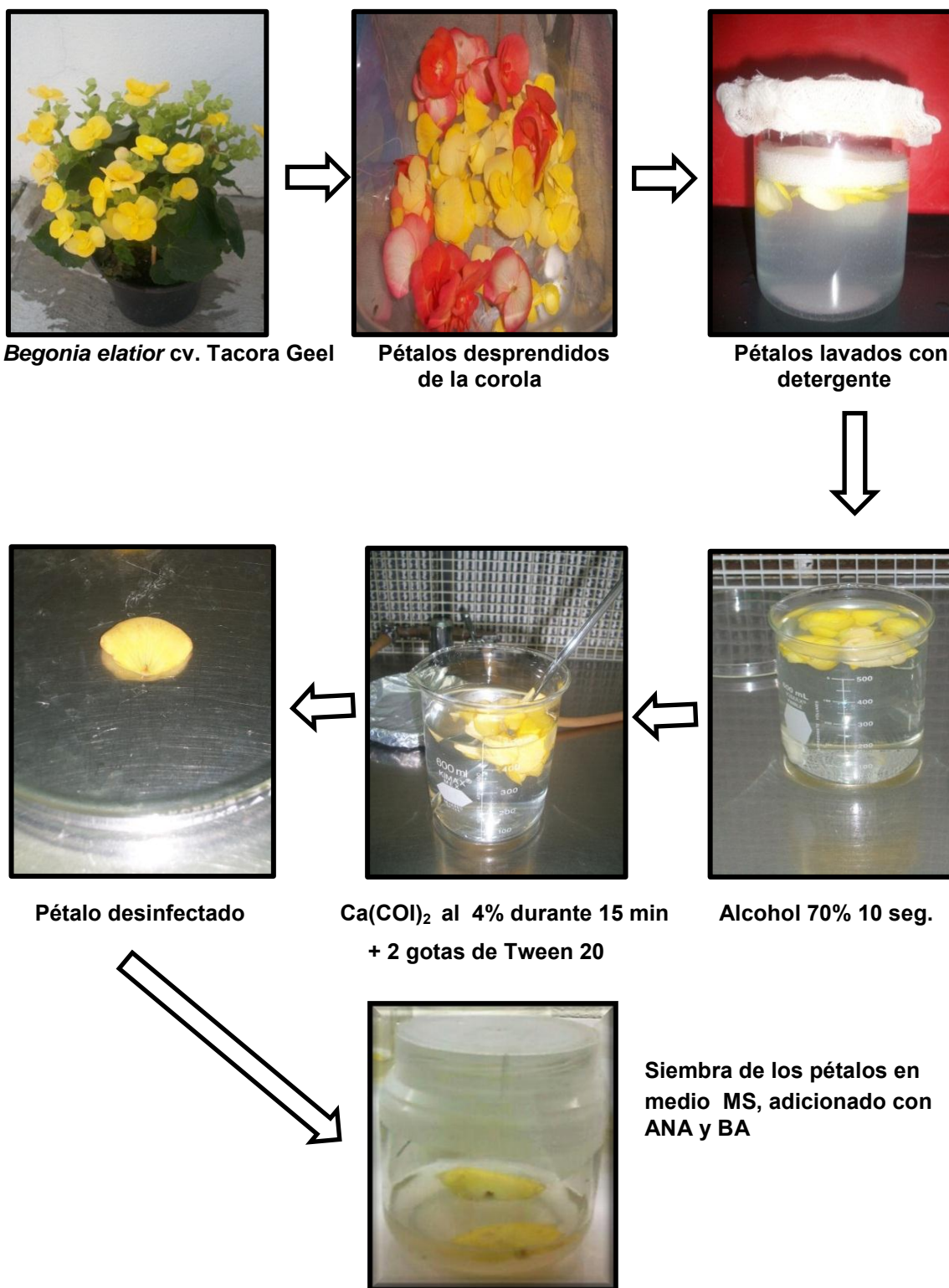


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso para desinfección de pétalos de *Begonia elatior*.

3.5 Siembra de pétalos

Los pétalos se tomaron cuidadosamente para evitar el maltrato del tejido con la ayuda de una pinza esterilizada, se sembraron dos pétalos del mismo cultivar con el haz sobre el medio de cultivo.

3.6 Condiciones de incubación

Las condiciones generales de incubación fueron de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad; una intensidad luminosa aproximada de $30 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una temperatura promedio de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, durante todo el experimento.

3.7 Obtención de plántulas

Los brotes en los pétalos de *Begonia elatior* inducidos en el medio de establecimiento, fueron transferidos a medio fresco con los respectivos tratamientos de ácido naftalen acético (ANA) y bencil amino purina (BA).

3.7.1 Inducción de la raíz

Las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio sin reguladores del crecimiento.

3.8 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un factorial 4^5 donde los factores a evaluar fueron: cultivares de *Begonia elatior* y concentración de reguladores de crecimiento ANA y BA (Cuadro 2), generándose 20 tratamientos con 10 repeticiones, dando como resultado 200 unidades experimentales, como testigo se tuvo el tratamiento 1 (0 mg L^{-1} de ANA + 0 mg L^{-1} de BA). Se sembraron 2 pétalos del mismo cultivar por frasco. Los análisis estadísticos para la variable número de brotes se llevo a cabo con el programa Info Stat versión 2008.

3.8.1 Combinación de los tratamientos

Cuadro 2. Tratamientos obtenidos con la combinación de cuatro cultivares de *Begonia elatior* (Clara, Heidi, Gloriosa y Tacora Geel) y las concentraciones de ácido naftalen acético (ANA) y bencil amino purina (BA).

