

**Nuevos variantes somaclonales en**  
*Ficus lyrata, Ficus elastica, Ficus benjamina,*  
*Spathiphyllum y Syngonium*

Memoria presentada por Antonio García-Pitarch realizada en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por el Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Valencia, a 21 de julio de 1999

Antonio García-Pitarch

D. VICENTE MORENO FERRERO, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Genética y Mejora, del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia

**EXPONE:**

Que la presente Tesis Doctoral “Nuevos variantes somaclonales en *Ficus lyrata*, *Ficus elastica*, *Ficus benjamina*, *Spathiphyllum* y *Syngonium*” realizada por Antonio García-Pitarch para optar al grado de Doctor, se ha llevado a cabo bajo su dirección en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia, y por la presente

**AUTORIZA:**

La presentación de la memoria adjunta a los efectos académicos oportunos.

Valencia, a 21 de julio de 1999

Dr. D. Vicente Moreno Ferrero

*A Xelo i als meus pares*

Los trabajos experimentales correspondientes a los nuevos variantes “Mallorca” de *Ficus benjamina* e “Ivonne” de *Ficus lyrata* se realizaron (en el marco de un proyecto concertado de investigación) en el laboratorio de cultivo *in vitro* de la empresa Viveros Paco Molina y en los invernaderos e instalaciones que la propia empresa posee en Castellón, y en colaboración con el Grupo de Cultivos Celulares del Departamento de Biotecnología de la E.T.S.I.A. de la Universidad Politécnica de Valencia. Este proyecto fue subvencionado por el IMPIVA y por la Dirección General de Electrónica y Nuevas Tecnologías (MINER) y financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial.

El bloque de la investigación relacionada con los nuevos variantes somaclonales de *Ficus elastica*, *Syngonium* y *Spathiphyllum* se llevaron a cabo, bajo la dirección del Dr. Vicente Moreno Ferrero, en la Universidad Politécnica de Valencia y en el Instituto de Biología Molecular de Valencia.

Quisiera agradecer a todos los organismos y a la empresa que han intervenido en el proyecto su apoyo prestado, así como expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que han participado de una manera u otra en la elaboración de esta tesis, de manera especial a Vicente Moreno, Luis Roig, Begoña García-Sogo, Elisa Sala, Benito Pineda y Jorge Miguel.

A. García-Pitarch

# Índice

<b>I.- Introducción</b> .....	1
<b>1.- El mercado de plantas ornamentales de interior</b> .....	3
1.1.- Perspectiva general del sector de plantas ornamentales .....	3
1.2.- El sector ornamental español .....	6
1.2.1.- Evolución del sector .....	6
1.2.2.- Panorama del sector en el momento presente .....	7
1.2.3.- La situación en la Comunidad Valenciana .....	8
1.2.4.- El consumo actual y su potencial futuro .....	8
1.2.5.- Perspectivas de futuro .....	9
1.2.6.- Flor cortada y planta ornamental .....	10
1.2.7.- Tipos de plantas a producir y aspectos comerciales .....	12
1.2.8.- Futuro del sector .....	13
<b>2.- Producción de plantas ornamentales en cultivo <i>in vitro</i></b> .....	14
2.1.- Importancia del cultivo <i>in vitro</i> en la producción de plantas ornamentales .....	15
2.2.- El cultivo <i>in vitro</i> en las plantas de interior .....	19
2.3.- Métodos básicos .....	23
2.3.1.- Cultivo de meristemos .....	23
2.3.2.- Propagación a partir de yemas axilares procedentes de ápices nudos .....	24
2.3.2.1.- Cultivo de ápices .....	24
2.3.2.2.- Cultivo de nudos .....	25
2.3.3.- Propagación de brotes adventicios .....	26
2.3.3.1.- Morfogénesis directa .....	26
2.3.3.2.- Morfogénesis indirecta .....	26
2.4.- Etapas de la propagación <i>in vitro</i> .....	27
2.5.- Ventajas del cultivo <i>in vitro</i> .....	28

2.6.- Inconvenientes. Problemas relacionados con la propagación <i>in vitro</i> .....	29
2.6.1.- Contaminación.....	29
2.6.2.- Hiperhidratación.....	38
2.6.3.- Oxidación polifenólica ( <i>browning</i> ).....	45
2.6.4.- Aspectos negativos de la variación somaclonal.....	54
<b>3.- Selección somaclonal en la mejora de las plantas ornamentales .....</b>	<b>55</b>
3.1.- Causas de la variación somaclonal.....	56
3.2.- Frecuencia de variación.....	58
3.3.- Factores que influyen sobre la frecuencia de la variación somaclonal .....	59
3.4.- La selección somaclonal como método de mejora.....	61
3.5.- La selección somaclonal en la mejora de especies ornamentales .....	62
<b>II.- Objetivos.....</b>	<b>69</b>
<b>III.- Variación somaclonal en <i>Ficus lyrata</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>73</b>
Descripción de los cultivares.....	78
Nuevas características deseables .....	81
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>82</b>
Material vegetal y métodos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	82
Aclimatación del material vegetal .....	84
Caracterización fenotípica de los nuevos variantes somaclonales .....	85
Método para la determinación de clorofilas .....	87
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>88</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>102</b>
<b>IV.- Variación somaclonal en <i>Ficus elastica</i>.....</b>	<b>109</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>111</b>
Cultivo de los <i>Ficus elastica</i> en general.....	113
Cultivares más relevantes .....	115

---

La micropropagación del <i>Ficus elastica</i> .....	116
<b>Nuevas características deseables</b> .....	119
<b>Materiales y métodos</b> .....	119
Material vegetal y métodos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	119
Aclimatación del material vegetal .....	121
Caracterización fenotípica del nuevo variante somaclonal .....	122
<b>Resultados y discusión</b> .....	123
<b>Resumen</b> .....	134
<b>V.- Variación somaclonal en <i>Ficus benjamina</i></b> .....	139
<b>Introducción</b> .....	141
Descripción de los cultivares más importantes.....	144
Variabilidad existente .....	145
Nuevas características deseables .....	149
<b>Materiales y métodos</b> .....	150
Material vegetal y métodos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	150
Caracterización fenotípica de los nuevos variantes somaclonales .....	153
<b>Resultados y discusión</b> .....	156
Obtención del variante “Mallorca” .....	156
Características vegetativas del variante “Mallorca” en comparación con las del parental “Exótica” y las de los otros cultivares variegados de <i>F. benjamina</i> .....	157
Características vegetativas del variante “Mallorca” en diferentes condiciones ambientales .....	168
<b>Resumen</b> .....	183
<b>VI.- Variación somaclonal en <i>Spathiphyllum</i></b> .....	187
<b>Introducción</b> .....	189
Cultivares más importantes.....	196
<b>Materiales y métodos</b> .....	204

---

Material vegetal y métodos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	204
Aclimatación del material vegetal .....	206
Caracterización fenotípica del nuevo variante somaclonal .....	207
<b>Resultados y discusión</b> .....	208
Obtención del variante compacto de <i>Spathiphyllum</i> .....	208
Características vegetativas del variante compacto en comparación con las del parental “Prolific” .....	209
<b>Resumen</b> .....	219
<b>VII.- Variación somaclonal en <i>Syngonium</i></b> .....	223
<b>Introducción</b> .....	225
<b>Cultivares más conocidos</b> .....	229
<b>Nuevas características deseables</b> .....	231
<b>Materiales y métodos</b> .....	232
Material vegetal y métodos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	232
Aclimatación del material vegetal .....	234
Caracterización fenotípica de los nuevos variantes somaclonales .....	235
Variante somaclonal “Selecta” .....	235
Nuevos variantes somaclonales .....	237
<b>Resultados y discusión</b> .....	238
<i>Syngonium</i> “Selecta” .....	238
Nuevos variantes somaclonales de <i>Syngonium</i> .....	254
<b>Resumen</b> .....	258
<b>VIII.- Conclusiones</b> .....	269
<b>IX.- Bibliografía</b> .....	273





**I.-Introducción**

## **1.- El mercado de plantas ornamentales de interior**

### **1.1.- Perspectiva general del sector de plantas ornamentales**

El mercado de las especies ornamentales es dinámico y muy competitivo, con una afluencia considerable desde las zonas productoras a los principales centros consumidores: Europa (sobre todo Alemania), Estados Unidos y Japón. La ubicación de las zonas productoras depende mucho de la especie en cuestión: los grandes cultivos de flor cortada se producen en zonas distantes de los mercados, en tanto que las plantas de maceta y las plantas de temporada continúan siendo producidas en gran medida cerca de los centros de consumo.

Dentro de la Horticultura Ornamental se pueden agrupar las especies según el uso al que se destinan: flor cortada, verdes de corte, plantas de hoja decorativa en maceta (incluidas las plantas de interior), planta de flor en maceta, arbusto o árbol de jardinería o revegetación, plantas de temporada, etc. (Caballero y Cid, 1998).

El sector de las plantas ornamentales en nuestro país se ha caracterizado por un crecimiento lento, cuando no incluso por una regresión en algunas zonas. La situación de exportadores netos que esperábamos al entrar en la CEE no se ha hecho realidad y seguimos siendo un país claramente importador. Así pues, nos hemos visto sometidos a una invasión de productos centroeuropeos, fundamentalmente provenientes de Holanda, país que domina el mercado tanto como intermediario como productor directo (Jimenez, 1998).

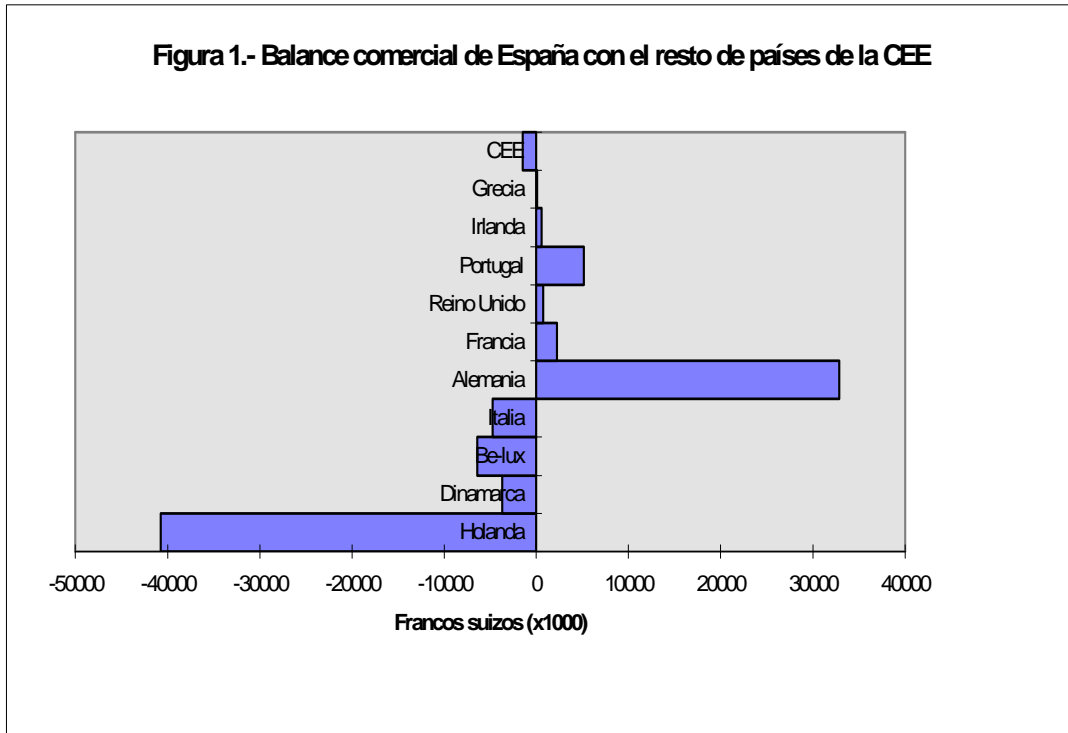
En la tabla 1, vemos que los países europeos de clima frío (Holanda, Bélgica y Dinamarca) son los grandes abastecedores de nuestros mercados. Una posible explicación a este sorprendente fenómeno es que todos estos países están situados junto al principal mercado consumidor de plantas: Alemania. A lo largo del tiempo, esta situación geográfica les ha ayudado a crear unas redes comerciales muy estables que, junto a las modernas técnicas de transporte y a la buena red de autovías, les ha permitido acceder a todos los puntos de Europa, incluso los países cálidos como España que en teoría deberían ser más productores que consumidores.

**Tabla 1.-** Importación de productos hortícolas no comestibles (semillas excluidas) en francos suizos (x1000) durante el año 1992

	D	B-L	DK	E	F	GR	IRL	I	NL	P	GB	CEE
<b>Holanda</b>	2603249	258896	106762	96290	730518	25438	25823	456098	-	25158	551917	4880149
<b>Dinamarca</b>	294810	5092	-	3943	41696	1096	1005	45809	26983	144	56681	477258
<b>Be-lux</b>	59955	-	1912	9238	165365	2014	465	34643	83850	3277	36911	397631
<b>Italia</b>	197143	5602	3708	13042	52711	7007	35	-	31551	2285	22378	335464
<b>Alemania</b>	-	13457	18492	973	26276	525	338	14593	77160	651	12195	164660
<b>Francia</b>	42268	12119	454	10585	-	627	478	26136	38878	2372	8300	142218
<b>España</b>	33823	2789	278	-	12835	96	555	9352	55553	5666	12986	145343
<b>R. Unido</b>	4414	1949	3606	816	6435	38	9082	729	21273	278	-	48620
<b>Portugal</b>	1785	253	4	489	1471	5	-	33	2005	-	1138	7182
<b>Irlanda</b>	367	2	38	15	56	-	-	20	294	-	2592	3385
<b>Grecia</b>	149	36	15	-	51	-	-	91	873	-	-	1214
<b>CEE</b>	3219429	299690	135189	135390	1035938	36848	37606	586291	334479	39794	697773	65558427
<b>Israel</b>	388689	1436	276	2321	4435	454	-	3730	124869	564	31116	207892
<b>Colombia</b>	34627	782	505	21353	5393	1712	3697	2543	23356	13	70513	164495
<b>USA</b>	56109	1441	358	1385	740	13	18	2905	57198	115	3676	123957
<b>Costa Rica</b>	29562	643	745	1498	193	202	31	4070	61360	22	291	98617
<b>Kenia</b>	24703	413	734	20	1020	95	-	653	49163	-	6953	83753

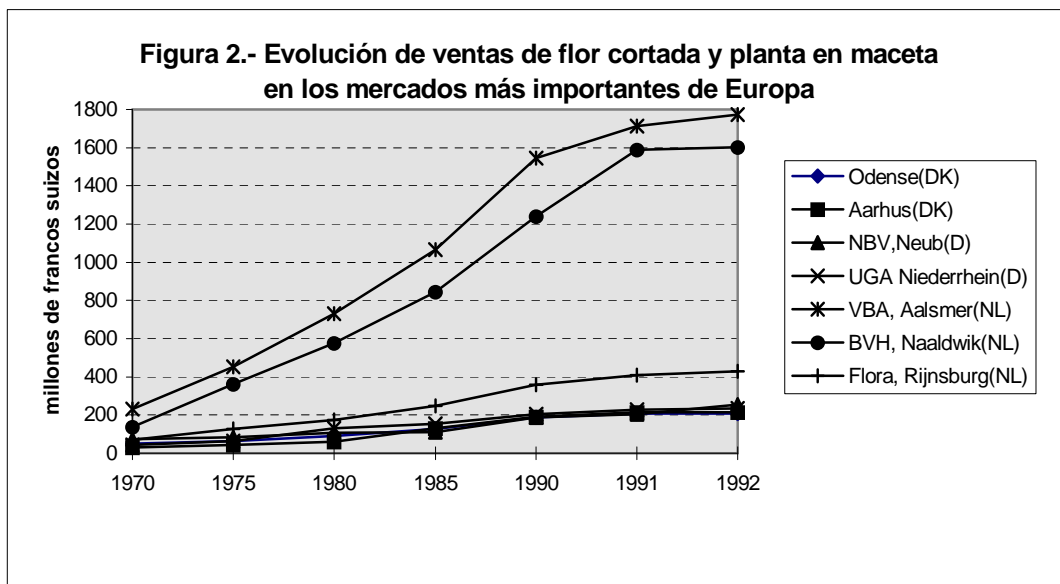
Tomado del AIPH Yearbook of the International Horticultural Statistics, 1993.

En la figura 1, se representa el balance comercial entre los países comunitarios y España. Vemos que nuestros principales clientes son Alemania (de forma muy destacada) y Portugal. El balance global de nuestro país con respecto a nuestros socios es negativo (145.343.000 francos suizos) debido fundamentalmente a la gran cantidad de flores y plantas que invaden nuestro país procedentes, sobre todo, de Holanda (96.290.000 francos suizos).



Según el Yearbook of the International Horticultural Statistics, 1993

Los principales mercados del sector se encuentran en Holanda, Alemania y Dinamarca, y según las mismas fuentes, el volumen de ventas en los últimos años es el que aparece en la figura 2.