Letras y números c1,h2,g3,t4 corresponden a las iniciales del nombre de los cultivares de *Begonia elatior*. Los números 1,2,3,4,5 corresponden a las concentraciones de ANA y BA.

Cultivares de <i>Begonia elatior</i>	<u>Concentraciones ANA Y BA mg L⁻¹</u>				
	1	2	3	4	5
c1	Ac1B1	Ac1B2	Ac1B3	Ac1B4	Ac1B5
h2	Ah2B1	Ah2B2	Ah2B3	Ah2B4	Ah2B5
g3	Ag3B1	Ag3B2	Ag3B3	Ag3B4	Ag3B5
t4	At4B1	At4B2	At4B3	At4B4	At4B5

3.9 Variables evaluadas fueron las siguientes:

- a) Porcentaje de callo formado.
- b) Días para la formación de brotes.
- c) Número de pétalos formadores de organogénesis. .
- d) Número de brotes promedio por pétalo.
- e) Días para formación de raíces.

Todas las evaluaciones se realizaron cada 15 días.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Porcentaje de callo formado en pétalos de *Begonia elatior*

La Figura 3 muestra los cinco tratamientos, en los cuales no existió inducción de callo en los cultivares Clara y Tacora Geel. Sin embargo, en el cv. Heidi el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ de ANA+ 1.0 mg L⁻¹ de BA) (Figura 3) alcanzó un porcentaje del 57% de callo originado en la zona basal del pétalo en un lapso de 120 días a partir de la siembra, además en el tratamiento 4 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 2.0 mg L⁻¹ BA), se tuvo a los 120 días un porcentaje del 22% de callo producido también en la zona basal del pétalo. Por otra parte el cv. Gloriosa con el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ de ANA+ 1.0 mg L⁻¹ de BA) registró un porcentaje de 46% de callo iniciándose también en la zona basal del pétalo.

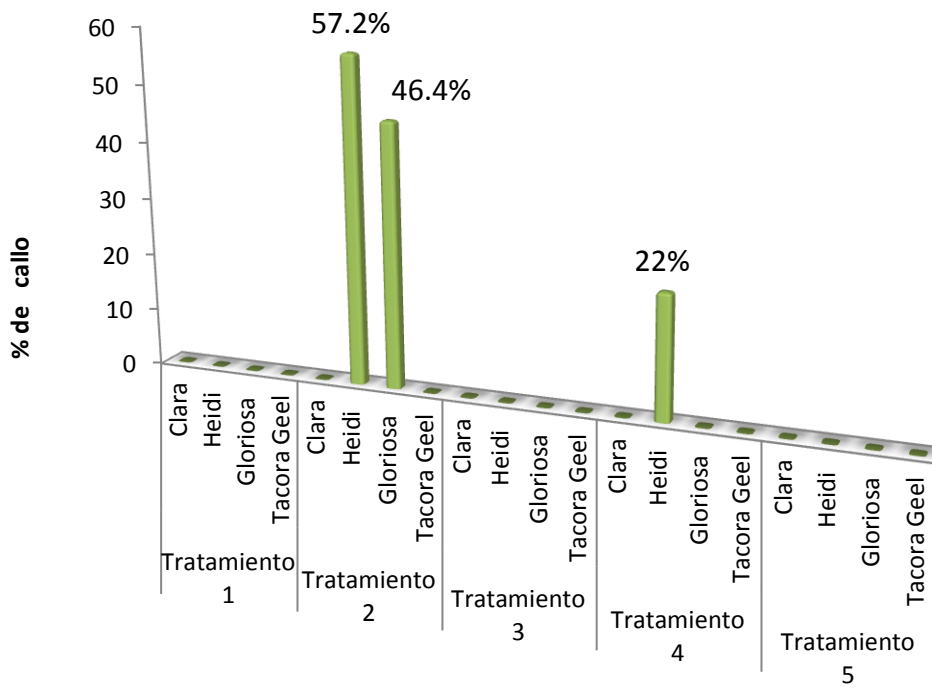


Figura 3. Callo formado a partir de pétalos de *Begonia elatior* en cuatro cultivares, con influencia de dosis diferentes de ANA y BA, tratamiento 1) 0 mg L⁻¹ (ANA) + 0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 2) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 1.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 3) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 4) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 5) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 3.0 mg L⁻¹ (BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