Según estos datos, las ventas de flores y plantas ornamentales han aumentado espectacularmente en los últimos años. El consumo global sobrepasa los 25 billones de dólares al año, que se distribuyen en los siguientes conceptos: 46% flores, 38% plantas en maceta, 11% bulbos y 5% verde de corte. Se trata, pues, de un mercado en expansión y lucrativo (Behe, 1993)

## **1.2.- El sector ornamental español**

### **1.2.1.- Evolución del sector**

El sector ornamental español ha sufrido profundos cambios durante los últimos años, cambios que se reflejan tanto en la superficie cultivada como en el destino de la producción. Entre 1987 y 1989 la producción ornamental creció de forma espectacular, debido principalmente, a los buenos precios obtenidos por la flor española en los mercados exteriores. Durante este periodo la producción creció un 20% y la superficie empleada para el cultivo de planta ornamental se situó en el nivel más alto de todos los tiempos: 5000 Ha.

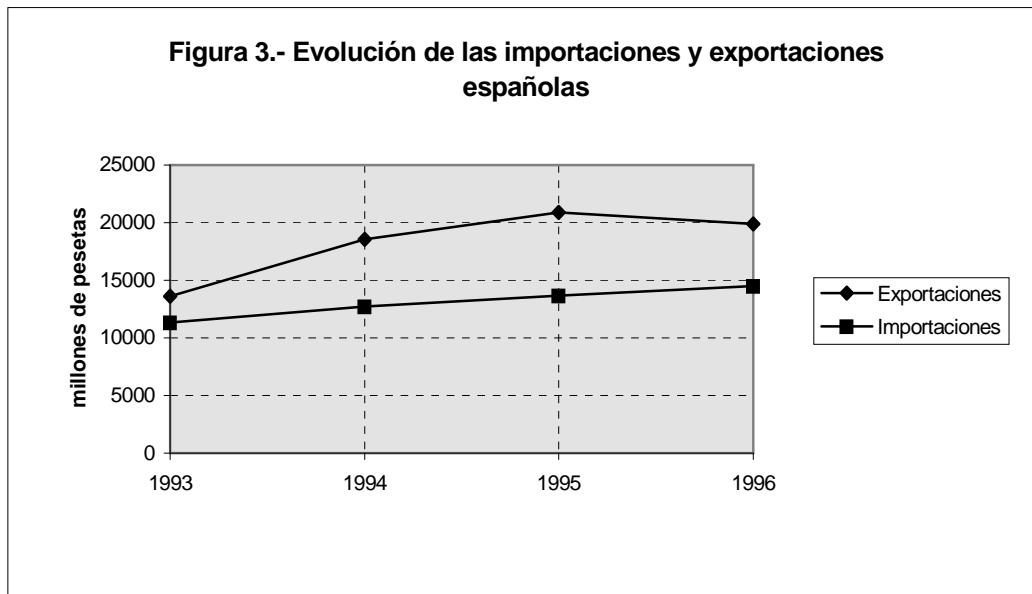
Sin embargo, la competencia de terceros países con costos de producción mucho más bajos y, en casos como el de Colombia, con acuerdos arancelarios especiales con la Unión Europea provocó una caída del 53% de la superficie dedicada a flor cortada en 1989. Ese año Almería contaba con 350 Ha dedicadas a la producción de flor, mientras que en 1990 la superficie bajó a 250 Ha y en 1991 sólo se destinaron 42 Ha<sup>1</sup>. A raíz de esta fuerte competencia con el mercado exterior los productores del sureste se volcaron en el mercado nacional y, al mismo tiempo, se especializaron en el cultivo de plantas de interior, sobre todo *Ficus benjamina*, *Schefflera*, *Pothos*, *Nephrolepis*, *Poinsettia* y *Dieffenbachia*.

Para evitar la competencia holandesa las plantas se producen en formato de gran tamaño -el precio del transporte de plantas desde Holanda repercute mucho en el precio final de las plantas de gran tamaño- y a bajos precios. Este hecho ha supuesto que algunas zonas donde tradicionalmente se producían plantas de interior tengan problemas (como es el caso de Canarias) e incluso hayan dejado de producirlas (El Maresme catalán). En general el material vegetal de partida del que se nutren la mayoría de los cultivadores españoles procede de Holanda.

---

<sup>1</sup>Horticultura europea. Febrero 95. Pág. 62-74.

En la actualidad el sector de la flor cortada y la planta ornamental atraviesa un momento delicado. Los datos de la Federación de Exportadores de Frutas y Hortalizas (figura 3) reflejan un descenso de las ventas exteriores que se concretó en una caída de la facturación de unos 1000 millones de pesetas, al pasar de unos envíos por valor de 20.901 millones en 1995 a una cifra de sólo 19.874 millones en 1996. Por el contrario, las importaciones mostraron una tendencia inversa ya que pasaron de 13.667 millones a casi 15.000 en el mismo período.



Fuente: Federación de Exportadores de Frutas y Hortalizas.

No obstante, conviene resaltar que el volumen de negocio del sector ha venido creciendo de manera ininterrumpida desde 1993. Este año se cerró con una cifra de exportación de 13.612 millones de pesetas, mientras que en 1995 las ventas en el exterior rondaron los 21.000 millones de pesetas

### 1.2.2.- Panorama del sector en el momento presente

Según los datos del Fepex, el sector de la flor y de la planta está constituido por unas setecientas empresas, que facturan en su conjunto unos 24.000 millones y emplean a 40.000 trabajadores. Andalucía, Cataluña, la Comunidad Valenciana y Canarias concentran el 75% de una producción española que tiene en claveles, rosas, crisantemos, gladiolos y orquídeas su principal baza.

### 1.2.3.- La situación en la Comunidad Valenciana

Por lo que respecta a la Comunidad Valenciana, la superficie de cultivo dedicada a la producción de flor ocupa alrededor de 185 Ha. Tanto Andalucía, la zona productora más importante de España, como Cataluña cuentan con mayores extensiones de terreno para la producción de flores, aunque en el capítulo de planta, sobre todo planta de exterior y palmeras, la Comunidad Valenciana, con 840 hectáreas, ostenta el liderazgo a nivel nacional. En los últimos tiempos, el número de productores valencianos ha disminuido, pero la extensión de las parcelas de los que mantienen el cultivo ha crecido y las instalaciones han mejorado en conjunto, lo que sin duda son factores positivos.

En la siguiente tabla se muestran las producciones de planta ornamental por especies en la Comunidad Valenciana.

**Tabla 2.-** Producción por grupos de especies (datos en unidades)

<b>GRUPOS</b>	<b>Castellón</b>	<b>Valencia</b>	<b>Alicante</b>	<b>TOTAL</b>
Árboles	157.730	185.255	50.844	393.828
Arbustos	107.335	2.482.581	188.421	2.778.337
Aromáticas	14.750	1.599.444	150.489	1.764.683
Bonsai	800	4.210	350	5.360
Cactáceas y crasas	975	3.899.184	91.880	3.992.039
Coníferas	96.325	974.845	166.884	1.238.054
Forestal	255.295	6.862.679	326.981	7.444.955
Plantas de hojas	3.045	624.720	249.008	876.773
Plantas interior/flor	1.940	1.132.514	3.176.713	4.302.167
Palmácea	12.860	1.226.798	295.733	1.535.391
Pl. macizo	36.350	3.523.903	509.920	4.070.173
Rosal	9.950	1.983.819	29.249	2.023.018
Trepadoras	10.050	665.081	112.442	787.573
<b>TOTAL</b>	<b>707.405</b>	<b>25.165.033</b>	<b>5.339.914</b>	<b>31.212.352</b>

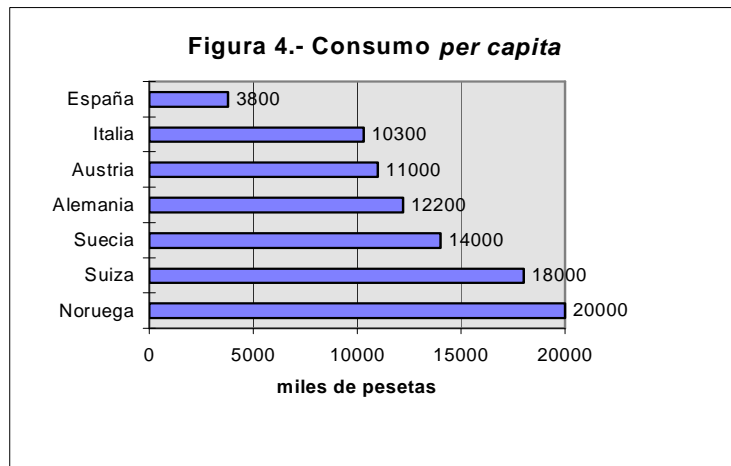
Según informe de la FEPEX

### 1.2.4.- El consumo actual y su potencial futuro

Uno de los factores más negativos y que contribuye a oscurecer las perspectivas del sector es la falta de estructuras comerciales y organizativas eficaces, que con frecuencia obliga a los productores a depender de firmas extranjeras, sobre todo holandesas, que se encargan de



la venta final del producto y obtienen, claro está, el valor añadido de los distintos eslabones del proceso comercial.



Una de las posibles vías para sortear la crisis es explotar en mayor medida el mercado interior. Resulta que en España el gasto *per capita* en flores y plantas se sitúa en torno a las 3.800 pesetas anuales, mientras que en países como Noruega la cifra es de 20.000, en Suiza 18.000 y en Suecia, 14.000 pesetas por persona y año (figura 4). Aun así, el consumo de este producto en España ha crecido considerablemente en los últimos 10 años, ya que en 1985 el desembolso por cabeza no sobrepasaba las 800 pesetas anuales.

Sea como fuere, hay un importante margen potencial para aumentar el consumo en el mercado nacional y los especialistas consideran que la puesta en práctica de estrategias comerciales más en consonancia con las tendencias imperantes en Europa, tales como la venta de flores y plantas en supermercados a precios muy razonables, contribuirían a incrementar el hábito de consumir flores y plantas entre el público español. La publicidad -en 1997 el sector contó con unos 100 millones de la Unión Europea para campañas de promoción- es otro de los elementos que puede jugar de manera importante en favor de un aumento de las ventas.

#### **1.2.5.- Perspectivas de futuro**

Actualmente el sector ornamental español parece haber encontrado el camino hacia un futuro prometedor y más estable. La especialización por zonas productoras, el rigor en el trabajo que permite producir plantas y flores de buena calidad y el nuevo enfoque hacia un mercado interior aún por explotar nos permiten ser optimistas.

El gran reto del sector es, sin lugar a dudas el mercado interior. Desde la UE se sitúa a España como uno de los países más prometedores respecto a las perspectivas de incremento de consumo. Nuestro mercado está aún muy lejos de la saturación y ofrece muchas posibilidades, sobre todo si se consigue incrementar el consumo *per capita* y, tanto o más importante, si se logra introducir el hábito de comprar flores y plantas en cualquier momento del año y por el simple placer de disfrutar del producto.

### 1.2.6.- Flor cortada y planta ornamental

La mayor parte de las estadísticas que hablan de la producción, consumo y otros datos que describen el sector de las ornamentales, no distinguen entre cada uno de los productos. Sin embargo los productores de flor cortada son totalmente diferentes a los de planta ornamental. Los requerimientos de una instalación para producir planta de flor cortada son distintos a los que se necesitan para producir planta en maceta. En este trabajo vamos a incidir en algunos datos para separar ambos productos y darle a cada uno de ellos la importancia económica relativa que poseen. Así por ejemplo, en la tabla 3 se indican algunos datos sobre la superficie y producción de las flores más importantes así como de las plantas ornamentales que se producen en España.

**Tabla 3.-** Superficie y producción de flores y planta ornamental en España

<b>Productos ornamentales</b>	<b>Superficie (Ha)</b>	<b>Producción</b>
Claveles	1.856	216.302(*)
Rosas	546	29.860(*)
Otras flores	1.239	46.070(*)
<b>Total Flores</b>	<b>3.641</b>	<b>292.232(*)</b>
Plantas	1.407	72.259(**)

(\*) En miles de docenas

(\*\*) En miles de plantas

Fuente: Anuario de Estadística Agraria 1991 (Ed 1994)

En la tabla 4 se muestran el consumo de flor cortada y planta en maceta en los principales países europeos.

**Tabla 4.-** Consumo *per capita* (en Ecus) de productos ornamentales en diversos países de Europa.

<b>País</b>	<b>Flores</b>	<b>Plantas</b>	<b>TOTAL</b>
Noruega	56	69	125
Suiza	72	43	115
Alemania	39	37	76
Austria	37	32	69
Italia	46	18	64
Holanda	35	24	59
Francia	27	24	51
Reino Unido	18	7	25
España	13	9	22

Fuente: Dutch Flower Council (1992) y elaboración propia

Entre los países exportadores, destaca (tabla 5) Holanda, sede mundial del comercio de flores y principal productor de flor cortada en Europa. Cerca del 60% de las exportaciones mundiales de flor cortada y el 48% de las plantas en maceta tienen su origen en este país.

**Tabla 5.-** Volumen de exportación (miles de dólares) desde diversos países en 1995

<b>País</b>	<b>Total</b>	<b>Flores</b>	<b>Verde de corte</b>	<b>Plantas en maceta</b>
Mundo	5.376.232	3.153.142	479.240	1.743.850
Holanda	2.776.682	1.845.946	45.188	885.548
Colombia	440.922	438.534	1.739	649
Dinamarca	224.115	2.097	22.983	199.035
Italia	194.965	78.381	65.110	51.474
Israel	177.211	146.672	11.958	18.581
Bélgica/Luxemburgo	175.583	18.436	5.451	151.697
Costa Rica	142.707	12.913	71.183	58.611
Canadá	109.766	1.922	22.670	85.174
USA	105.474	7.962	90.246	7.266
Kenia	104.521	98.768	986	4.767
Alemania	103.590	17.818	11.249	74.522
Tailandia	82.930	72.038	1.303	9.589
Francia	72.855	30.965	11.008	30.882
Ecuador	70.240	70.153	73	14
España	62.223	44.330	3.261.	14.632
Zimbawe	50.859	50.580	16	263
Guatemala	43.155	9.403	16.461	17.290
I. Canarias	42.483	16.624	2.344	23.516
N. Zelanda	35.642	33.348	214	2.079
Sudáfrica	31.539	11.578	15.905	4.055

Fuente: Pathfast Publishing..Tomado de Agricultura ornamental. Octubre de 1997. Horticultura 124, pag. 31-36.

En España la mayor zona productora de planta de interior es el Poniente almeriense. Según la Delegación Provincial de Agricultura y Pesca de Almería, hay una superficie de cultivo de 80 Ha y sólo se exporta el 15% de la producción total. El 60% de la producción es

planta de interior verde en maceta, el 20% es planta de interior de flor y el 20% restante se dedica a la flor cortada. En la tabla siguiente se indican las especies más cultivadas por orden de importancia en función del volumen de producción (Plantflor. Cultivo&Comercio. 1977. N°2. 11-20)

**Tabla 6.-** Relación de las principales plantas ornamentales que se producen en Almería

<b>PLANTA INTERIOR (Hoja) (60%)</b>	<b>PLANTA DE FLOR (20%)</b>	<b>FLOR CORTADA</b>
Schefflera	Poinsettia	Gypsophila paniculata
Ficus	Hortensia	Clavel
Pothos	Geranio	Crisantemo
Helecho	Rosal (maceta)	Clavel mini
Syngonium	Fuchsia	Lilium
Philodendron	Impatiens	Rosa
Sansevieria	Sulfinia	Gerbera
Spathiphyllum	Dipladenia	Statice
Dieffenbachia	Crisantemo	Limonium
Asplenium	Kalanchoe	Aster
Dracaena	Clavel enano	Solidaster
Yucca	Verbena	Iris
Croton	Hibiscus	Liatris
Maranta	Bougainvillea	Tulipán
Aspidistra	Adelfa	Freesia
Ruscus	Portulaca	Strelitzia
Gold Crest	Bignonia	Alstroemeria
	Vinca	Alhelí
	Leonotis	Anthirrinum
	Gardenia	Flor de cere
	Cyclamen	

Fuente: Plantflor. Cultivo&Comercio. 1977. N°2: 11-20.

### 1.2.7.- Tipos de plantas a producir y aspectos comerciales

Siguiendo el esquema propuesto por Cid et al., 1990 podemos pensar en los siguientes tipos de plantas de interés:

- Nuevas variedades de cultivos existentes.
- Nuevos usos para plantas que ya se cultivan para otros fines ( de flor cortada a maceta, de jardín a flor cortada, etc.)
- Desarrollo de nuevas plantas o formatos de planta a partir de la flora nativa.

Según Caballero y Cid (1998), hay una serie de atributos y aspectos a considerar a la hora de introducir una nueva planta ornamental, y cuya valoración adecuada es la que permite acertar en la introducción de algo que pudieramos considerar como un nuevo cultivo.

**Tabla 7.-** Ejemplo de perfil de valoración inicial para nuevas plantas ornamentales

	Descartable		Mejorable		Adecuado		Óptimo	
	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
<b>1. ATRIBUTOS ESTÉTICOS</b>								
<b>FLORACIÓN</b>								
ABUNDANCIA								
PERSISTENCIA								
<b>FOLLAJE</b>								
VALOR DECORATIVO								
PERSISTENCIA								
<b>2. CONDICIONANTES GENÉTICOS</b>								
DIVERSIDAD DE COLORES								
DIVERSIDAD DE FORMAS, ETC.								
EXISTENCIA DE ESPECIES PRÓXIMAS								
<b>3. CONDICIONANTES FISIOLÓGICOS</b>								
ADAPTACIÓN SUELOS CLIMAS								
ESTACIONALIDAD								
RESPUESTAS A T, H.R., LUZ								
<b>4. CONDICIONES DE MANEJO</b>								
SISTEMA DE REPRODUCCIÓN								
VELOCIDAD DE CRECIMIENTO								
REQUERIMIENTO MANO DE OBRA								
PLAGAS Y ENFERMEDADES								
TAMAÑOS Y USOS POSIBLES								
<b>5. OTROS ASPECTOS</b>								
VALORES CULTURALES, ETC.								
COMPORTAMIENTO								
SEMEJANZA CON OTRAS PLANTAS								

Uno de los condicionantes más importantes para llevar a cabo un cultivo ornamental es que exista una base real de mercado para su consumo. Evidentemente, para que una planta pueda implantarse con facilidad en el mercado debe tener unas condiciones mínimas, a saber:

- Coste de producción razonablemente bajo
- Facilidad de transporte y almacenamiento
- Fácil identificación por parte del el usuario
- Características postcosecha aceptables

### 1.2.8.- Futuro del sector

Dada la creciente competencia en los mercados, cultivar productos de buena calidad o ser el primero en el mercado con un nuevo producto ya no es suficiente. El mercado actual cuenta con una amplia gama de productos de primera calidad a precios muy asequibles.

Además, hoy en día deben tenerse en cuenta otros factores como el embalaje, el color y el surtido de productos, el respeto por el medio ambiente, etc. Es decir, hay que destacar el valor estético, saludable y cultural de los productos y no el económico.

El desarrollo masivo de grandes cadenas de supermercados, hipermercados o comercializadores en masa ha ejercido presión en los precios de las flores. Se requieren productos en masa y a bajo precio para alcanzar un número mayor de clientes. En consecuencia, la industria, consciente de que no todos los mercados requieren la misma calidad en los productos, se ha visto obligada a desarrollar estándares que definan calidad para los diferentes segmentos del mercado.

Los efectos de la comercialización en masa también repercuten en los procesos productivos, selección de variedades, utilización del espacio y técnicas de cultivo (Fernández, 1997).

## **2.- Producción de plantas ornamentales en cultivo *in vitro***

La producción de muchas plantas, especialmente las ornamentales, se basa en el uso del cultivo de tejidos en alguna etapa de su desarrollo. La posibilidad de suministrar plantas libres de patógenos mediante el cultivo de tejidos ha transformado, en los últimos tiempos, la industria de la planta de interior (Kitto, 1997). Efectivamente, la mayor parte de las plantas ornamentales de interior que se comercializan en Europa, se propagan mediante el cultivo de tejidos. A nivel comercial, las ventajas más importantes de este método de propagación son:

- (i) En la mayor parte de los casos las plantas obtenidas en cultivo *in vitro* están libres de patógenos.
- (ii) Son plantas de una gran calidad, un gran vigor y poseen una gran facilidad para producir raíces en las primeras fases de su desarrollo.
- (iii) Se obtienen plantas muy homogéneas, con un crecimiento muy uniforme y denso y, por tanto, son fáciles de cultivar en los invernaderos.
- (iv) Es posible producir una gran cantidad de plantas en cualquier fecha del año.
- (v) Se consigue un gran ahorro de espacio al disminuir sensiblemente el espacio necesario para cultivar plantas madre.
- (vi) Facilidad de embalaje y transporte del material.

A pesar de las claras ventajas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales frente a otros métodos más clásicos de propagación de plantas, la necesidad de una gran cantidad de mano de obra para manipular el material vegetal en las cabinas de flujo laminar puede llegar a encarecer en gran medida el precio final de cada planta. Ya en 1981, Debergh y Maene, indicaron que el uso del cultivo de tejidos para la multiplicación de plantas ornamentales es caro y por tanto está limitado a un número concreto de especies.

La mayoría de los laboratorios comerciales utilizan el esquema clásico de tres etapas (iniciación, multiplicación y enraizamiento) propuesto por Murashige (1974a, b, 1976 y 1978). La etapa del enraizamiento *in vitro* del material vegetal encarece mucho el proceso. Así pues, la alternativa es enraizar las plántulas en condiciones *in vivo* siempre que sea posible. Si evitamos la transferencia de plantas desde el medio de multiplicación al medio de enraizamiento, se puede conseguir un ahorro de, al menos, el 35% del costo total de plántulas producidas *in vitro*. Donnan et al. (1978) estimaron que el enraizamiento *in vitro* de plantas de *Begonia* y *Ficus* supone un 56% del costo total de producción.

Otra posible solución para rebajar los costos relacionados con la mano de obra es aumentar el grado de automatización del proceso. Se precisan investigaciones adicionales, tanto en el sector privado como en el público, a fin de solventar los problemas existentes en este apartado en un tiempo relativamente corto.

## **2.1.- Importancia del cultivo *in vitro* en la producción de plantas ornamentales**

La mayor parte (74%) de las plantas que están siendo micropropagadas comercialmente son ornamentales: flor cortada, plantas de interior, orquídeas y helechos (Pierik, 1991).

En la tabla siguiente se muestra el número de laboratorios en funcionamiento en España y otros países de Europa según los datos recogidos en los “Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories”, elaborados dentro del programa Cost 87 y Cost 822.

**Tabla 8.-** Evolución del número de laboratorios de cultivo *in vitro* en España y Europa, según los datos recogidos en el proyecto COST 87 y COST 822

	1981	1988	1990	1993	1996
España oficiales	3	8	13	17	21
España comerciales	2	11	12	11	14
Europa oficiales	-	154	247	329	307
Europa comerciales	-	137	170	172	193

Tomado de Melé, E. 1998. Micropropagación de plantas ornamentales. Producción de plantas ornamentales. pp: 24-35

Según los datos de Pierik y Ruibing (1997), en 1990, 78 laboratorios holandeses produjeron, 94,5 millones de plantas mientras que, en 1995, 67 laboratorios produjeron en el mismo país 53.8 millones de plantas (tablas 10 y 11). En realidad el número de laboratorios productores y el número de plantas que se produjeron en Holanda disminuyó durante el periodo de tiempo comprendido entre 1990 y 1995, aunque se apreció una importación de 73,4 millones de plantas producidas *in vitro*, con lo que las plantas que se comercializaron en 1995 en Holanda ascendió a la cantidad de 131,15 millones.

**Tabla 9.-** Número de laboratorios comerciales de cultivo de tejidos en Holanda en 1990 y 1995

Producción	Número de laboratorios	
	1990	1995
Menos de 10.000 plantas	14	14
10.000-100.000	21	24
100.000-500.000	19	11
500.000-1.000.000	6	6
1.000.000-5.000.000	12	8
5.000.000-10.000.000	4	4
Más de 10.000.000	2	0
Total	78	67

Fuente: Pierik y Ruibing (1997)

En el año 1990, sólo 6 laboratorios produjeron la mitad de las plantas producidas en Holanda (tabla 9), mientras que la mitad de los laboratorios existentes en el mismo país producían solamente menos de 100.000 plantas al año. En 1995 desaparecieron los 2 grandes laboratorios que producían más de 10.000.000 de plantas y el número total de laboratorios que produjeron planta *in vitro* fue menor que en el año 1990.



**Tabla 10.-** Producción total y importación de plantas micropropagadas (x1000) en Holanda, según el grupo de plantas.

	Número de plantas producidas		Importadas
	1990	1995	1995
Plantas de maceta	42.540	22.019	23.400
Bulbosas	23.938	5.954	33.684
Flor cortada	21.555	11.638	17.702
Orquídeas	3.629	9.418	1.204
Cultivos agrícolas	814	471	0
Plantas perennes	814	1.138	307
Plantas acuáticas	417	1.204	800
Plantas leñosas	410	1.275	128
Hortícolas	239	235	0
Plantas carnívoras	87	333	110
Frutales	10	115	0
Total	94.453	53.800	77.335

Fuente: Pierik y Ruibing (1997)

Cerca de la mitad de las plantas producidas en Holanda en 1990 y 1995 son plantas de maceta, de interior y con flor, mientras que los frutales y los arbustos ornamentales se producen en pequeñas cantidades. La diversidad de las plantas micropropagadas e importada en Holanda durante 1995 se muestran en la tabla 11.

Los principales grupos de plantas multiplicadas *in vitro* en Holanda son: plantas en maceta (22 millones), flor cortada (11,6), orquídeas (9,4) y bulbos (6). La importación holandesa en 1995 fue de 77,3 millones de plantas, principalmente de Polonia (37 millones), India (17,1) y Belgica (7.3). En el periodo 1990-1995 se produjo en Holanda una disminución en la industria de la micropropagación. Esta recesión se debió a la enorme importación de plantas desde países con una mano de obra mucho más barata.

La inestabilidad que se observa en la industria de la micropropagación está directamente ligada con el mismo fenómeno mundial que afecta al resto de las industrias. El 80% de los nuevos negocios que se crean no sobreviven más de 5 años y sólo el 10% superan los 10 años de antigüedad. Por otro lado, el gran crecimiento experimentado por la industria de la micropropagación en los 80 ha contribuido, probablemente a la disminución asociada a los 90 (Zimmerman and Jones, 1991). En la actualidad, la mayoría de los laboratorios de cultivos de tejidos vegetales están asociados a viveros para asegurar la alta calidad de las plantas cultivadas y terminadas.

**Tabla 11.-** Plantas micropropagadas e importadas (x1000) en Holanda durante 1995 en un número mayor a 100.000.

<b>Género</b>	<b>Número de plantas producidas</b>	<b>Número de plantas importadas</b>
<i>Neprholepis</i>	13.002	1.500
<i>Gerbera</i>	6.044	15.193
<i>Lilium</i>	5.130	33.196
<i>Phalaenopsis</i>	4.422	1.000
<i>Spathiphyllum</i>	3.185	600
<i>Alstroemeria</i>	1.969	0
<i>Limonium</i>	1.250	15
<i>Saintpaulia</i>	1.701	0
Plantas acuáticas	1.204	800
<i>Cymbidium</i>	1.171	200
<i>Aster</i>	1.130	0
<i>Ficus</i>	1.039	3.240
<i>Bromeliaceae</i>	895	0
<i>Anthurium andreanum</i>	810	2.384
<i>Solanum tuberosum</i>	430	0
<i>Hosta</i>	492	146
<i>Zantedeschia</i>	410	1.390
<i>Anthurium scherzerianum</i>	402	1.105
<i>Hydrangea</i>	400	225
<i>Syngonium</i>	381	4.497
Plantas carnívoras	333	110
<i>Delphinium</i>	305	0
<i>Syringa vulgaris</i>	180	50
<i>Brassica oleracea. Botr.</i>	172	0
<i>Philodendron</i>	155	505
<i>Actinida chinensis</i>	110	0
<i>Sinningia</i>	100	390
<i>Pogonanthrum</i>	0	2.740
<i>Calathea</i>	0	1.945
<i>Cordyline</i>	0	452
<i>Peperomia</i>	0	100
<i>Blechnum</i>	0	100
<i>Clusia rosea</i>	0	108
<i>Musa</i>	0	114

Fuente: Pierik y Ruibing (1997)

Como se ha comentado anteriormente el éxito del cultivo *in vitro* a nivel comercial depende mucho de la estrategia seguida para producir una gran cantidad de plantas con procedimientos que no impliquen una gran cantidad de mano de obra, aunque la capacidad de producir una gran cantidad de plantas de gran calidad no garantiza el éxito ya que el cultivo de tejidos debe competir con los métodos convencionales de propagación de plantas que proporcionan productos a un bajo coste (Jones and Sluis, 1991; Standaert-de Metsenaere, 1991).

La propagación comercial de plantas por cultivo *in vitro* es una industria joven con un futuro excelente. La industria continuará expandiéndose, aunque esta expansión no llegará a ser

explosiva sin las nuevas tecnologías que proporcionen una automatización y que mejoren los protocolos de aclimatación.

## 2.2.- El cultivo *in vitro* en las plantas de interior

El cultivo de tejidos con vistas a una rápida multiplicación ha tenido un gran impacto en la producción de las plantas de interior, tanto las de hoja como las de flor. Así por ejemplo, la mayor parte de las especies de *Ficus* pueden ser propagadas *in vitro*, sobre todo las de interés comercial: *Ficus lyrata*, *Ficus benjamina*, *Ficus robusta*, etc.

**Tabla 12.-** Cultivo de tejidos de diferentes especies del género *Ficus*

Especie	Explante	Tipo de cultivo	Medio	Morfogénesis	Referencia
<u><i>Ficus benjamina</i></u>	ápices	ápices	MS+N+BAP(5)+ +IAA(1)	Desarrollo de brotes axilares	Debergh y Maene, 1983
	ápices laterales	ápices	MS+IBA(0.25)+ +BAP(1.25)	Desarrollo de brotes axilares	Battle y Melé, 1984
cv. "Star light"	segmento nodal	ápices	MS+BAP(1)+ +PG(80)+BM(50)	Desarrollo de brotes axilares	Del Amo <i>et al.</i> , 1992
	ápices	ápices	MS+BAP	Desarrollo de brotes axilares	Kristiansen, 1992
	nudos	ápices	MS+BA(0.1)	ápices	Del Amo <i>et al.</i> , 1994
	ápices	ápices	MS+BAP(2)	Desarrollo de brotes axilares	Trujillo, 1994
<u><i>Ficus elastica</i></u>	ápices laterales	ápices	MS+IAA(1)+ +2iP(30)	Desarrollo de brotes axilares	Makino <i>et al.</i> , 1977
	ápices	ápices	MS+BA(0.1)+ +K(1.5)	Desarrollo de brotes axilares	Amaty, A., 1991
<u><i>Ficus lyrata</i></u>	hoja	callo	MS+N+IBA(2.5)+ +BAP(5)	Brotes adventicios	Debergh y Dewael, 1977
	hoja	callo	N&N+BAP+2iP+ +K+IBA	Yemas vegetativas adventicias	Jona y Gribande, 1988

Especie	Explante	Tipo de cultivo	Medio	Morfogénesis	Referencia
<u>Ficus carica</u>	ápices	ápices	MS+NAA(0.18)+ +BAP(0.1)+ +GA(0.03)	Elongación de brotes	Muriithi <i>et al.</i> , 1982
	meristemo	ápices	MS+BAP(1)+ +GA3(3)+NAA(1)	Desarrollo de brotes axilares	Barbosa <i>et al.</i> , 1992
<u>Ficus indica</u>	nudos	ápices	MS+BAP+NAA	ápices	Yassen <i>et al.</i> , 1995
<u>Ficus religiosa</u>	discos de hoja	callo	MS+2,4D(0.5)	brotes adventicios	Puatap <i>et al.</i> , 1986

La calidad de los esquejes obtenidos de las plantas *in vitro* es similar a los esquejes estándar, aunque su crecimiento es mucho más rápido. Si se desea obtener plantas compactas y ramificadas, las plantas propagadas *in vitro* se usan como producto final por su alta calidad y por su uniformidad (Capellades *et al.*, 1991)

Otras plantas de interior que ya sólo se propagan *in vitro* son el *Syngonium* y el *Spathiphyllum*. Las plantas de *Syngonium* procedentes de cultivo de tejidos son muy vigorosas, la mayor parte están libres de patógenos y muy ramificadas exhibiendo una calidad ornamental muy superior a la que muestran las plantas obtenidas mediante la propagación tradicional.

Otra de las plantas ampliamente propagadas *in vitro* es el *Nephrolepis* spp. Se obtienen plantas muy tupidas con gran cantidad de frondes y de un crecimiento muy rápido. Presentan una calidad más elevada que las plantas que se obtienen por división de mata que, por otro lado, requiere una gran cantidad de espacio en el invernadero para cultivar la planta madre.