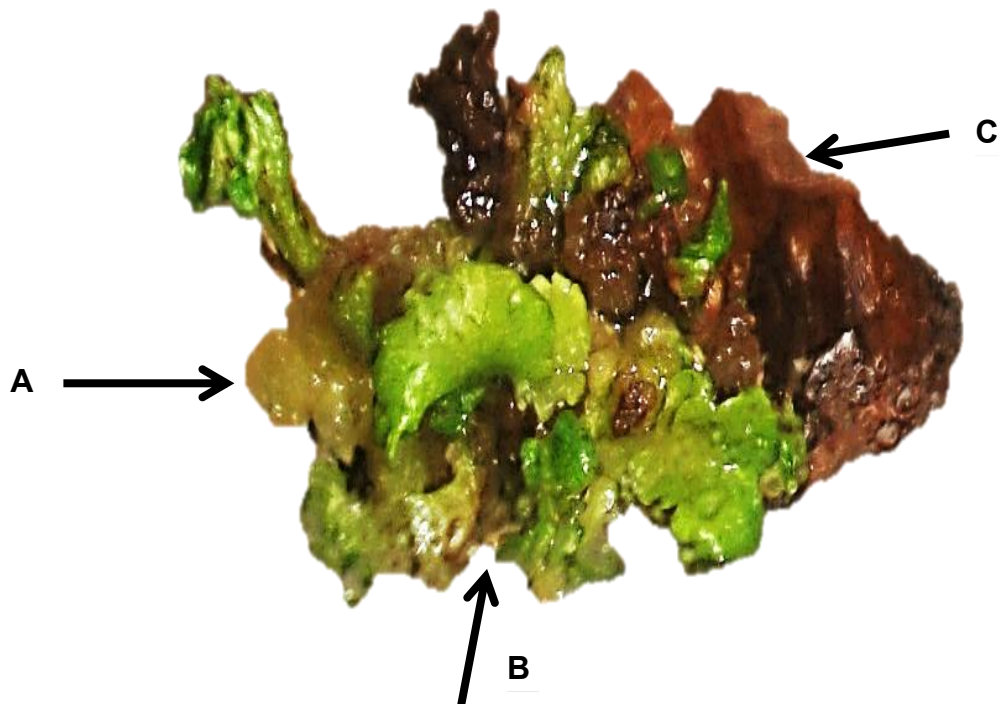


Figura 4. Callo formado en la zona basal del pétalo de *Begonia elatior* cv. Heidi, con influencia del tratamiento 2) 1.0 mg L^{-1} (ANA) + 1.0 mg L^{-1} (BA), cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

Letra A formación de callo iniciándose en zona basal, letra B formación de callo, letra C zona apical del pétalo.

En estudios llevados a cabo en *Rosa sp.* (Castilla, 2005) reportó el desarrollo de callos a partir de explantes de pétalo en siete cultivares (Contempo, America's Junior Miss, Manasi, Mrinalini, Preyasi, Sylvia y Queen Elizabeth), con diferentes medios, contando con los más satisfactorios para la formación de callos el MS sin embargo, no se observó embriogénesis somática ni organogénesis en ninguno de los medios., estos resultados tienen similitud a los que obtuvimos en cuanto a formación de callo, en pétalos de *Begonia elatior* en los cultivares Heidi y Gloriosa, utilizando la misma concentración 1 mg L^{-1} de ANA y 1 mg L^{-1} de BA, al igual que (Castilla, 2005). En los cultivares Clara y Tacora Geel hubo formación de callo, esto puede deberse a los factores de genotipo de la planta que influyeron en la inducción y proliferación de callos, (Kuusiene, 2001) demostró en seis cultivares de *R. floribunda* tres tipos de

explantes que fueron cultivados en medio MS con BA, ANA y 2,4-D para la obtención de callos, alcanzándose la mayor frecuencia de inducción, en el cv. Dacapo, usando las bases de las yemas como explantes, aunque el mejor crecimiento de los callos fue observado en Lili Marlene, al emplear pétalos. Además, (Pierik, 1997) citó que las auxinas causan generalmente elongación celular, hinchazón de los tejidos y la formación de callo.

4.2 Días para formación de brotes

En el Cuadro 3, se muestran los días del comienzo de formación de brotes, en los cultivares Clara y Tacora Geel, no existió respuesta de organogénesis en ninguno de los tratamientos utilizados.

En el cv. Heidi los indicios de organogénesis dieron comienzo a los 65 días en el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA+ 1.0 mg L⁻¹ BA) mientras que en el tratamiento 4 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 2.0 mg L⁻¹ BA) se observó a los 105 días después de la siembra.

El cv. Gloriosa mostró indicios de brotes a los 60 días, con el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA+ 1.0 mg L⁻¹ BA).

Cuadro 3. Días para formación de brotes en los cultivares de *Begonia elatior*, bajo el efecto de los tratamientos combinados con ANA y BA.

Cultivares de <i>Begonia elatior</i>	Días para la formación de brotes	Tratamientos
Clara	0 días	En ningún tratamiento
Heidi	65 días	2 (1.0 mg L ⁻¹ ANA+ 1.0 mg L ⁻¹ BA)
Heidi	105 días	4 (1.0 mg L ⁻¹ ANA + 2.0 mg L ⁻¹ BA)
Gloriosa	60 días	2 (1.0 mg L ⁻¹ ANA+ 1.0 mg L ⁻¹ BA)
Tacora Geel	0 días	En ningún tratamiento

Estos resultados pueden atribuirse a la distinta capacidad de regeneración que tienen todas las plantas, porque ninguna responde de igual manera, aún cuando en cultivo *in vitro* se esté evaluando la misma especie.



Figura 5. Formación de primordios en la zona basal de pétalos de *Begonia elatior* cv. Heidi, con influencia del tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA+ 1.0 mg L^{-1} BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

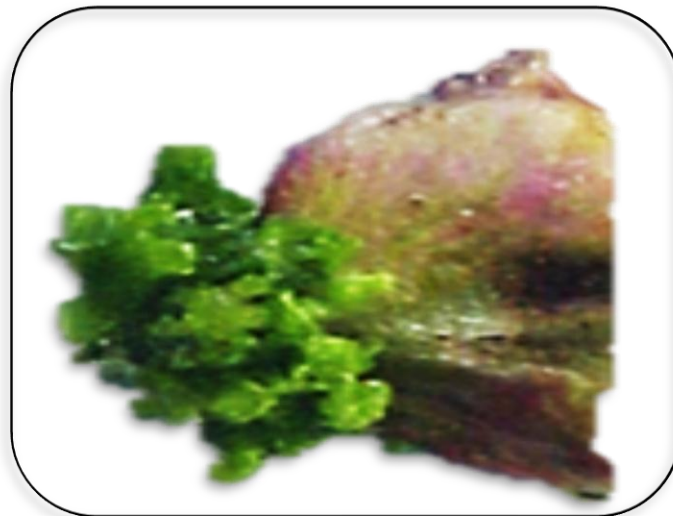


Figura 6. Formación de brotes en la zona basal de pétalos de *Begonia elatior* cv. Heidi, a los 90 días después de la siembra con influencia del tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA+ 1.0 mg L^{-1} BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).