**Tabla 13.-** Cultivo de tejidos de diferentes especies del género *Syngonium*

Especie	Explante	Tipo de cultivo	Medio	Morfogénesis	Referencia
<u>Syngonium podophyllum y erithrophyllum</u>	yema lateral	callo	MS+IAA(1-2)+ BAP(10)	yemas adventicias	Scaramuzi, 1984
<u>Syngonium podophyllum</u>	ápices, yemas axilares y nudos	callo organogénico	MS+BAP+K+2iP	Desarrollo de yemas axilares y adventicias	Kozak y Dabsi, 1995

**Tabla 14.-** Cultivo de tejidos de diferentes especies del género *Spathiphyllum*

Especie	Explante	Tipo de cultivo	Medio	Morfogénesis	Referencia
<u>Spathiphyllum clevelandii</u>	segmento nodal, espádice, hoja y yema	callo organogénico	MS+BA(1)	brotos adventicios	Fonnesbech y Fonnesbech, 1979
<u>Spathiphyllum wallisi</u>					Maene y Debergh, 1985
<u>Sathipyllum floribundum</u>	yemas laterales	callo organogénico	MS+BAP(1-2)	brotos adventicios	Wand <i>et al.</i> , 1995
	yemas laterales	callo organogénico	MS+BA(2.5)+ +imazalil(16)	brotos adventicios	Werbrouck y Debergh, 1995

En cuanto a los *Philodendron*, se pueden clasificar en tipo roseta y trepadores. La mayor parte de los *Philodendron* tipo roseta cultivados *in vitro*, como por ejemplo el cultivar “Imperial Green”, destacan por su crecimiento compacto y rápido. Además, la tasa de multiplicación *in vitro* es muy alta y, al mismo tiempo, el uso de esta técnica nos proporciona en poco tiempo una gran cantidad de propágulos de una calidad incomparablemente mayor a los que se obtienen mediante el esquejado tradicional, ya que se trata de una planta incapaz de ramificar y que, por tanto, proporciona muy pocos esquejes a no ser que se dañe de una manera irreversible la planta madre.

**Tabla 15.-** Cultivo de tejidos de diferentes especies del género *Philodendron*

Especie	Explante	Tipo de cultivo	Medio	Morfogénesis	Referencia
<u>Philodendron houlettianum y scandens</u>	yemas laterales	callo organogénico	MS+BAP(3)+ +IAA(1)	yemas adventicias	Maia <i>et al.</i> , 1983
<u>Philodendron scandens</u>	yemas axilares	callo organogénico	MS+BAP(10)+ +IAA(0.5)	formación de brotes	Gertsson, 1985
<u>Philodendron erubescens</u>					Maene y Debergh, 1985
	ápices laterales	callo organogénico	MS+BAP(0.2)	brotos adventicios	Sriskandarajah y Skirvin, 1991
cv. “Red emerald”	ápices	callo		brotos adventicios	Li-Jing, 1997
<u>Philodendron tuxtlanum</u>	yemas laterales	callo organogénico	1/2MS+BAP(8)	brotos adventicios	Jambur-Benc, 1990
<u>Philodendron domesticum</u>	ápices	callo organogénico	MS+BAP(0.2)+ +NAA(0.1)	brotos adventicias	Zaghloul <i>et al.</i> , 1996

Los *Philodendron* trepadores necesitan ser entutorados y deben producir hojas desde la base del tutor para formar plantas de la más alta calidad ornamental. Esto sólo se consigue mediante la producción de plantas *in vitro* que producen hojas vigorosas desde que son jóvenes. Los *Philodendron* y otras plantas procedentes del cultivo *in vitro* (tabla 16) como *Dieffenbachia*, *Saintpaulia*, *Cordyline* y *Anthurium* (tabla 17), presentan grandes ventajas frente a las plantas procedentes del cultivo tradicional y, por lo tanto, son propagadas por un gran número de laboratorios en Europa (Ríordáin, 1992).

**Tabla 16.-** Cultivo de tejidos de diferentes especies del género *Dieffenbachia*

Especie	Explante	Tipo de cultivo	Medio	Morfogénesis	Referencia
<i>Dieffenbachia picta</i> "Perfection"	yemas laterales o ápices	callo organogénico	MS+BAP(2.5)+  +NAA(1)	brotos adventicios	Knauss, 1976
<i>Dieffenbachia</i> <i>amoena</i> Hort	ápices	callo organogénico	TS+2iP+NAA	brotos adventicios	di Paola, 1986
<i>Dieffenbachia</i> <i>exotica</i> "Marianna"	yemas laterales o ápices	callo organogénico	MS+2iP(16)	brotos adventicios	Voyatzi, 1989

**Tabla 17.-** Géneros de plantas de interior, en orden de importancia, y número de laboratorios comerciales que las multiplican a gran escala en Europa

Género	Número de laboratorios	
	1990	1993
<i>Ficus</i>	82	39
<i>Philodendron</i>	56	31
<i>Spathiphyllum</i>	46	51
<i>Nephrolepis</i>	44	33
<i>Syngonium</i>	37	39
<i>Cordyline</i>	28	18
<i>Begonia</i>	27	23
<i>Saintpaulia</i>	24	25
<i>Anthurium</i>	19	22
<i>Dieffenbachia</i>	11	9

Tomado del Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories, 1990, 1993

## 2.3.- Métodos básicos

Las grandes posibilidades del cultivo *in vitro* se basan en la totipotencia, es decir, la capacidad que poseen las células somáticas, de reproducir la planta de la que procede, sin importar cuál sea la especialización de dicha célula. Los principales métodos de micropropagación son:

### 2.3.1.- Cultivo de meristemos

En sentido amplio, el término micropropagación alude a la multiplicación del material vegetal en cultivo *in vitro*. En sentido estricto, la micropropagación es la propagación de plantas a partir del meristemo apical (Fig. 0,3) con vistas al saneamiento y clonación del material vegetal.

Se sabe que la distribución de los virus en las plantas es desigual. En plantas infectadas el meristemo apical está generalmente libre o contiene una concentración muy baja de virus (Quak, 1977; Wang y Hu, 1970). Las causas por las que el meristemo escapa de la invasión de los virus son, según Mathews (1970) y Wang y Hu (1980), las siguientes<sup>2</sup>:

1. Los virus se mueven en el cuerpo de la planta a través del sistema vascular, ausente en el meristemo. El movimiento de los virus de célula a célula a través de plasmodesmos es demasiado lento para llevar el mismo ritmo que el crecimiento activo del extremo.
2. La elevada actividad metabólica de las células en división activa del meristemo no permite la reproducción del virus.
3. El sistema de inactivación de virus en el cuerpo de la planta, si existe, tiene mayor actividad en el meristemo que en cualquier otra zona. Así, el meristemo está protegido de infecciones.
4. Un elevado nivel de auxinas endógenas en los ápices de los brotes puede inhibir la multiplicación de los virus.

---

<sup>2</sup> Tomado de George y Sherrington (1984)

El conocimiento del gradiente de distribución de los virus en el extremo del brote permitió a Holmes (1948) obtener plantas libres de virus de individuos infectados de *Dahlia*, a través de cortes de extremos de brotes. Por el mismo principio Morel y Martin (1952) desarrollaron la técnica del cultivo de meristemos para la erradicación de virus *in vitro*. Cortaron extremos de meristemo de *Dahlia*, de unas 10 micras de longitud, y los cultivaron en un medio nutritivo, consiguiendo de esta forma brotes libres de virus. Desde entonces los avances en el cultivo de meristemos han sido tan numerosos, que ha llegado a ser la técnica más eficaz para la obtención de plantas completamente libres de virus (Belkengren y Miller, 1962; Mullin et al., 1974; Boxus et al., 1977), y se ha aplicado con éxito a una amplia gama de plantas cultivadas. Aunque se ha empleado esta técnica fundamentalmente para la eliminación de virus, el cultivo de meristemos terminales ha permitido la erradicación de otros patógenos, como viroides, micoplasmas, bacterias y hongos (Walkey, 1978; Murashige, 1980). Ahora es una práctica hortícola popular.

### **2.3.2.- Propagación a partir de yemas axilares procedentes de ápices o nudos**

Es el método más frecuentemente usado en la propagación *in vitro*. Se usan dos alternativas: i) el cultivo de ápices y ii) el cultivo de segmentos nodales. Ambos dependen de la estimulación del crecimiento de los brotes al eliminar la dominancia del meristemo apical del brote.

#### **2.3.2.1.- Cultivo de ápices**

Se utiliza mucho para la propagación comercial *in vitro*. El explante usado para iniciar estos cultivos es el ápice de un brote lateral o, en ocasiones, del principal, que suele tener 1-2 cm de longitud. Se elimina la dominancia del meristemo apical y se estimula el desarrollo de brotes axilares precoces, al incorporar reguladores de crecimiento (normalmente citoquininas) al medio nutritivo. El resultado es una miniplanta con un sistema de brotes muy ramificados. Para describir estos tipos de cultivos se utiliza el término cultivo de ápices, pero es sumamente importante distinguirlo del cultivo de meristemos. En el cultivo de meristemos el explante es mucho más pequeño (algunas micras) y su finalidad es, normalmente, la producción de una sola planta para sanearla y, posteriormente, clonarla.

Las ventajas que presentan los ápices de gran tamaño frente a los pequeños son:



- sobreviven mejor al ser implantados *in vitro*
- el crecimiento es más rápido
- contienen más yemas axilares

Sin embargo, los explantes más grandes presentan la dificultad de su descontaminación, y en la práctica el tamaño utilizado será el mayor que se pueda obtener en condiciones asépticas. Frecuentemente los cultivos de ápices también se inician indirectamente de brotes obtenidos del cultivo de meristemos.

En la mayoría de las plantas herbáceas los explantes derivan de yemas apicales o laterales de una planta intacta y constan del ápice meristemático con un tallo rudimentario que lleva varias hojas iniciales. En las axilas de estos primordios foliares se encuentran los meristemos de las yemas laterales. Los explantes se colocan normalmente en un medio semisólido para establecer el cultivo. No todos los brotes que aparecen en el llamado cultivo de ápices son originados por las yemas axilares. A menudo los brotes adventicios también aparecen directamente del brote cultivado o, indirectamente, del callo que se forma en la base del conjunto de brotes subcultivados, pero el origen preciso sólo se puede determinar en algunos casos tras un examen anatómico cuidadoso. Con frecuencia, la proporción de brotes adventicios puede controlarse a través de la aplicación de reguladores del crecimiento. Los brotes de origen axilar serán normalmente más estables genéticamente que los regenerados a partir del callo.

#### **2.3.2.2.- Cultivos de nudos**

El cultivo de segmentos nodales es otra técnica frecuentemente utilizada para la propagación de plantas a partir de yemas axilares. En este caso los explantes se desarrollan dando lugar a brotes no ramificados, que pueden alcanzar los 5-10 cm de longitud en la primera fase de desarrollo y que constan de varios entrenudos de pequeño tamaño. En la siguiente etapa se induce el desarrollo de brotes axilares mediante la adición en el medio de cultivo de reguladores de crecimiento que inhiben la dominancia apical y promueven la ruptura de las yemas laterales. Las yemas axilares formarán nuevos brotes no ramificados que se emplean para iniciar nuevos cultivos, o pueden desarrollarse como brotes enraizados para su trasplante al suelo.

El cultivo de segmentos nodales es válido para propagar especies que producen brotes largos en cultivo, especialmente en los casos en que sea difícil conseguir la ruptura de las yemas laterales mediante citoquininas. Hay menos probabilidades de que se formen callos asociados que en el cultivo de ápices y, por ello, hay menos riesgos de que aparezcan irregularidades genéticas. Dado que la tasa de multiplicación es menor que en el cultivo de ápices, es un método de aplicación limitada.

### **2.3.3.- Propagación de brotes adventicios**

#### **2.3.3.1.- Morfogénesis directa**

En este método de propagación *in vitro*, los brotes adventicios se forman directamente a partir de células del explante y no dan lugar a la formación de callo. Sin embargo, la formación directa de brotes puede estar acompañada por cierta proliferación celular de tipo desorganizado, y un tejido regenerativo, que podría clasificarse como callo, puede aparecer al final del proceso. Este tejido proliferativo no debe utilizarse en los subcultivos subsiguientes, y su formación puede reducirse ajustando los reguladores de crecimiento en el medio. En algunos casos, los reguladores de crecimiento que favorecen la iniciación de yemas no colaboran en su desarrollo ulterior. En estos casos, una masa compacta de primordios vegetales puede confundirse, por tanto, con un callo organizado.

La regeneración directa de brotes depende del órgano de la planta del que deriva el explante y sobre todo de la especie vegetal. En algunas especies, los brotes adventicios aparecen en tejidos de diferentes órganos (hojas, tallos, pétalos, y raíces), mientras que en otras sólo se da en determinados tejidos como hojas de bulbo, embriones o tejidos de semillas. La morfogénesis directa se desconoce en numerosos tipos de plantas.

#### **2.3.3.2.- Morfogénesis indirecta**

En este apartado consideraremos los callos dotados de capacidad para la formación de brotes aunque la regeneración de plantas a partir de callos se puede verificar también vía embriogénesis somática.

En la organogénesis a partir de callos es característico la formación de raíces y brotes de modo independiente, aunque este fenómeno también puede observarse en ciertas ocasiones

en cultivos de agregados celulares en suspensión. Como no se han formado directamente a partir del tejido original de la planta madre, se dice que los brotes se han regenerado indirectamente a partir de un callo desorganizado previo o en cultivo de células.

Los cultivos de callos varían en su potencial morfogénico. En callos de algunas plantas o de algunos tipos de explante, las técnicas y medios de cultivo que normalmente dan resultados en morfogénesis directa pueden ser inferiores para la producción de brotes, o pueden dar lugar sólo a la formación de raíces de las que no se regenerarán plantas. Esto no significa que no se puedan regenerar plantas de callos recalcitrantes bajo ninguna circunstancia, sino que simplemente hará falta emplear un medio diferente, cambiar el tipo de cultivo o ajustar el tipo o concentración de los reguladores de crecimiento. El ajuste adecuado de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo puede conllevar a la formación de brotes en los callos de un gran número de especies. En general, los brotes y raíces rudimentarias son más frecuentes en tejidos recién aislados y la capacidad morfogénica se va perdiendo gradualmente con el tiempo de cultivo. Sin embargo, algunos cultivos de callos mantienen su poder regenerativo durante largos periodos.

En la práctica la velocidad y eficiencia con que los brotes pueden regenerarse a partir de callos, depende de:

- el intervalo entre la puesta en cultivo y el comienzo de la morfogénesis.
- la frecuencia de iniciación y el número de yemas vegetativas
- la rapidez con la que aparecen los brotes cuando los callos son subcultivados.
- el número de subcultivos posibles sin pérdida del potencial morfogénico.
- el desarrollo de las yemas hasta la formación de brotes y la formación de brotes y la capacidad de enraizamiento de estos brotes.

#### **2.4.- Etapas de la propagación *in vitro***

Toshio Murashige, considerado como una de las figuras dominantes en el establecimiento de las técnicas de propagación a gran escala de plantas por cultivo de tejidos, describió los estadios que tienen lugar en el cultivo *in vitro* de la siguiente forma:

1. Fase I: establecimiento del explante
2. Fase II: fase de multiplicación

3. Fase III: fase de enraizamiento y preparación del explante para la posterior aclimatación

En cada estadio el material vegetal necesita unas condiciones físicas y químicas específicas, que son la base para el éxito. Este esquema de trabajo propuesto por Murashige ha sido utilizado por numerosos investigadores y casas comerciales.

Debergh y Maene (1981), modificaron este esquema en algunos aspectos para conseguir una finalidad más comercial. El nuevo esquema de trabajo sería:

1. Fase 0: preparación de las plantas madre bajo condiciones higiénicas
2. Fase I: establecimiento del cultivo aséptico
3. Fase II: inducción de los centros meristemáticos, desarrollo en brotes y su rápida propagación
4. Fase IIIa: elongación de los brotes y su preparación uniforme para el estadio IIIb
5. Fase IIIb: enraizamiento de los brotes producidos *in vitro* en condiciones *in vivo*

Este método permite una producción de plantas *in vitro* con un coste más reducido, junto a otras ventajas como la obtención de plantas más sanas, con mejor enraizamiento, etc. De todos modos, hay que buscar el esquema de producción más adecuado para cada especie.

## **2.5.- Ventajas del cultivo *in vitro***

Las principales ventajas del cultivo de tejidos vegetales son los siguientes:

- i) El cultivo se inicia con trozos muy pequeños de plantas que se propagan por pequeños brotes. Esto quiere decir que sólo se requiere una pequeña cantidad de espacio para mantener o multiplicar un gran número de plantas.
- ii) La propagación se realiza en condiciones asépticas. Una vez iniciados los cultivos, no hay pérdidas por enfermedades y las plantas obtenidas están libres de hongos, bacterias y otros organismos fitopatógenos.

- iii) Estos métodos son aprovechables para obtener plantas libres de virus. Trabajando con estas técnicas o partiendo de material libre de virus, pueden producirse plantas sanas garantizadas en gran número.
- iv) Es posible un mayor ajuste de los factores que influyen en la regeneración vegetativa, como los niveles de nutrientes y los reguladores de crecimiento, la luz y la temperatura. La tasa de multiplicación es, por tanto, mucho mayor que la obtenida por métodos más clásicos como el estaquillado. Se pueden obtener un gran número de plantas en un periodo de tiempo muy corto. Esto permite un aprovechamiento más rápido de variedades seleccionadas recientemente.
- v) Permite la producción de clones de algunas plantas que vegetativamente se propagan lentamente y con dificultad.
- vi) La producción es continua a lo largo de todo el año, independientemente de los cambios estacionales.
- vii) El material reproducido vegetativamente puede estar almacenado durante largos periodos.
- viii) Se precisa menos espacio en los invernaderos para el cultivo de planta madre que nos proporcione el material vegetal suficiente para su propagación en gran escala.