Figura 7. Formación de brotes con tallos independientes en la zona basal de pétalos de *Begonia elatior* cv. Heidi, a los 120 días después de la siembra con influencia del tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA+ 1.0 mg L^{-1} BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

4.3 Número de pétalos formadores de organogénesis

La Figura 8, muestra las cultivares formadoras de organogénesis en pétalo de *Begonia elatior*, notándose claramente que en los cultivares Clara y Tacora Geel, no se observó ningún tipo de respuesta organogénica. En contraste, en el cv. Heidi, tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ de ANA+ 1.0 mg L⁻¹ de BA) 20 pétalos mostraron respuesta, además el mismo cultivar en el tratamiento 4 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 2.0 mg L⁻¹ BA) mostró 12 pétalos con indicios de organogénesis. También en el cv. Gloriosa 16 pétalos en el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ de ANA+ 1.0 mg L⁻¹ de BA) mostraron respuesta organogénica.

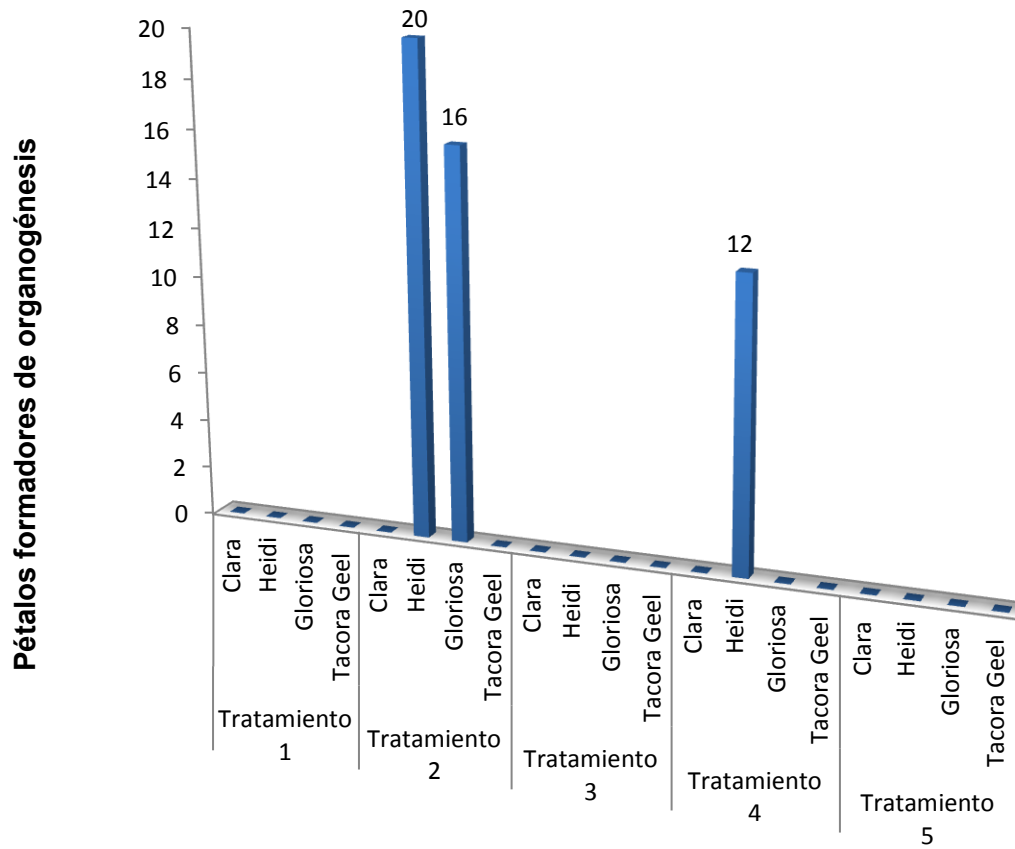


Figura 8. Pétalos de cultivares de *Begonia elatior* con respuesta de organogénesis, con influencia de dosis diferentes de ANA y BA, tratamiento 1) 0 mg L⁻¹ (ANA) + 0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 2) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 1.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 3) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 4) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 5) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 3.0 mg L⁻¹ (BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

Cervantes (1996) reportó la regeneración *in vitro* en pétalos de clavel observándose organogénesis. Se usaron como base las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de ANA, 1.0 mg L⁻¹ de BA y se adicionaron 50 - 100 mg L⁻¹ de kanamicina.

Por otra parte los autores (Frey y Janick, 1991) establecieron en clavel, que el genotipo, la fuente de inoculo y el balance hormonal de la planta madre influyen en una respuesta de organogénesis, que puede obtenerse independientemente del tipo de técnicas empleadas; por los resultados obtenidos en los cultivares Clara y Tacora Geel que no respondieron a ninguno de los tratamientos evaluados, estamos de acuerdo con lo establecido por (Frey y Janick, 1991) y que es aplicado a otras especies de flores en este caso a *Begonia elatior*.