## **2.6.- Inconvenientes. Problemas relacionados con la propagación *in vitro***

### **2.6.1.- Contaminación**

La contaminación bacteriana es un problema continuo para los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, tanto de investigación como comerciales. La contaminación bacteriana es, a menudo, difícil de detectar. Plantas de apariencia sana pueden contener bacterias y algunos exudados de las plantas pueden hacer un efecto similar al generado por el crecimiento de las bacterias. Las plantas contaminadas, a veces, no presentan síntomas y, en ocasiones, pueden tener una tasa de multiplicación o de enraizamiento reducida o, incluso, morir. Las bacterias pueden estar presentes en las plantas madre, o pueden introducirse durante la manipulación (Maes et al., 1998).

Una de las principales ventajas de la propagación *in vitro* de plantas a gran escala frente a otros métodos de propagación clásicos es que ofrece la posibilidad de trabajar en condiciones asépticas y, por tanto, si los métodos de cultivo son los adecuados, se pueden propagar grandes cantidades de plantas en condiciones axénicas y libres de patógenos. Sin

embargo uno de los problemas que puede afectar en gran medida al éxito de cualquier proceso de propagación *in vitro* es la contaminación, que puede aparecer en cualquier momento y llevar al fracaso todos los logros que se habían alcanzado. Se pueden producir grandes pérdidas económicas debido a la aparición de contaminaciones en alguna de las etapas de que consta el proceso de propagación comercial *in vitro* de plantas ornamentales (Boxus y Terzi, 1987; Singha et al., 1987; Wainwright y England, 1987; Debergh y Vanderschaege, 1988; Enjalric et al., 1988; Leggatt et al., 1988; Leifert et al., 1989; Leiffert, 1990; Casells, 1991 y Leifert et al., 1991). Un nivel de pérdidas por contaminación de un 2% es el máximo admitido en cualquier proceso de propagación de plantas por cultivo *in vitro*. Este nivel no puede ser alcanzado sin la aplicación de un sistema de control estricto sobre las contaminaciones. En su trabajo, Leifert y Woodward (1998) sugieren el establecimiento del denominado HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) para el control de las contaminaciones en un laboratorio comercial. Según Leifert y Waites (1990) la lista de los organismos que contaminan los cultivos de tejidos vegetales incluyen virus, bacterias, levaduras, hongos, ácaros y trips (Blake, 1988; Enjalric et al., 1988; Leggatt et al., 1988; Leiffert et al., 1989 y Leiffert, 1990) La contaminación bacteriana es considerada la más importante y ha sido descrita extensamente en la literatura (Horsch y King, 1983; Knauss y Miller, 1978; Leifert et al. 1989; Leifert, 1990; Wainwright y England, 1987).

Pierik (1987) indica que hay 4 fuentes principales de infección:

- i) la planta (infección interna e infección externa/endógena o exógena)
- ii) el medio de cultivo (insuficientemente esterilizado)
- iii) el aire
- iv) la inadecuada manipulación de instrumentos y/o del material vegetal

El origen de la mayor parte de la contaminación está en la misma planta y el material vegetal debe estar perfectamente desinfectado antes del establecimiento *in vitro*. En algunas ocasiones la contaminación es aparente después de unos subcultivos: se produce un crecimiento pobre, las plantas muestran clorosis y, en ocasiones, los brotes no acaban de enraizar. Para estar seguros de que un cultivo está en condiciones axénicas se deben realizar ensayos en todas las etapas del proceso para asegurarnos de que no hay presencia de patógenos. Una de las contaminaciones de origen interno más conocidas es la producida por el *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*. Se manifiesta por un halo blanco alrededor de la base de los explantes, que

aparece, incluso después de algunos subcultivos de plantas aparentemente sanas. Las infecciones internas que pueden considerarse un problema son causadas por microorganismos presentes dentro de la misma planta y no pueden ser eliminadas por las clásicas desinfecciones superficiales a base de hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio, hipoclorito de calcio agua oxigenada y/o etanol.

Los hongos, las levaduras y muchas bacterias producen un crecimiento visible en el medio de cultivo y se detectan fácilmente durante las evaluaciones oculares rutinarias de los cultivos. No obstante, algunos contaminantes, especialmente las bacterias, no producen un crecimiento visible en la planta o en el medio de propagación, y son descritos usualmente como latentes o endógenas (George y Sherrington, 1984; Cassells, 1986; Fisse *et al.*; 1987; Leiffert, 1990). Algunas bacterias patógenas como *Corynebacterium sepedonicum* o *Xanthomonas pellargonii* permanecen latentes y no producen síntomas en las plantas huéspedes *in vitro* (Leiffert y Waites. 1990). El material vegetal infectado con estos patógenos pueden propagarse *in vitro* con el resultado de una distribución de la enfermedad (Cassells *et al.*, 1988; Deimling y Möllers, 1988).

Por todas estas razones, el personal responsable de la propagación *in vitro* de plantas debe ejercer un estricto control de calidad sobre su producción (Cassells, 1991; Cassells, 1990a). Los aspectos fitopatológicos del control de calidad son:

- 1.- Conocimiento previo del rango de posibles contaminantes del cultivo, incluyendo los patógenos específicos.
- 2.- Preparación adecuada de la planta donante (Debergh y Maene, 1981), que incluyen tratamientos para reducir o eliminar patógenos exógenos y endógenos.
- 3.- Confirmación del estado axénico (libre de contaminación) de los cultivos en las primeras etapas del cultivo *in vitro* (previamente a la propagación en gran escala), seguido del empleo de estrategias para obtener cultivos sanos basados en métodos de evaluación.
- 4.- Monitorización rigurosa de la producción para confirmar el estado axénico de los cultivos.
- 5.- Tener en cuenta que el espectro de los microorganismos contaminantes puede alterarse con el tiempo de cultivo. Esto es un reflejo en un cambio en el origen de la contaminación, desde

aquellos asociados con la planta madre a los que están asociados con el laboratorio, incluido el personal. (Leifert *et al.*, 1989).

6.- Monitorización de la progenie basándose en el muestreo de las plantas producidas. Esto puede llevarse a cabo en asociación con otros ensayos sobre la estabilidad genética de la población. Este paso es necesario porque, en ocasiones, los organismos latentes sólo pueden expresarse o detectarse en tejidos maduros de la descendencia.

Según Reed y Tranprasert (1995) y Leifert y Woodward (1998), los procedimientos para producir cultivos asépticos deben centrarse en los siguientes aspectos:

- 1.- Controlar y hacer un índice de los explantes y cultivo de los contaminantes.
- 2.- Identificación de la fuente de contaminación.
- 3.- Identificación y caracterización de los contaminantes.
- 4.- Eliminación de los organismos contaminantes con la mejora de las prácticas de cultivo, el uso de antibióticos y otros agentes químicos.

### **Fuentes y prevención de la contaminación**

Los orígenes de los cultivos contaminados son, normalmente, difíciles de determinar (Leifert y Waites, 1994). Las bacterias que contaminan los cultivos pueden proceder de los explantes, los alrededores, los operadores, o ser debidas a métodos de esterilización poco efectivos. Screiber *et al.* (1996) indicaron que el *Bacillus macerans* puede sobrevivir a una inmersión de las pinzas de disección en una solución de etanol al 95% durante algunas semanas e, incluso, a un posterior flameado. Se pueden eliminar mediante una esterilización a 121°C durante 21 minutos y una exposición a la llama proporcionada por un mechero Bunsen durante 6-8 segundos. Las bacterias están asociadas con las plantas como endófitas y epífitas (Sigee, 1993; Gunson y Spencer-Philips, 1994).

Los explantes tomados de plantas crecidas en el campo, de especímenes enfermos o de partes de plantas localizadas cerca o debajo del suelo pueden ser difíciles o imposibles de desinfectar debido a la presencia de estas bacterias (Leifert *et al.*, 1994). Así, los explantes de *Hevea brasiliensis* tomados de árboles maduros cultivados en el campo no pudieron establecerse *in vitro* debido a la alta tasa de contaminación (Seneviratne y Wijesecara, 1994).



De manera similar, el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Rehmania glutinosa* a partir de segmentos de raíces fue imposible debido a la sistemática contaminación interna (Paek *et al.*, 1995).

Los contaminantes que aparecen en las plantas cultivadas en invernadero son, principalmente, aquellos relacionados con el suelo (Buckley *et al.*, 1995) y pueden proceder del agua de irrigación (Seabrook y Farrell, 1993).

Las bacterias epífitas pueden estar localizadas en las estructuras de las plantas donde los desinfectantes no pueden llegar (Gunson y Spencer-Philips, 1994; Leifert *et al.*, 1994). Las bacterias endófitas pueden estar localizadas dentro de las plantas y en los espacios intercelulares del parénquima celular (Gunson y Spencer-Philips, 1994). Las contaminaciones observadas inmediatamente después del establecimiento de los explantes y que se repiten independientemente de la época del año en que se tomaron los explantes y que, además, muestran resistencia a distintas desinfecciones superficiales, son debidas, probablemente, a bacterias endófitas (Reed, *et al.* 1995).

En la tabla 18 se indica los contaminantes más habituales y sus posibles orígenes (Leifert y Woodward, 1998).

Debería considerarse cada paso del proceso del cultivo de tejidos a fin de prevenir la contaminación. Estos pasos incluyen el manejo del stock de plantas, el tipo y el manejo de los explantes, la preparación del medio, el subcultivo, la incubación y el almacenamiento de los frascos estériles de cultivo, el medio de cultivo y el cultivo de plantas. Leifert y Waites (1994) sugirieron que las plantas madres que se utilizan en el cultivo de tejidos deben ser cultivadas bajo condiciones protegidas (invernaderos, cámaras de crecimiento) para disminuir la población de organismos epífitos. La utilización de plantas cultivadas en los invernaderos mejora la iniciación de los cultivos *in vitro* y el tratamiento regular de las plantas con benomilo al 1% reduce la contaminación fúngica (Seneviratne *et al.*, 1995).

**Tabla 18.-** Contaminantes habituales y posibles fuentes de contaminación

Contaminante	Posible fuente de contaminación	Comentarios
<i>Bacteria</i>		
Gram negativos	Desinfección poco eficiente de los explantos	A menudo <i>Pseudomonas</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>
Gram positivos	Procedimientos poco efectivos en el laboratorio	
Cocos Gram positivos ( <i>Staphylococcus epidermis</i> )	Carencia de asepsia en: (i) el subcultivo de las plantas (ii) distribución del medio	<i>Staphylococcus</i> spp son considerados habitantes obligados de animales
<i>Bacillus</i> spp.	Deficiente esterilización del medio	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus pumilus</i>
	Esterilización deficiente de los instrumentos usados en el subcultivo	<i>Bacillus circulans</i> puede sobrevivir en etanol 70%
<i>Hongos/Levaduras</i>		
Aumento general de hongos	Infección de ácaros y trips	Falta de limpieza Especialmente cuando están afectadas las plantas en la cámara de cultivo
<i>Fusarium poe</i>	Infección de la cámara de cultivo con el ácaro <i>Sideroptes graminis</i>	El <i>Fusarium poe</i> forma un micelio blanco con una base rosada
mohos grises, negros y verdes ( <i>Botrytis</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Penicillium</i> spp.) <i>Rhodotolura</i> spp. (pink yeasts)	Alta contaminación en el laboratorio Fallos en las cabinas de flujo laminar	<i>Penicillium</i> y la levadura rosa son contaminantes del aire muy comunes en los edificios
moho negro	Poca higiene en las cámaras de cultivo y en el almacenamiento de la planta y del medio de cultivo	Se pueden ver manchas de mohos en las zonas húmedas de las paredes del laboratorio. Las esporas se transmiten por el aire.
<i>Cladosporium</i> spp.	Insuficiente protección del laboratorio contra el aire exterior	Las esporas de <i>Cladosporium</i> son comunes en el aire exterior.

Tomado de Leifert y Woodward (1998)

El precultivo de tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. en oscuridad y el aislamiento de los explantes a partir de tallos etiolados dio menor tasa de contaminación que el cultivo de explantos a partir de plantas cultivadas en invernaderos (Keller y Khan, 1997). Seabrook y Farrell (1993) mostraron que la irrigación de las plantas madres con agua filtrada da mejores resultados que si se riega con agua de la red. La época del año en que se recolectan los explantos también influye. Si se toman las yemas de *Abies fraseri* en abril se consigue una

menor contaminación que en verano (Bergmann *et al.*, 1997). El tratamiento de las plantas madres de *Protea repens* con captafol (Difolatan 1 g/l) o iprodione (Rovral Flo, 1 mg/l) redujo la tasa de contaminación durante el establecimiento *in vitro* desde el 90% en el control al 14% (Rugge y Brits, 1995). Shure *et al.* (1994) comprobaron que la fumigación o la incubación del material vegetal de *Vitis labruscana* cv. Concord redujo la incidencia de la contaminación de los explantes *in vitro*. Los desinfectantes caducados o diluidos pueden perder su fuerza y poder de desinfección y deben ser descartados. Sólo deben usarse mezclas recién preparadas para la desinfección de los explantes (Leifert *et al.*, 1994). Durante el subcultivo, se pueden reducir las contaminaciones controlando la limpieza del laboratorio y la fuente del aire y por un entrenamiento estricto de las operaciones en las cabinas de flujo laminar (Leifert *et al.*, 1994).

La identificación taxonómica de las bacterias proporciona información importante sobre los orígenes de las contaminaciones, el previsible grado de contaminación desde el origen y sobre cómo eliminar y prevenir los contaminantes (Leifert *et al.*, 1989; 1991).

### **Control de los cultivos**

La detección de los contaminantes bacterianos ha sido, tradicionalmente, fortuita. La inspección visual del medio en la base de la planta puede proporcionar alguna evidencia de procesos de contaminación, pero no es adecuada para las bacterias de crecimiento lento, las endófitas o aquellas bacterias que no crecen en el medio de cultivo (Seyring, 1988; Guna, 1997; Kane, 1995; Leifert *et al.*, 1989). Los métodos de "screening" pueden ser muy favorables para facilitar el crecimiento, en un medio de crecimiento adecuado, de bacterias u hongos y, por tanto, estos contaminantes pueden ser fácilmente detectados (Reed *et al.*, 1995). En la actualidad, existen procedimientos para identificar muchos contaminantes (Debergh y Vanderschaeghe, 1988; Leifert *et al.*, 1992; Viss *et al.*, 1991). Algunas bacterias, difíciles de cultivar, requieren medios especializados (Georghe and Falkinham, 1986; Gunson and Spencer-Philips, 1994), pero la mayor parte de los contaminantes más comunes pueden detectarse en dos o tres medios bacteriológicos comercialmente disponibles (Kane, 1995; Reed *et al.*, 1995). Algunos de los medios desarrollados específicamente para la detección de contaminantes en el cultivo de tejidos vegetales, por ejemplo el medio 523 (Viss *et al.*, 1991), el medio TT de detección de micobacterias (George y Falkinham 1986) y el medio para el test de esterilidad de Leifert y Waites (1994) están disponibles en algunas casas comerciales (Sigma-Aldrich Company Ltd., Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NH, UK).

## Identificación y caracterización

Los contaminantes pueden ser aislados usando métodos bacteriológicos estándar y caracterizados con tests bioquímicos tales como la tinción Gram, motilidad, oxidasa, hidrólisis del almidón, test de la gelatinasa y O/F (oxidación/ fermentación) (Tanprasert y Reed, 1998; Buckley *et al.*, 1995; Klement *et al.*, 1990). Las pruebas tradicionales de identificación de bacterias requieren mucho trabajo y tiempo, pero pueden llevarse a cabo en el laboratorio con reactivos químicos comunes.

En la actualidad hay técnicas disponibles que proporcionan resultados en 24-48 h. El sistema Biolog (Biolog Inc. 3938 Trust Way, Hayward CA 94545, USA) sólo requiere la tinción Gram de los aislados. Los resultados se comparan con una base de datos de bacterias Gram negativas y positivas, levaduras y bacterias lácticas (Bouzar *et al.*, 1995; Hildebrandt *et al.*, 1993; Jones *et al.* 1993). El sistema de identificación API (bioMérieux sa, 69280 Marcy-l'Etoile, France) es también un test que se basa en la utilización de una fuente de carbono, aunque está ligado a la detección visual de las bacterias (Cassells, AC y Tahmatsidou, V., 1996; Leifert *et al.*, 1989; Verniere *et al.*, 1993). El Análisis de los Perfiles de los Ácidos Grasos empareja o equipara los ésteres metilados de los ácidos grasos con los de los organismos conocidos (Cassells y Tahmatsidou, 1996; Buckley *et al.*, 1995; Chase *et al.*, 1992; Stead *et al.*, 1992). Los métodos basados en la huella genética, ofrecen una amplia gama de posibilidades (RFLPs, PCR, RAPDs, AFLPs, etc) para la identificación de bacterias contaminantes (Klijn *et al.*, 1991; Kamoun *et al.*, 1998; Maes *et al.*, 1998; Mantell, 1998; Reeves, 1998; Stead *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 1998). La utilidad de estos sistemas depende de la información previa que hay en la base de datos. Muchas bacterias de las plantas y del suelo no han sido descritas ni mucho menos caracterizadas, lo que hace que, en ocasiones, todos estos sistemas no sean muy útiles. En todo caso, el uso de más de un test de identificación aumentará la probabilidad de que se identifiquen las bacterias presentes.