4.4 Número de brotes en pétalos de *Begonia elatior*

En la Figura 9, se puede observar que durante el tiempo de experimentación, los cuatro cultivares de *Begonia elatior* en los diferentes tratamientos, si tuvieron influencia en la respuesta para el número de brotes, siendo únicamente en el cv. Heidi y Gloriosa en las que se obtuvieron resultados favorables; sin embargo, en los cultivares Clara y Tacora Geel, no ocurrió ningún tipo de respuesta en ninguno de los tratamientos.

Los análisis estadísticos realizados no mostraron diferencia significativa, entre el cv. Heidi la cual tuvo un promedio de 3 brotes, y el cv. Gloriosa con un promedio de 2 brotes (Cuadro 4). Por otra parte el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA) fue adecuado para obtener un promedio de 11 brotes por explante.

También se puede observar que el cv. Heidi en los tratamientos 1,3 y 5 no presentaron brotes; sin embargo, con el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA) originó un promedio de 13.20 brotes, mientras que el tratamiento 4 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 2.0 mg L⁻¹ BA) generó 1.63 brotes; por lo tanto existe una diferencia significativa en utilizar el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA) y el tratamiento 4 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 2.0 mg L⁻¹ BA) (Cuadro 4).

Por otra parte el cv. Gloriosa en los tratamientos 1, 3, 4 y 5 no generaron resultados, a diferencia el tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA) promovió un promedio de 8.40 brotes.

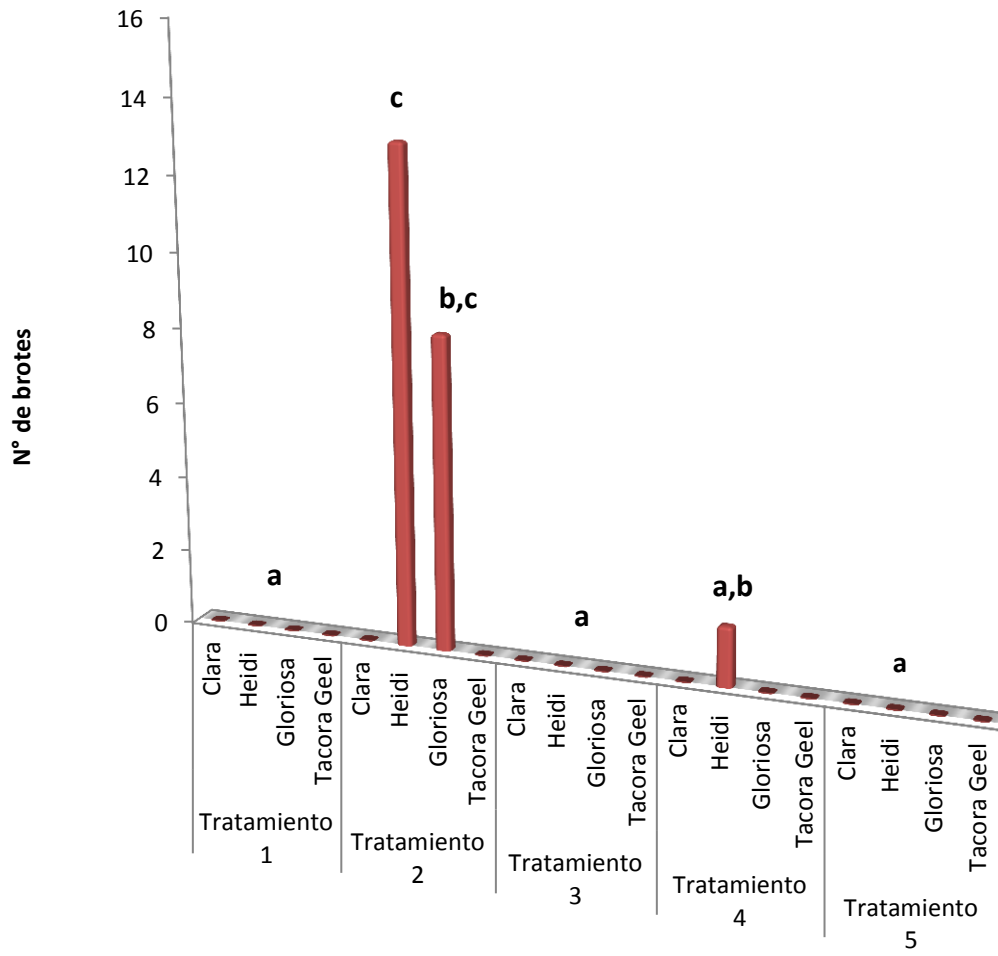


Figura 9. Pétalos de *Begonia elatior* de cuatro cultivares formadores de organogénesis, con influencia de dosis diferentes de ANA y BA, tratamiento 1) 0 mg L⁻¹ (ANA) + 0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 2) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 1.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 3) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 4) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 5) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 3.0 mg L⁻¹ (BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

En *Begonia elatior* cv. Orange Toran, utilizando como explante el pedicelo (Mendi *et al.*, 2009) obtuvieron regeneración de plántulas con las concentraciones de ANA y BA siguientes: 1.0 mg L⁻¹ ANA + BA 2.0 mg L⁻¹ (70%) 0.5 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA (50%) y finalmente la concentración 1.0 mg L⁻¹ BA + 1.0 mg L⁻¹ ANA (20%). Existe una semejanza con los autores antes mencionados en cuanto a la regeneración de plántulas, sin embargo, en nuestro caso utilizando como explante el pétalo de *Begonia elatior*, cultivares Heidi y Gloriosa, obtuvimos brotes en las concentraciones 1.0 mg L⁻¹ ANA + 2.0 mg L⁻¹ BA y 1 mg L⁻¹ BA + 1mg L⁻¹ ANA, en la cuales ellos también obtuvieron resultados. Además mencionan que la concentración de citocinina combinada con auxina es más eficaz, que si se utilizará únicamente la citocinina para la regeneración de *Begonia elatior*. La razón para la baja regeneración del medio que contiene 1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA - podría ser el efecto antagonista de la auxina alta (ANA) en la citocinina (BA) (Mendi *et al.*, 2009).

El tipo de patrón de crecimiento o regeneración *in vitro* que se presenta depende del potencial genético de la planta (Hartman y Kester, 1995). Así como del ambiente químico y físico a que está sometido el explante de la planta original. De manera potencial, con esas técnicas es posible reproducir plantas de todas las especies siempre y cuando se conozca lo suficiente en cuanto a sus requerimientos nutritivos, hormonales y de cultivo.

En los cultivares Clara y Tacora Geel, no se obtuvieron resultados, probablemente por las concentraciones hormonales (Hutchinson *et al.*, 1992) menciona que los diferentes niveles hormonales endógenos presentes en las plantas, pueden influir conforme a la aplicación exógena de hormonas.

Cuadro 4. Número de brotes en pétalos de *Begonia elatior* en los cultivares Heidi y Gloriosa promovidos en 5 tratamientos con ANA y BA 1) 0 mg L⁻¹ (ANA) + 0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 2) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 1.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 3) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 4) 1.0 mg L⁻¹ (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ (BA), tratamiento 5) 0.5 mg L⁻¹ (ANA) + 3.0 mg L⁻¹ (BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). Letras diferentes indican diferencias significativas Tukey (p<0.05).

Cultivares	Tratamientos	Medias	n	E.E.	
Gloriosa	1	0	10	1.48	a
Gloriosa	4	0	10	1.48	a
Gloriosa	5	0	10	1.48	a
Gloriosa	3	0	10	1.48	a
Heidi	1	0	10	1.48	a
Heidi	3	0	10	1.48	a
Heidi	5	0	10	1.48	a
Heidi	4	1.63	8	1.65	a b
Gloriosa	2	8.4	10	1.48	b c
Heidi	2	13.2	10	1.48	c

Por otro lado, el cv. Gloriosa en el tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA + 1.0 mg L^{-1} BA) además de la totipotencia que mostraron los pétalos para formar brotes se observó formación de yemas florales (Figura 10) cabe destacar que no todos los pétalos mostraron este resultado.



Figura 10. Pétalo de *Begonia elatior* cv. Gloriosa. Letra A indica la yema floral formada con efecto del tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA + 1.0 mg L^{-1} BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

Esta formación de yema floral, puede deberse a las diferencias genéticas de los cultivares y quizá influyó la sacarosa para la formación de yemas florales.

Asmah *et al.*, (2013) en *Begonia x hiemalis* cv. 'Schwabenland Red' obtuvieron yemas florales con el medio MS adicionado con la concentración 1.0 mg L^{-1} ANA + 1.0 mg L^{-1} BA adicionado con 40 mg L^{-1} de adenina y 3 % de sacarosa.

Kachonpadungkitti *et al.*, (2001) concluyen que la sacarosa tiene efecto sobre la inducción de brotes florales en *Fortunella hindsii* y *Fagopyrum esculentum* respectivamente. Zhang *et al.*, (2008) concluye que en, *Perilla frutescens*, la presencia de sacarosa, a partir de cultivos de inflorescencia, induce la formación de yemas florales. Nguyen *et al.*, (2006) en Rosa híbrida cv. First Price indujeron la

organogénesis de yemas florales y determinaron que el proceso se debe a la relación sacarosa y citocininas.

4.5 Formación de raíces

En lo que respecta a la formación de raíces, en las figura 11 se pueden apreciar claramente la presencia de raíces adventicias en el callo de aproximadamente 2.0 cm de longitud, en la mayoría de los pétalos sembrados de *Begonia elatior* cv. Gloriosa con la influencia del tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA) la figura 12 corresponde al cv. Heidi tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA) el cual promovió raíces en los brotes.



Figura 11. Formación de raíces adventicias en el cv. Gloriosa tratamiento 2 (1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).



Figura 12. Formación de raíces en el cv. Heidi con influencia de tratamiento 2 (1.0 mg L^{-1} ANA + 1.0 mg L^{-1} BA) cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

Las auxinas intervienen en diversos procesos como la elongación del tallo, la dominancia apical y la iniciación radical (Taiz y Zeiger, 2006).

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y en las condiciones experimentales en las que se desarrolló, se llegó a las conclusiones siguientes:

- El pétalo de *Begonia elatior*, tiene la totipotencia para generar plantúlas bajo condiciones *in vitro*.
- La formación de callo en pétalos de *Begonia elatior*, se generó en la zona basal.
- La organogénesis se llevó a cabo de forma indirecta.

- Es más factible utilizar pétalos del cv. Heidi en medio MS adicionado con 1.0 mg L^{-1} ANA + 1.0 mg L^{-1} BA para promover brotes mediante organogénesis indirecta.
- La concentración 1.0 mg L^{-1} ANA + 2.0 mg L^{-1} BA, promovió menor cantidad de brotes en el cv. Heidi.
- Los cultivares que mostraron organogénesis fueron el cv. Heidi y Gloriosa en la concentración 1.0 mg L^{-1} ANA + 1.0 mg L^{-1} BA.
- Se observaron respuestas diferentes a los tratamientos entre los cultivares Clara, Gloriosa, Heidi y Tacora Geel.

VI. LITERATURA CITADA

Awal, A., Ali A, A.B., Mat, R, T., Syafawati, Y, J and Mohajer, S. 2013. Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on in vitro flowering in *Begonia x hiemalis* Fotsch. AJCS 7(5): 691- 698.