En la actualidad hay muchos tests<sup>3</sup> serológicos disponibles en forma de kit para un amplio rango de diferentes virus y bacterias patógenas específicas de plantas (*Xanthomonas pelargonii*, *Clavibacter michiganense*, *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia amylovora*, distintas cepas de *Erwinia syringae* y *Xanthomonas campestris* y *Erwinia carotovora* pv. *Atroseptica*) que pueden estar en formas latente *in vitro* (Anonymous (1995); Torrance (1998) y

---

<sup>3</sup> Adgen Plant Disease Diagnostics, Watson Peat Building, Auchincruive. Ayr KA6 5 HW, Scotland UK.;

Knapp *et al.* (1998)). Estos tests pueden ser muy sensibles, pero son caros y sólo detectan una especie de bacteria o virus (Leifert y Woodward, 1998).

### Tratamientos con antibióticos

La contaminación de bacterias endógenas es un problema muy importante en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y como no pueden ser eliminadas con ninguna técnica de desinfección superficial, para su eliminación se requiere el tratamiento con antibióticos (Mathias *et al.*, 1987). Los antibióticos ideales deben ser solubles, estables, que no les afecten las variaciones del pH, que no les afecte el medio, que no presenten efectos secundarios, deben tener un amplio espectro bactericida, conviene que puedan utilizarse en combinación, que no induzcan resistencias, que no sean caros y que sean inocuos para la salud humana (Falkiner, 1990; 1988). El uso continuado de antibióticos puede dar lugar a resistencias en las bacterias.

Es muy importante comprobar que el antibiótico tenga un efecto bactericida y no bacteriostático, como ocurre en la mayoría de los casos. La elección de un antibiótico depende del tipo de bacteria presente. Para tratar cultivos de tejidos vegetales se han utilizado regularmente la carbenicilina, cefalotina, cefotaxima, gentamicina, polymixina, rifampicina, estreptomina, timentina, etc, a distintas concentraciones (Buckley, *et al.*, 1995; Falkiner, 1988; Kneifel y Leonhardt, 1992). El uso de rifampicina (50-250 mg/l) y cefotaxima (250-1500 mg/l) tuvieron una acción bactericida contra muchas bacterias aisladas de cultivos de meristemas del pie de manzano YP (Savela y Uosukaien, 1994). La contaminación en cultivo *in vitro* de ápices de *Artemisa absinthium* L. disminuyó al añadir al principio del cultivo, en el medio basal, sulfato de estreptomina (Nin *et al.*, 1994). Se pudo controlar el crecimiento bacteriano en el cultivo *in vitro* de *Hydrangea hortensis* mediante la adición al medio de cultivo de 10 mg/l de amycacina (Bistrichanov *et al.*, 1997). La adición de 0,5 % de cloramfenicol en el medio de cultivo utilizado para el crecimiento *in vitro* de granos de trigo, previno la contaminación de la solución y no tuvo ningún efecto adverso en el desarrollo del grano (Arora, 1996)

La combinación de antibioticos puede ser ventajosa en el caso de que se produzca una acción sinérgica, pero a veces, son incompatibles y disminuyen los efectos positivos que tienen cuando se formulan en solitario (Falkiner, 1988; Kneifel and Leonhardt, 1992; Leifert *et al.*,

1991). Barrett y Cassells (1994) demuestran que la actividad de los antibióticos se reduce en el cultivo de tejidos vegetales y destaca la importancia de determinar la concentración mínima bactericida (MBC) con el fin de disminuir el efecto fitotóxico de los antibióticos añadidos al medio de cultivo.

Maes *et al.* (1998) indicaron que la contaminación bacteriana en el cultivo de tejidos está, a menudo, enmascarada por el tratamiento con mezclas o combinaciones de antibióticos. No obstante, la eficacia de estos tratamientos es variable. Puede inducir una bacteriostasis periódica, en la que la expresión y el crecimiento excesivo de la población bacteriana se pospone a una etapa posterior de la propagación *in vitro*.

## 2.6.2.- Hiperhidratación

Durante el cultivo *in vitro* de numerosas especies, tanto leñosas como herbáceas, aparece, a veces, un proceso fisiológico denominado hiperhidratación. Según Debergh *et al.* (1992) los síntomas que caracterizan la hiperhidricidad no son idénticos en todas las plantas. El desarrollo de los síntomas morfológicos de la hiperhidricidad dependen de múltiples factores y van apareciendo a lo largo del tiempo. Se puede asumir que tan pronto un explante se pone en cultivo aparecen los primeros cambios en su anatomía, morfología y fisiología. En condiciones estándar, los brotes y las hojas formadas *de novo* durante el cultivo *in vitro* tienen una anatomía diferente a los brotes y hojas que se desarrollan *ex vitro* y, en consecuencia, la fisiología de estos órganos puede ser también diferente. Los síntomas visuales (hojas hiperhídricas) ocurren sólo después de que haya transcurrido cierto periodo de tiempo y bajo determinadas condiciones de cultivo. Estos síntomas se pueden evitar mediante el control de la composición del medio de cultivo, las condiciones ambientales en las que se encuentran los recipientes de cultivo, y la calidad de los explantes cultivados.

A continuación se enumeran algunas de las características morfológicas, anatómicas y algunos marcadores bioquímicos de los brotes o plántulas hiperhidratadas. Esta lista es una modificación ampliada de la que se realizó después de un acuerdo general en el *workshoop* sobre vitrificación que tuvo lugar durante el congreso de la IAPTC en Amsterdam en 1990.

### Características morfológicas

Los brotes tienen, a menudo, internudos más cortos y en roseta. El diámetro del tallo puede ser mayor o menor. Las hojas son estrechas, elongadas, arrugadas y/o rizadas, quebradizas, translúcidas (Debergh *et al.* 1981; Kim y Byun 1988; Babber *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1993), con una superficie reducida o hipertrofiada. El color puede ser anormal (Letouzé y Daguin, 1983). La iniciación de raíces adventicias en los brotes es usualmente difícil. La pérdida de la actividad en el ápice induce la mayor ramificación en las plantas hiperhídricas (Werker y Leshem, 1987)

### Características anatómicas

Los tallos exhiben hipertrofia del parénquima cortical, espacios intercelulares grandes, hipolignificación del sistema vascular (Beauchesne, 1981; Kevers y Gaspar, 1985) y un sistema vascular reducido y/o anormal (Letouze y Daguin, 1983, 1987). Las hojas tienen un número reducido de capas celulares en empalizada (Brained *et al.*, 1981), espacios intercelulares grandes en las células del mesófilo (Paques y Boxus, 1987) y un tejido epidérmico defectuoso, que incluye una menor superficie de cera o con una estructura cristalina diferente (Earle y Laughans, 1975; Sutter y Laughans, 1982), una estrecha cutícula con un nivel más bajo de cutina, pectina y celulosa y, en algunas especies hay más presencia de hidatodos (Capellades *et al.* 1990). Los estomas pueden ser más o menos abundantes y no funcionan adecuadamente, debido probablemente a un aumento de callosa, en lugar de celulosa, en las paredes de las células guarda (Ziv y Ariel, 1988). Las plantas normales contienen un 80% de estomas normales mientras que las plantas hiperhidratadas sólo contienen un 7%. La deformación de las células guarda parece ser la causa del impedimento mecánico de la función estomatal (Miguens *et al.*, 1993) Los cloroplastos tienen una organización anormal en grana y estroma (Wetzstein y Sammer, 1982) y pueden tener un menor contenido en clorofila (Kim y Byung, 1988; Reuter, 1988)). La conexión vascular entre las raíces y los tallos puede ser defectuosa (Grout y Aston, 1977). Se produce una reducción acropétala en el periodo del tiempo, durante el cual las células que se encuentran en las zonas en desarrollo mantienen las características de meristemo (Werker y Leshem, 1987). Las hojas hídricas tienen un menor número de cloroplastos y la tasa de fotosíntesis del tejido hiperhídrico es menor que en el material vegetal normal (Jones *et al.*, 1993).

### Características biológicas

Para evaluar el papel que juegan diferentes enzimas y elementos minerales en el desarrollo de la hiperhidricidad se ha realizado un trabajo considerable, aunque no se ha llegado todavía a ninguna conclusión. En general las hojas y brotes hiperhídricos contienen menos lignina y celulosa y la actividad de varios enzimas varía con respecto a los tejidos normales (Gaspar *et al.* 1987). Tal y como era de esperar a partir de su apariencia morfológica, los brotes y hojas hiperhídrico tienen un menor peso seco y un mayor contenido en agua. En sus trabajos de investigación, Franck *et al.*, (1995) demostraron que la actividad del superóxido dismutasa fue mayor en los brotes hiperhídricos, mientras que la de los otros enzimas estudiados (guayacol peroxidasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, mono y dehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa) mostraron una actividad más reducida. La vitrificación es



considerada a menudo, como una respuesta morfológica a algún tipo de estrés. Al contrario que la mayoría de las plantas, que se adaptan a las situaciones de estrés aumentando los enzimas de defensa arriba citados, los brotes cultivados *in vitro* en condiciones hiperhídricas no parecen ser capaces de reaccionar de manera similar.

Se han citado diversos factores como responsables de la hiperhidricidad. No obstante, muchos de estos factores pueden sólo inducir o contribuyen a este fenómeno cuando otras condiciones en el sistema de cultivo (medio, contenedor, ambiente y explante) no están optimizadas. Por ejemplo, la BAP inducirá la hiperhidratación cuando los cultivos están estresados por otros factores, tales como una alta capacidad de retención de agua en el espacio superior del contenedor (Debergh, 1983). Hasta la fecha, la mayor parte de los diseños experimentales no siempre permiten claras distinciones entre el factor que evoca la hiperhidricidad y el que predispone a esta condición.

Según Debergh *et al.* (1992), los factores que influyen en la inducción y el control de la hiperhidricidad pueden considerarse bajo las categorías del explante, del medio, el contenedor y el entorno.

La consistencia del medio está relacionada con la concentración y el tipo de agente gelificante (Debergh, 1983; Debergh *et al.*, 1981; Pasqualetto *et al.*, 1988; Ziv *et al.*, 1983; Pierk *et al.*, 1988; Brand, 1993; Jacq *et al.*, 1993; Curtis *et al.*, 1996; Marga *et al.*, 1997). La presencia de una capa líquida sobre el medio gelificado (Leshem *et al.* 1988), la concentración de sales, la composición y la presencia de ciertos elementos minerales en abundancia (Letouzé y Daguin, 1983; Pasqualetto *et al.*, 1988; Vieitez *et al.*, 1988; Brand, 1993; Bouza *et al.*, 1992; Han *et al.*, 1993; Ponchia y Tonon, 1993) se han relacionado también con el desarrollo de la hiperhidricidad.

También influye en gran medida la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento que se usan para el cultivo *in vitro* de los explantos (Debergh, 1983; Bornman y Vogelmann, 1984; Alderson *et al.*, 1987; Leshem *et al.*, 1988; Ziv, 1989; Gribaudo y Fronda, 1991; Bouda *et al.*, 1994; Abd Karim *et al.*, 1992; Kataoka *et al.*, 1992; Lindgren y McCown, 1992; Bouza *et al.*, 1992; Smith, 1992; Ziv *et al.*, 1992; Hosoki y Tahara, 1993; Caboni *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996), así como de los compuestos orgánicos que se introducen en el medio (Ziv *et al.*, 1983; Langford y Wainwright, 1988; Druart, 1988; Zimmerman y Cobb, 1989; Druart, 1995; Gruselle *et al.*, 1995; Mondal *et al.*, 1993)

Los materiales con los que están contruidos los recipiente de cultivo y las tapas pueden afectar el intercambio gaseoso y, por tanto, influir en las concentraciones del vapor de agua (Dillen y Buysens, 1989; Hauser *et al.*, 1995; Cassells y Walsh, 1994, Lakshmanan *et al.*, 1997), del dióxido de carbono y etileno en el interior del contenedor (De Proft *et al.*, 1985). El volumen de aire en relación con el volumen del medio y con el número de explantos puede influir también en la concentración y la composición de la atmósfera que rodea las plantas en el interior de los recipientes de cultivo (Lauzery y Vieth, 1990).

Los ambientes interno y externo están interrelacionados, aunque pueden ser bastante diferentes. De todos modos es imposible separarlos entre sí. La temperatura, la intensidad y la calidad luminosa, el movimiento del aire y la humedad relativa que envuelve el contenedor pueden influir en el crecimiento de las plantas *in vitro* (Boxus *et al.*, 1978; Waadle y Short, 1983; Maene y Debergh, 1987; Vanderschaeye y Debergh, 1987; Ritchie *et al.*, 1991; Kataeva, 1991; Bouza *et al.*, 1992). Los gradientes de temperatura en los contenedores pueden afectar el crecimiento directa o indirectamente, por ejemplo influyendo en la humedad relativa en el contenedor (Brainerd y Fuchigami, 1981; Short *et al.* 1987). También puede tener influencia la posición del contenedor en la estantería.

La susceptibilidad a la hiperhidricidad varía con la especie, el cultivar, la longitud del tiempo desde el último subcultivo y el tiempo desde que se estableció el cultivo (número de subcultivos), el modo en que se cortó el explante, la situación en el medio, la distancia del órgano o del tejido a la superficie del medio de cultivo. También debe tenerse en cuenta el daño que se produce durante la desinfección.

Se han utilizado diferentes técnicas para el control de la hiperhidricidad. Estas técnicas están relacionadas con los mismos factores que la inducen. Algunos de los remedios y antídotos para controlar la hiperhidricidad se enumeran en la tabla 19.

**Tabla 19.-** Algunos efectos de las condiciones de cultivo en la hiperhidratación en las plantas cultivadas *in vitro*

APARICIÓN DE LA VITRIFICACIÓN	PLANTA	TRATAMIENTO PARA REDUCCIÓN O ELIMINACIÓN	REFERENCIA
<u>medio de cultivo</u>			
Difco Bacto Agar 0,6%	<i>Cynara scolymus</i>	Difco Bacto Agar 1,1%	Debergh <i>et al.</i> , 1981
Difco Bacto Agar 0,6%	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Difco Bacto Agar 1,2%	Hakkaart y Versluys, 1983
Tipo de sellado: parafilm, aluminio		Tipo de sellado: algodón, madera y tapones metálicos	
Bacto Agar 0,8%, 54-65% hiperhídricos	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Bacto Agar 1,2%, 23-30% hiperhídricos	Leshem, 1983
Agar 0,7%	<i>Prunus amygdalis</i>	Agar 0,9%	Rugini y Verma, 1983
Líquido, 89% hiperhídricos	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Agar 1%, 46% hiperhídricos; 1,5%, 28% hiperhídricos Agar 1%+desecante: 37% hiperhídricos Agar 1,5%+desecante: 4% hiperhídricos.	Ziv <i>et al.</i> , 1983
Agar Difco 0,25 %	<i>Prunus avium</i>	Agar Difco 0.25%+8 g de pectina	Zucherelli, 1979
Gelrite	<i>Malus domestica</i>	Bacto Agar	Pasqualetto <i>et al.</i> , 1988
-	<i>Prunus amygdalus</i>	Aumentar los niveles de Gelrite	Rugini <i>et al.</i> , 1987
Agar 0,7%	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Agar 1,5%	Kim <i>et al.</i> , 1988
Medio líquido	<i>Alstroemeria spp.</i>	Difco Bacto Agar 0,7%	Pierik <i>et al.</i> , 1988
-	<i>Petunia hybrida</i>	Concentraciones altas de Gelrite	Zimmerman y Cobb, 1989
Medio líquido	<i>Populus spp.</i>	Medio agarizado	Rutledge y Douglas, 1988
Varias concentraciones de agar	<i>Amelanchier arborea</i>	Aumentar las concentraciones de agar	Brand, 1993
Agar 0,8%	papaya	Agar 1,2%	Kataoka <i>et al.</i> , 1992
Medio líquido	<i>Actinida deliciosa</i>	Medio agarizado	Feito <i>et al.</i> , 1994
Medio gelificado con Gelrite	<i>Cephaslotaxus harringtonia</i>	Medio gelificado con agar	Wickremesinhe y Arteca, 1993
APARICIÓN DE LA VITRIFICACIÓN	PLANTA	TRATAMIENTO PARA REDUCCIÓN O ELIMINACIÓN	REFERENCIA
-	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Medio con 3g/l de Bacto-Peptona	Sato <i>et al.</i> , 1993
-	<i>Beta vulgaris</i>	Aumentando la concentración de agar	Jacq <i>et al.</i> , 1993
Agar con un bajo contenido en Ca y Mg	<i>Malus spp.</i>	Cambiando el tipo de agar	Orlikowska y Olszewski, 1993
Medio líquido	<i>Malus pumila cv. M26</i>	Agar hidrolizado de Difco a 0,7%	Marga <i>et al.</i> , 1997
-	<i>Origanum vulgare</i>	Elevando el contenido en agar (Phytigel)	Curtis <i>et al.</i> , 1996