Adams, R. 1987. *Begonia tubercus*. Culture notes. Grower Talks on Crop Cultures Geo J. Ball Publishing, U.S.A.

Berg, B. 1997. Tips and propagation begonias. The Begonian. The Oficial Magazine of The American *Begonia* Society July/August.

Bouman, H., Klerk, D, G.J. 2001. Measurement of The Extent of Somaclonal Variation in *Begonia* Plants Regenerated under Various Conditions. Comparison of Three Assays, Theor. Appl. Genet. 102(1): 111-117.

Bowes, B.G., Curtis, E.W. 1991. Conservation of The British National *Begonia* Collection by Micropropagation. New Phytologist 119(1):169-181.

Brickell, C. 1992. Enciclopedia de plantas y flores Ed. Grijalbo, México.

Burritt, D.J., Leung, D, W.M. 2003. Adventitious Shoot Regeneration From *Begonia x Erythrophylla* Petiole Sections is Developmentally Sensitive to Light Quality. Physiologia Plantarum 118(2): 289-296.

Bush, S. R., Earle E. D and Langhands, R. W. 1976. Plantas from petal segments, petal epidermis and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. Am. J: Bot. 63: 729-737

Calva, C. G., Rios, L. E. 1999. Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.

Carpita, N., Mccann, M. 2000. The cell wall. En: Buchanan, B., Grulisse, W., Jones, R. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.

Casilla, Y. 2005. Cultivo de tejidos de rosas (*rosa sp.*) un acercamiento a investigaciones recientes. Cultivos Tropicales 26 (4) pp. 43-47.

Cervantes, C. F. 1996. Regeneración *in vitro* de yemas adventicias a partir de estructuras florales de aster, crisantemo y clavel. Tesis de Licenciatura. Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp.75.

Claridades Agropecuarias. 2006. La Floricultura Mexicana, el Gigante que está Despertando. Consultado el 05 Febrero 2015. <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/154/ca154.pdf>

Cloudy, V, N. 1997. Introduction to Begonia. Consultado el 15 de abril 2015. <http://www.dnc.net/users/goetz/public.html>.

Cloudy, V, N. 1997. The Different types of Begonias. Consultado el 15 de abril 2015. <http://www.dnc.net/users/goetz/public.html>.

Doorenbos, J. 1973. Breedin *elatior* begonias (*B. x Hiemalis* Fotsch). Acta Hortic. 31:127-131.

Dunstan, D. I and Short, K. C. 1979. Shoot production from the flower head of *Allium cepa* L. Scientia Horticulture, 10:345-356.

Espino, F.J., Linacero, R., Rueda, J., Vazquez, A.M. 2004. Shoot Regeneration in Four *Begonia* Genotypes, Biol. Plant 48(1): 101-104.

Ferl, R., Paul, A. L. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan, B., Grulisse, W., Jones, R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.

Fowler, M. W. 1987. Products from plant cells. En: Bu'lock J., Kristiansen, B. (Eds.) Basic Biotechnology. Academic Press, M., London, England. pp. 525-544.

Frey, L., Janic, K. J. 1991. Organogenesis in carnation. Journal of the American Society for Horticultural Sciences 116: 1108–1112.

FUNPROVER. Fundación Produce Veracruz. 2008. Programa Estratégico de Necesidades de investigación y Transferencia de Tecnología de la Cadena Productiva Horticultura Ornamental en el Estado de Veracruz. Consultada el 22 de enero 2015. <http://www.funprover.org/formatos/PLANES%20ESTRATEGICOS/Cadena%20horticultura%20ornamental.pdf>.

García, M. C. 1999. Organogénesis *in vitro* de flores liguladas de dos cultivares de aster *Aster ericoides* L. 'Monte Cassino' y 'Blue Butterfly'. Tesis de Licenciatura. Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp 85.

Gimelli, F., Ginatta, G., Venturo, R. S and Buiatti, M. 1984. Plantlet regeneration from proto plast isolated from flower petals of ornamental *Nicotiana* species. Plant Physiology 109: 379-384.

Gispert, C. 1989. Historia Natural. Botánica. Instituto Gallach, España.

Hartmann, H. T y Kester, D. E. 1995. Propagación de plantas, principios y prácticas. Cuarta reimpresión. Ed. CECOSA. México, D.F. pp.760

Hutchinson, J. F., Kaul V., Maheswaran, G., Moran, J. R., Graham, M. W and Richards D. 1992. Genetic improvement of floricultural crops using biotechnenology. Aust. J. Bot., 40;765-787.

Kabirnataj, S., Ghasemi, Y., Nematzadeh, G., Asgharzadeh, R., Shahin, K. B., Yazdani, M. 2012. Effect of explant type and growth regulators on *in vitro* micropropagation of *Begonia rex*. International Research Journal of Applied and Basic Sciences. 3 (4): 896-901.

Khalid, N. M., Davey, R and Power J. B. 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potential commercial value. *Scientia Horticulture*, 38: 287-294.

Kishimoto, S., Aida, R., Shibata, M. 2002. Agrobacterium tumefaciens mediated Transformation of Elatior Begonia (*Begonia x Hiemalis* Fotsch). *Plant Sci.* 162(5): 697-703.

Kuusiene, S. 2001. The influence of genotype and explant for callus induction and proliferation of *Rosa floribunda*. En: Proceedings of the International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding (4:200 jul. 2-7:Tampere). *Acta Horticulturae*, , no. 560, pp. 501-504.