Compuestos orgánicos

-	<i>Dyanthus caryophyllus</i>	Elevando la sacarosa	Ziv <i>et al.</i> , 1983
10g/l de sacarosa	cultivares de Rosa	30-40g/l de sacarosa	Langford y Wainwright, 1988
-	especies leñosas	Galactosa (1-2%)	Druart, 1988
-	<i>Petunia hybrida</i>	Disminución de la concentración de sacarosa	Zimmerman y Cobb, 1989
Fructosa	<i>Prunus glandulosa</i>	Sacarosa	Druart, 1995
15g/l de sacarosa, glucosa y fructosa	<i>Juglans regia</i>	30g/l de sacarosa, glucosa y fructosa	Gruselle <i>et al.</i> , 1995
Bajo contenido en sacarosa	<i>Carica papaya</i>	Alto contenido en sacarosa	Mondal <i>et al.</i> , 1993
<u>Compuestos inorgánicos</u>			
Macroelementos de MS	<i>Salix babylonica</i>	Disminuir el contenido en $\text{NH}_4^+$	Letouze y Daguin, 1983
Macroelementos de MS	<i>Dianthus caryophyllus</i>	3 mM $\text{Ca}^{++}$ +1/2 minerales de MS	Ziv <i>et al.</i> , 1987
Sales minerales de MS	<i>Castanea sativa</i>	Rebajando los niveles totales en N y la relación $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	Piagnani y Eccher, 1988
-	<i>Castanea sativa</i>	Aumentar la relación C/N	Vieitez <i>et al.</i> , 1988
Alta concentración de nitrato de amonio	<i>Phoenix dactylifera</i>	Baja concentración de nitrato de amonio	Bougerfaoui y Zaid, 1993
Sales minerales de MS	<i>Amelanchier arborea</i>	Sales minerales WP	Brand, 1993
Sales minerales de MS	<i>Prunus tenella</i>	Sales minerales de Lepoivre	Bouza <i>et al.</i> , 1992
-	cultivares de ajo	Aumentar la relación $\text{KNO}_3 : \text{NH}_4\text{Cl}$	Nagakubo <i>et al.</i> , 1993
-	<i>Gypsophylla</i> sp.	Aumentando la relación nitrato:amonio	Han <i>et al.</i> , 1993
Sales minerales de MS	<i>Juglans sp.</i>	Sales minerales de DKW	Ponchia y Tonon, 1993
Sales minerales de MS	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Disminuyendo el nitrato amónico y el nitrato potásico	Choudhary <i>et al.</i> , 1993
		Doblando o disminuyendo a la mitad el $\text{CaCl}_2$	
<u>Reguladores de crecimiento</u>			
	<i>Cynara scolymus</i>	Baja disponibilidad de BAP o Kinetina en medios muy agarizados	Debergh, 1983
	<i>Malus domestica</i>	Aumento de BAP más 3 mM de $\text{MgSO}_4$	Orlikowska, 1987
	<i>Picea abies</i>	Un tratamiento corto + 1,0% de agar	Bornman y Vogelmann, 1984

APARICIÓN DE LA VITRIFICACIÓN	PLANTA	TRATAMIENTO PARA REDUCCIÓN O ELIMINACIÓN	REFERENCIA
5 mg/l de BAP	melocotonero	1,4-2,8 mg/l de BAP	Chiariotti y Antonelli, 1988
BAP a más de 1 mg/l	<i>Prunus tenella</i>	BAP a menos de 1mg/l	Alderson <i>et al.</i> , 1987
presencia de citiokininas	<i>Cucumis melo</i>	ausencia de citiokininas	Lashem <i>et al.</i> , 1988
NAA 1 mg/l	clavel	BAP 0,5 mg/l	Lashem <i>et al.</i> , 1988
	<i>Gladiolus grandiflorus</i>	Ancymidol y/o paclobutrazol	Ziv, 1989

exceso de citokininas	<i>Gerbera jamesoni</i>		Kataeva <i>et al.</i> , 1991
4 mg/l de BAP	manzano NM-111	2 mg/l de BAP	Arellano <i>et al.</i> , 1991
1-10 $\mu$ M de Thidiazuron	vid cv. Barbera	0,1 $\mu$ M de Thidiazuron	Gribaudo y Fronda, 1991
BAP $\otimes$ 0,4 mM	<i>Paeonia suffruticosa</i>		Bouza <i>et al.</i> , 1994
BAP	<i>Cineraria chinensis</i>	0,1 mg/l de kinetina	Abd Karim <i>et al.</i> , 1992
3 mg/l de 2iP	Papaya	0,5 mg/l de 2iP	Kataoka <i>et al.</i> , 1992
10 $\mu$ M de BAP	<i>Pestemon digitalis</i> cv. Husker Red	1 $\mu$ M de BAP	Lindgren y McCown, 1992
2 $\mu$ M BAP	<i>Prunus tenella</i> Batsch. cv. "Firehill"	Eliminación de BAP	Bouza <i>et al.</i> , 1992
BAP	<i>Stirlingia latifolia</i>	2iP	Bunn y Dixon, 1992
10 $\mu$ M de BAP	<i>Dasyogon hookeri</i> J. Drumm	1 $\mu$ M de BAP	Bunn y Dixon, 1992
$\otimes$ 4,44 $\mu$ M de BAP	<i>Silene polypetala</i> X <i>S. virginica</i>	$\otimes$ 4,44 $\mu$ M de BAP	Ault, 1992
	<i>Vitis vinifera</i>	Paclobutrazol	Smith, 1992
Medio líquido	<i>Gladiolus</i> y <i>Philodendron</i>	2,8 $\mu$ M ancymidol o 3,4 $\mu$ M paclobutrazol	Ziv <i>et al.</i> , 1992
0,1 mg/l de BAP	<i>Salvia leucantha</i>	1 mg/l de BAP	Hosoki y Tahara, 1993
	manzano "Jork 9"	2,7 $\mu$ M NAA y 0,1 $\mu$ M Thidiazuron	Caboni <i>et al.</i> , 1996
NAA y IAA	Algodón	Kinetina + IAA en combinación	Zhang <i>et al.</i> , 1996
<u>Humedad relativa</u>			
	<i>Chrysanthemum</i>	Baja humedad relativa	Wardle y Short, 1983
	<i>Nephrolepis exaltata</i>	70-80% de humedad relativa	Ziv, 1986
	<i>Cordyline terminalis</i>	Baja humedad relativa en el interior del contenedor	Maene y Debergh, 1987
100 % de humedad relativa	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	81% de humedad relativa	Ritchie <i>et al.</i> , 1991
Humedad relativa alta y exceso de citoquininas	<i>Gerbera jamesonii</i>		Kataeva, 1991
85 % de humedad relativa	<i>Prunus tenella</i>	45% de humedad relativa	Bouza <i>et al.</i> , 1992
<u>Condiciones ambientales</u>			
	<i>Malus</i> sp.	Temperaturas de 3-4°C	Boxus <i>et al.</i> , 1978
APARICIÓN DE LA VITRIFICACIÓN	PLANTA	TRATAMIENTO PARA REDUCCIÓN O ELIMINACIÓN	REFERENCIA
		Enfriando el estante del contenedor	Vanderschaeghe y Debergh, 1987
	<i>Cordyline terminalis</i>	Alta iluminación	Maene y Debergh, 1987
Tapones de vidrio	<i>Pelargonium grandiflorum</i>	Tapones de algodón	Hauser <i>et al.</i> , 1995
	<i>Diantus caryophyllus</i>	Buena transmisión del vapor de agua del contenedor el exterior	Cassells y Walsh, 1994

---

	<i>Ixora coccinea</i>	Sellas los recipientes de cultivo con Neoflon PFA film	Lakshmanan <i>et al.</i> , 1997
<u>Varios</u>			
	<i>Gladiolus grandiflora</i>	Polimero K	Ziv, 1989
	<i>Brassica oleraceae</i>	Polietilenglicol	Short <i>et al.</i> , 1987
	<i>Prunus sp.</i>	Pectinas	Zucherelli, 1979
medio líquido	manzano M-26	Adición de 500 mg/l de glutatión reducida	Standardi y Micheli, 1988
estrés de los explantes durante la desinfección superficial	<i>Prunus tenella</i> cv. Firehill		Alderson <i>et al.</i> , 1987
	<i>Cynara scolymus</i> L., cv. Green Globe	Evitar al máximo el contacto de los explantes con el medio de cultivo	Lauzer y Vieth, 1990
MS + Phloroglucinol	<i>Prunus padus</i> L.	MS - Phloroglucinol	Hammatt, 1993
	<i>Beta vulgaris</i> L.	Ploridzin	Jacq <i>et al.</i> , 1993
Medio líquido en celulosa	fresa	EM1 o EM2 a 5g/l	Hdidier y Desjardins, 1993
	<i>Origanum vulgare</i>	Polisacárido extracelular extraído de <i>Pseudomonas</i>	Shetty <i>et al.</i> , 1996
		Interacciones de diferentes cepas de <i>Pseudomonas</i> con la planta y el medio de cultivo	Shetty <i>et al.</i> , 1996
89-97% plantas hídricas	<i>Origanum vulgare</i>	0% de plantas hiperhídricas con planta infectada con <i>Pseudomonas</i> spp.	Shetty <i>et al.</i> , 1995

---

### 2.6.3.- Oxidación polifenólica (*browning*)

Un problema grave que puede aparecer en el cultivo *in vitro* de algunas especies vegetales es la oxidación de sustancias fenólicas que son liberadas al medio desde la superficie de corte del explante. Estas sustancias, al oxidarse, vuelven el medio de color pardo oscuro y pueden llegar a ser tóxicas para el tejido. A veces, al poco tiempo de estar instalados *in vitro*, los explantes se vuelven marrones y, en ocasiones, detienen su crecimiento y mueren. Esta inhibición del crecimiento es más severa en especies que contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, pero los tejidos jóvenes son menos propensos al pardeamiento que los adultos. Un factor adicional que puede influir en la extensión del pardeamiento es la época del año en la que se ha obtenida el explante.

Según George y Sherrington (1984), el pardeamiento del tejido se produce por la acción de los enzimas oxidadas, como las polifeniloxidasas y tirosinasas, que son liberadas o sintetizadas y se presentan en condiciones oxidativas cuando el tejido es herido. Normalmente,

los enzimas y los sustratos se encuentran en diferentes compartimentos dentro de la célula pero se acumulan alrededor del explante cuando se destruyen o rompen las células como resultado de la disección de los tejidos. Los fenoles tienen una importante función natural regulando la oxidación del ácido indolacético. La toxicidad de los fenoles se debe, principalmente al enlace reversible por puentes de hidrógeno a las proteínas.

Con frecuencia, el establecimiento *in vitro* de los explantes requiere procedimientos especiales para intentar evitar los problemas asociados con la exudación. En muchas especies (especialmente en las plantas leñosas), el medio se torna oscuro al cabo de unos minutos, unas horas o unos días después de la transferencia inicial de los explantes. A menudo, si el cultivo no está suficientemente atendido, se produce un ennegrecimiento total de los explantos. A pesar de que estos exudados no se han caracterizado químicamente la gente se refiere a ellos como taninos o polifenoles oxidados. Una cuestión muy interesante es saber si la exudación es una causa o un efecto (o ambos) del estrés que sufre el explante al ser implantado *in vitro*.

La biosíntesis de los compuestos fenólicos es compleja y no está explicada completamente. Los fenoles vegetales son sintetizados, en parte, a través de la ruta del ácido shikímico, y están presentes en cantidades abundantes en las plantas. La lignina es un buen ejemplo de la ubicuidad de los compuestos fenólicos en el reino vegetal.

Químicamente, los compuestos fenólicos de las plantas son extremadamente heterogéneos y pueden ser desde simples monómeros hasta grandes polímeros. Según Loomis y Bataille (1966), la mayor parte de los compuestos fenólicos pertenecen a uno u otro de los siguientes grupos bioquímicos: 1) Compuestos flavonoides (incluidos los taninos condensados); y 2) El grupo de compuestos en los que el carbono 6 del anillo tiene una cadena de 1 o 3 átomos de carbono, y sus derivados (ácido cafeico, ácido gálico, taninos hidrolizables, tirosina y lignina).

Los compuestos fenólicos se pueden encontrar en el citoplasma, en las vacuolas, en las paredes celulares o dispersos en el tejido en células especializadas denominadas idioblastos. Tienen mucha importancia en las plantas. Pueden combinarse con las proteínas de forma reversible mediante un puente de hidrógeno o irreversiblemente por oxidación. Cuando los fenoles se oxidan forman unos compuestos denominados quinonas.

Los compuestos fenólicos intervienen en la compartimentación en plantas leñosas. La compartimentación es un proceso en el que las plantas sellan el tejido dañado mediante el establecimiento de barreras químicas o paredes para defenderse contra la infección. Se produce una acumulación de fenoles simples (como por ejemplo el ácido clorogénico), o compuestos poliméricos tales como la lignina (Rhodes y Wooltotron, 1978).

Muchas plantas son ricas en compuestos polifenólicos que se consideran como agentes inhibidores. Además de los polifenoles, las plantas pueden contener otros compuestos inhibidores, como son: coumarinas, terpenoides y esteroides. Estos agentes inhibidores tienen varios efectos fitotóxicos resultando en enanismo o incluso la muerte.

Los tejidos son heridos durante la escisión de los explantes a partir de la planta madre. A menudo, esto causa la liberación de ciertos compuestos que se oxidan en contacto con el aire (Robinson, 1983) por acción de las peroxidasas o de las polifenoloxidasas (Hu y Wang, 1982; Mayer y Harel, 1979; Vaugh y Duke, 1984). Como consecuencia, el tejido se vuelve de color pardo o negro, resultando también en un oscurecimiento del medio. Cuando las plantas se hieren en la preparación del explante, los compuestos fenólicos localizados en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastos (que contienen polifenoloxidasas) y aparece la típica pigmentación oscura asociada con la oxidación de los compuestos polifenólicos. Estos compuestos oxidados pueden inhibir la actividad enzimática y, en ocasiones, llegan a ser letales para el desarrollo de las plantas.

Anderson (1975) observó que las porciones de brotes de rododendron que estaban en contacto con el medio de cultivo se volvían marrones rápidamente. El oscurecimiento avanzaba progresivamente a lo largo del tallo y, al final, el explante moría. Lloyd y McCown (1980) observaron explantes muertos y una exudación oscura en el medio después de dividir y subcultivar brotes basales de *Kalmia latifolia* L. Christiansen y Fønnesbech (1975) describieron que el oscurecimiento del medio solidificado con agar dió como resultado la muerte de los brotes de *Hammelis X intermedia* Rehd. Estos autores midieron la “intensidad del oscurecimiento (browning)” como el producto de la anchura y la profundidad de la zona marrón que se forma alrededor de la base del explante. Broome y Zimmerman (1978) describieron también un oscurecimiento en cultivos de apices de zarzamora (*Rubus* sp.). Aparte de estos ejemplos, la formación de un exudado de color oscuro se ha descrito en el cultivo *in vitro* de una amplia variedad de especies leñosas.



La edad de la planta madre y el tipo de explante (o la posición que esta ocupa en la planta) pueden afectar al comportamiento de los tejidos, recién implantados *in vitro*. Muhitch y Fletcher (1984) demostraron que es más fácil establecer *in vitro* brotes jóvenes de *Rosa* sp. L. cv. Paul's Scarlett que brotes más adultos. La concentración de fenoles en los tallos adultos (más basales) es mayor que en los tallos jóvenes (más apicales). Además, los tallos adultos contienen una variedad mayor de compuestos fenólicos que los jóvenes. Estos investigadores, también observaron que las plantas cultivadas durante un largo periodo de tiempo tendían a producir menos fenoles que los cultivos recién establecidos. Chevre *et al.*, (1983) observaron que la cantidad de compuestos fenólicos de *Castanea* spp. era menor en plántulas de 3 meses procedentes de semilla que en las yemas de varillas de árboles de 5 años.