Larson, R. A. 2004. Introducción a la Floricultura. En: Larson (Ed.), *Begonias* (pp. 359-369). México, D.F. A.G.T. Editor, S.A.

Martín, T. 1991. Heavenly Begonias Horticulture. *The Magazine of American Gardening*. February: 22-24

Mendi, Y. Y., Curuk, P., Kocaman, E., Unek, C., Eldogan, S., Gencel, G., Cetine, r S. 2009. Regeneration of begonia plantlets by direct organogenesis. *African Journal of Biotechnology*. 8(9):1860-1863.

Mikkelsens, J. 1973. Simplified growing instructions for Rieger elatior begonias. *Pa. Flower Growers' Bull.* 263: 3-5.

Miller, R. M., Kaul, V., Hutchison, J. F., Maheswaran, G and Richards, D. 1991. Shoot regeneration from fragmented flower buds of carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Annals of Botany*, 68: 563-568.

Miyazaki, S., Tashiro, Y. 1978. Tissue culture of *Chrysanthemum morifolium*. IV. Explant sources for stem segment culture. *Agr. Bull. Saga. Univ.* 44: 67-78.

- Molgaard, J. P., Roulund, N., V. Deichmann, L., Andersen, S.B and Farestveit, B. 1991. *In vitro* multiplication of *Saintpaulia ionantha* Wendl. by homogeneization of tissue cultures. *Scientia Horticulture*, 48:285-292.
- Nakano, M, N., Kobayashi, Y, D., Watanabe, A. 1999. Adventitious Shoot Regeneration and Micropropagation of Hybrid Tuberous Begonia (*Begonia x Tuberhybrida* Voss), *Sci. Hortic.* 79(3-4): 245-251.
- Nhut, D. T., Hai, N. T., Huyen, P. X., Huong, D. T.Q., Hang, N. T.T., Siksa, D. J. 2005. Thidiazuron Induces High Frecuency Shoot Bud Formation from Begonia Petiole Transverse Thin Cell Layer Culture. *Propagation of Ornamental Plants*, 5 (3): 151-157.
- Nau, J. 1990. Fibrous begonias.Culture notes. *Grower Talks on Crop Cultur.* Geo J. Ball Publishing, U.S.A.
- Nakano, M., Hoshino, Y and Mii, M. 1994. Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:15-19.
- Nugent, G. T., Wardley, R and Lu, C. Y. 1991. Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports* 10: 477-480.
- Nguyen, H. V., Phan, H. A., Duong, T. N. 2006. The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. "First Prize" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 87 (3) pp 315-320.
- Motooka, S., Konishi, K., Konishi, M., Sawa, K., Satake, M and Konishi, K. 1992. Tissue culture of *Gymnaster savatieri* K. using planting cell tray with solid supporting materials. *Journal of the Japanese Societyfor Horticultural Sciencie* 60: 971-979.
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15: 473- 497.
- Pierik, R. L.M. 1994. *Cultivo in vitro* de plantas superiores; Ed. Mundi - Prensa. Tercera edición. Madrid, España. pp. 120.
- Pierik, R. L.M. 1997. *In vitro* culture of Higher Plants. (First edition) Springer.

Post, K. 1950. Florist Crop Production and Marketing. Orange Judd Publ., New York.

Ringe, F and Nitsch, J. P. 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured *in vitro*. Plant and Cell Physiology, 9: 639-652.

Rout, G. R., Mohapatra, A and Mohan, J. S. 2006. A Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances 24: 531–560.

Robinson, K. E.P. and Firoozabady, E. 1993. Transformation of floriculture crops. Scientia Horticulture, 55: 83-99.

SAGARPA. Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. 2012. Consultada el 15 de Mayo 2015. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2012B098/asp.Num.098/12>.

Sandved, G. 1969. Flowering in *Begonia x Hiemalis* Fotsch as affected by daylength and temperature. Acta Hortic. 14:61-63.

Shimada, Y., Mori, G., Katahara, Y., Oda, M. 2006. Formation of Adventitious Buds on Leaf Pieces Cutting of *Begonia Tuberhybrida* Group. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 75(4): 318-322.

Shimada, Y., Mori, G., Oda, M., Ishida, G. 2007. Effects of BA and Leaf Piece Orientation on Adventitious Bud Formation in Leaf Cutting of *Begonia Tuberhybrida* Group. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 76(2): 157-162.

Simmonds, J., Werry, T. 1987. Liquid shake cultures for improved micropropagation of *Begonia x hiemalis*. Hortic Sci. 22:122–124.

Street, H. E. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. En: Street, H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology. Third Edition, Sinauer Associate, Inc. United States of America. pp. 690.

Takayama, S., Misawa, M. 1982. Factors affecting differentiation and growth in vitro and a mass-propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. Sci. Hortic. 16: 65-75.

Tiez, H. 1991. Tuberous Non – Stop Begonias. Ball Red Book. Geo J. Ball Inc., U.S.A.

Watson, L. and Dallwitz, M. J. 1997. The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, Identification and Information Retrieval. Versión: 16th. U.S.A.

White, J. W. 1973. Rieger *elatior* begonias: history and European research. Pa. Flower Growers' Bull. 263, 1-2,5.

Zhang, Y. W., Yang, C. F., Gituru, W. R., Guo, Y. H. 2008. Within-season adjustment of sex expression in females and hermaphrodites of the clonal gynodioecious herb *Glechoma longituba* (Lamiaceae). Ecol Res. 23:873-881.

Zuñiga, C. E.C y Alarcon, H. L.C. 2010. Curso Taller de Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Veracruzana. pp.47.