Las técnicas más frecuentemente usadas para prevenir o reducir la formación de exudados *in vitro* son:

- i) Eliminar las sustancias fenólicas mediante el lavado de los explantes con agua corriente durante largos periodos de tiempo (a veces horas). En ocasiones, el crecimiento *in vitro* de los brotes puede estar limitado por metabolitos tóxicos aún en ausencia de un pardeamiento visible.
- ii) Si, a las tres o cuatro semanas, los explantes no muestran ninguna señal de crecimiento puede ser beneficioso transferirlos a medio fresco. La transferencia es necesaria cuando el medio llega a estar descolorido u oscurecido. A menudo, el pardeamiento es particularmente visible en medio sólido, donde el exudado se concentra en los alrededores del explante. Probablemente, el método más extendido para prevenir el pardeamiento de tejidos es el cambio frecuente de los explantes a medio fresco y tras cortos intervalos de tiempo (de 1 a 3 días).
- iii) En muchas ocasiones se evitan daños al explante si se cultivan inicialmente en un medio líquido, en el que los fenoles se pueden difundir lejos de la base del explante con facilidad.
- iv) Se puede añadir al medio carbón activo que tiene la propiedad de adsorber los compuestos fenólicos. El principal inconveniente es que también adsorbe otros compuestos de interés como son los reguladores de crecimiento.
- v) Se ha comprobado que las proteínas, amidas y poliamidas secuestran los fenoles. En concreto, los fenoles son absorbidos por el PVP mediante puentes de hidrógeno previniendo su oxidación.

vi) Modificando el potencial redox. La tendencia de los compuestos a ser oxidados o reducidos depende del potencial de oxidación-reducción (redox) de la solución. Los agentes reductores que bajan el potencial redox de la solución son efectivos en la prevención del pardeamiento de tejidos vegetales aislados y se sabe que, a menudo, previenen la oxidación de los fenoles. Cuando los tejidos son propensos al pardeamiento, los explantes se sumergen en una solución de un agente reductor (antioxidante) inmediatamente después de su escisión. Dentro de los compuestos empleados con dicho fin se encuentran el ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína, ditiotreitól, glutatión y mercaptoetanol. Se utilizan a distintas concentraciones. Los antioxidantes no previenen la oxidación de los fenoles; no obstante sí que previenen la polimerización de las quinonas y reducen la probabilidad de que éstas reaccionen con proteínas.

vii) Menor disponibilidad de oxígeno: El oxígeno disuelto en las soluciones eleva su potencial redox haciendo la oxidación más rápida. Una reducción temporal de la exposición de los explantes recién aislados al oxígeno puede ayudar a evitar el pardeamiento.

viii) Inhibición de la acción de las fenoloxidasas.

A) Agentes quelantes

Los agentes quelantes interfieren con la acción de las peroxidasas. Estas moléculas pueden secuestrar iones que están ligeramente unidos por sistemas biológicos.

B) Actividad fenólica y disponibilidad del sustrato.

El grado de actividad fenólica será claramente reducida por una disminución en la actividad enzimática específica o por una disminución del sustrato que favorece su oxidación.

C) pH bajo

La actividad de la polifenoloxidasas es mayor a pH=6,5 y menor a pH inferiores. Por tanto, la obtención de explantes de especies difíciles podría mejorarse mediante el uso temporal de un medio más ácido.

#### D) Oscuridad

La conservación inicial de los cultivos en oscuridad puede ayudar a reducir el problema del pardeamiento, ya que la luz favorece la oxidación de los fenoles.

ix) La reducción de las sales es una manera efectiva de reducir el oscurecimiento del medio.

x) Los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en el oscurecimiento del medio

#### xi) Preparación del explante

En la tabla siguiente se muestran algunos de los técnicas que se han usado para prevenir o reducir el oscurecimiento del medio y del explante.

**Tabla 20.-** Métodos para prevenir o reducir el problema de la oxidación polifenólica.

PLANTA	EXPANTE	TRATAMIENTO DE PREVENCIÓN O REDUCCIÓN	REFERENCIA
		<u>Lavado o inmersión de los explantos o cultivo inicial en medio líquido</u>	
nogal	cotiledones	sumergir cotiledones de walnut en agua corriente para remover los compuestos fenólicos	Rodriguez, 1982
<i>Castanea sativa</i>	yemas apicales	remojo de ápices en agua estéril durante tres horas	Chevre <i>et al.</i> , 1983
<i>Castanea sativa</i>	yemas apicales	remojo de ápices en agua destilada durante 2-3 horas	Vieitez <i>et al.</i> , 1983
<i>Pusa seedless</i>	ápices	El cultivo en medio líquido redujo el <i>browning</i>	Dalal <i>et al.</i> , 1993
manzano	yemas apicales y laterales	Inmersión de éstas yemas durante 24 h en una solución de 200 ml al 0,1% de 8-hidroxiquinoleina previno la contaminación y el <i>browning</i>	Bhat y Candell, 1991
		pretratamiento de los explantos en un medio líquido previamente al establecimiento al medio solidificado con agar	Block y Lankes, 1996
		<u>transferencias rápidas</u>	
<i>Rhododendron</i>	ápices	subcultivos a medio fresco cada 3 semanas	Anderson, 1975

PLANTA	EXPANTE	TRATAMIENTO DE PREVENCIÓN O REDUCCIÓN	REFERENCIA
<i>Kalmia latifolia</i>	puntas de brotes	transferencias a medio fresco cada 12-24 horas	Lloyd y McCown, 1980
<i>Rubus sp.</i>	brotes	transferencia a medio fresco cada 3-4 semanas	Broome y Zimmerman, 1978
<i>Castanea sativa</i>	ápices	subcultivos cada 3-4 semanas, cuando comenzaban a aparecer síntomas de necrosis	Vieitez <i>et al.</i> , 1983
nogal	puntas de ápices	transferencias rápidas a medio fresco	Somers, 1982
<i>Larix X eurolepis</i>	callo	El browning aumentó con el tiempo de subcultivo	Laliberte y Lalonde, 1990
<i>Pimpinella anisum L.</i>	callo	transferencias a medio fresco cada 15- 17 días	Suresh <i>et al.</i> , 1997
<u>Tipo de explante, preparación y edad de la planta madre y/o del explante, época del año, posición, etc.</u>			
<i>Euphorbia cathyris L.</i>	puntas de tallo	Si en el establecimiento <i>in vitro</i> se cortan las hojas de los ápices con tijeras se reduce el oscurecimiento del medio, debido a la reducción de la herida	Ripley y Preece, 1986
<i>Pusa seedless</i>	ápices	ápicea de menos de 10mm dieron menor browning que si el tamaño de los explantos hubiera sido mayor.	Dalal <i>et al.</i> , 1993
<i>Miscanthus "Gigantheus"</i>	inflorescencias, hojas o ápices	Inflorescencias maduras produjeron menos empardecimiento del medio que otro tipo de explantes utilizados.	Lewandowski y Kahnt, 1993
<i>Phoenix dactylifera cv. "Hillaly"</i>	yemas apicales y laterales	Se minimizó el <i>browning</i> si las yemas se colectan entre los meses de noviembre y marzo que entre los meses de mayo y agosto.	Al Maarri y Al Ghamdi, 1995
manzano M9	ápices	Sombreado la planta madre, cultivándola en el invernadero y con un pretratamiento con calor de la planta madre y un pretratamiento de los explantos en un medio líquido previo al cultivo en un medio agarizado.	Block y Lankes, 1996
<i>Dioscorea alata</i>	brotes	Si se sella la base del brote con parafina se evita la secreción de exudado al medio de cultivo	Bhat y Chandel, 1991
vid	yemas apicales	Al tomar los ápices del forzado de varetas con yemas latentes guardadas a la oscuridad, se reduce el exudado.	Dalal <i>et al.</i> , 1992
<i>Protea repens</i>	brotes	Tratamiento de la planta madre con 200 mg/l de BAP	Rugge <i>et al.</i> , 1995
<u>Uso de antioxidantes</u>			
<i>Coffea arabica</i>	callo embriogénico	El ácido ascórbico, ácido cítrico y L-cisteína a distintas concentraciones	Sondal y Sharp, 1977.
<i>Rosa sp.</i>	brotes	El uso de ditiotreitrol, glutation y mercaptoetanol a distintas concentraciones	Skirvin y Chu, 1979.
Castaño	ápices	Tratamientos del medio con cafeína	Chevre <i>et al.</i> , 1983

PLANTA	EXPANTE	TRATAMIENTO DE PREVENCIÓN O REDUCCIÓN	REFERENCIA
<i>Cattleya</i>	brotos apicales	Adición al medio estacionario líquido de antioxidantes.	Ichihashi y Kako, 1977
<i>Rosa hybrida</i>	callo	250 mg/l de dietilditiocarbamato al medio	Hamed <i>et al.</i> , 1993
<i>Quercus robur</i>	meristemo	meristemos de árboles de 25-90 años de edad tratados con una inmersión durante cierto tiempo en una disolución de 1000 mg/dm <sup>3</sup> de a. ascórbico	Toth <i>et al.</i> ; 1994
<i>Cynara scolymus</i>	ápices	inmersión de los ápices esterilizados en una disolución de 100 mg/l de ácido ascórbico	El Bahr <i>et al.</i> , 1993
<i>Guava cv. Dimple</i>	ápices	Ápices desinfectados y mojados en una disolución con ácido cítrico, 75 mg/l y ácido ascórbico, 50 mg/l y, a continuación establecidos <i>in vitro</i> .	Fitchet-Purnell, 1990
<i>Juglans regia L.</i>	embriones	Adición de tiosulfato de sodio al medio de cultivo	Liu y Han, 1989
<i>Solanum tuberosum L.</i>	anteras	Ácido ascórbico y L-cisteína	Tiainen, 1991
cocotero	callo	Ácido cítrico y ascórbico	De Siqueira y Inoue, 1991
<i>Acacia nilotica</i>	yemas axilares de árboles de 20-25 años de edad	Ácido ascórbico y cítrico y sulfato de sodio	Singh, 1993
<i>Rubus glaucus L.</i>	yemas axilares	100 ppm de ácido ascórbico	Ramirez y Angarita, 1990
<i>Annona cherimola</i>	secciones nodales	Ácido ascórbico y glutathione	Jordan <i>et al.</i> , 1991
<i>Musa sp.</i>	ápices	Pretratamientos de los ápices con ácido ascórbico	He <i>et al.</i> , 1995
<i>Cymbidium hybrid</i>	zonas basales de hojas	medio enriquecido con 55 μM de ácido ascórbico y 5,5 μM de cisteína	Pindel y Miczynski, 1995
<i>Acacia mangium Willd.</i>	Explantes nodales	Adición al medio de 100 mg/l de ácido ascórbico	Bhaskar y Subhash, 1996
<i>Taxus wallichiana</i>	callo	Suplementación del medio con 30 mg/l de ácido ascórbico	Banerjee, 1996
<i>Capsicum anuum</i>	protoplastos	ácido ascórbico	Prakash <i>et al.</i> , 1997
arroz	callo embriogénico	Adición al medio de 500 mg/l de MES (ácido 2-(N-morpholin) etanesulfónico)	Xue <i>et al.</i> , 1998
manzano M-26	ápices	Aplicaciones en la fase inicial del glutathion (GHS)	Nomura <i>et al.</i> , 1998
<i>Uso de polivinilpirrolidona</i>			
manzano	meristemos	Adición de PVP al medio de cultivo	Walkey, 1972
<i>Tectona grandis L</i>	brotos	Adición de PVP al medio de cultivo	Gupta <i>et al.</i> , 1980

PLANTA	EXPANTE	TRATAMIENTO DE PREVENCIÓN O REDUCCIÓN	REFERENCIA
<i>Hemamelis</i>	ápices	Se añade al medio un 1-2% de PVP	Christiansen y Fønnesbech, 1975
<i>Castanea</i>	yemas axilares	Diversos tratamientos del medio con PVP	Chevre <i>et al.</i> , 1983
<i>Camellia sinensis</i>	segmentos nodales	Un pretratamiento de los explantes en PVP	Sarathchandra, 1990
caña de azúcar		La incorporación en el medio de 0,05% de PVP	Shukla <i>et al.</i> , 1994
<i>Nepenthes khasiana</i> Hook	ápices	500 mg/l de PVP al medio de cultivo	Rathore <i>et al.</i> , 1991
<i>Annona cherimola</i>	secciones nodales	PVP	Jordan <i>et al.</i> , 1991
<i>Capsicum annum</i>	protoplastos	Adición de PVP	Prakash <i>et al.</i> , 1997
<u>Uso de carbón activo</u>			
azalea	yemas axilares	Adición de carbón activo al medio	Preil y Engelhardt, 1977
manzano cv. Fuji	yemas apicales	2,5 g de carbón activo añadido al medio	Wang <i>et al.</i> , 1994
<i>Dipterocarpus datus</i> y <i>D. intricatus</i>	embriones	Puente de papel sobre un medio líquido con carbón activo	Linington, 1991
<i>Nepenthes khasiana</i>	ápices	500 mg/l de carbón activo al medio de cultivo	Rathore <i>et al.</i> , 1991
<i>Lavandula officinalis</i> <i>latifolia</i>	yemas	1,5-10 g/l de carbón activo	Mensuali-Sodi <i>et al.</i> , 1993
<i>Acorus calamus</i>	yemas	0,2% de carbón activo	Harikrishnan <i>et al.</i> , 1997
<u>Reguladores de crecimiento</u>			
nogal	ápices	BAP a una concentración menor de 1 mg/l	Somers <i>et al.</i> , 1982
		Se sitúan los explantes en un medio agarizado sin reguladores de crecimiento	Cheng, 1978
<i>Aradris hypogaea</i>	embriones	Disminución en la concentración de los reguladores de crecimiento (2,4D y NAA)	Baker y Wetzstein, 1994
<u>Varios: Reducción de las sales, luz, sacarosa, pH, desinfección, temperatura, tipo de agar, etc.</u>			
<i>Rhododendron</i>	ápices	Reducción a la mitad de la concentración de los compuestos nitrogenados de la fórmula de MS	Anderson, 1975
<i>Castanea sativa</i>	yemas axilares	El uso de un medio bajo en sales	Chevre <i>et al.</i> , 1983

PLANTA	EXPANTE	TRATAMIENTO DE PREVENCIÓN O REDUCCIÓN	REFERENCIA
<i>Myrtus communis</i> <i>L.</i>	segmentos nodales	La preincubación de los explantes en un medio sin sales minerales.	Parra y Amo Marco, 1996
<i>Abies fraseri</i>	yemas apicales	El aporte de N mediante una fuente en forma de nitrato	Bergmann <i>et al.</i> , 1997
<i>Camellia sinensis</i>	brotos	La reducción de los niveles de luz ayuda al establecimiento de los cultivos	Forrest, 1969
ajo	meristemos	150 lux (4% de <i>browning</i> ) 500 lux (16% de <i>browning</i> ) La etapa de iniciación en la oscuridad total	Hu y Wang, 1983 Adams et al, 1979
manzano y peral	yemas apicales	Un tratamiento de 5-6 días a la oscuridad y una temperatura de 5°C mejora el establecimiento de los explantos	Wang <i>et al.</i> , 1994
<i>Parthenium argentatum</i>	callos	Mantener los cultivos bajo bajas intensidades luminosas	Finnie <i>et al.</i> , 1989
<i>Andrographis paniculata</i>	ápices	Incubación de los cultivos en baja intensidad lumínica (600 lux)	Prathanturug <i>et al.</i> , 1996
<i>Capsicum annum</i>	protoplastos	Incubación en la oscuridad	Prakash <i>et al.</i> , 1997
<i>Hevea sp.</i>	Segmentos nodales	Una desinfección de los explantes con una disolución de 0,2% de HgCl <sub>2</sub> redujo el oscurecimiento del medio	Seneviratne, 1995
<i>Hevea sp.</i>	embriones	El Gelrite mejora las condiciones frente al Difco agar	El Hadrami <i>et al.</i> , 1993
Cablabbean	callo	200 ml/l de leche de coco	Kabir y Sen, 19990
<i>Brassica pekinensis</i>	protoplastos	pH mayor de 6,5	Li <i>et al.</i> , 1992
<i>Simarouba glauca</i>	callo	Bajos niveles de sacarosa ( menor del 4%)	Rout y Das, 1994
<i>Vitis vinifera</i>	células	Menos de 60 g/l de sacarosa	Cormier <i>et al.</i> , 1990
Oil palm	embriones	Sacarosa 0,5 M	Tarmizi <i>et al.</i> , 1993
<i>Dioscorea alata</i>	brotos	Volúmenes de cultivo mayores de 2ml/30 ml de vial	Bhat y Chandel, 1991

#### 2.6.4.- Aspectos negativos de la variación somaclonal

Sin lugar a dudas, la variación somaclonal es indeseable para todos los que pretenden utilizar el cultivo *in vitro* como una herramienta para la propagación. La existencia de un cierto grado de variación somaclonal puede ser soportable (aunque no deseable) cuando se utiliza el cultivo *in vitro* como medio para la reproducción en masa. Algunos productores (por ejemplo de plantas ornamentales) utilizan métodos de regeneración basados en morfogénesis casi directa e incluso directa. Es lógico que así sea porque, para un productor de plantas ornamentales, el que aparezcan unos pocos variantes entre varios miles o decenas de miles de plantas es irrelevante. Aquí lo importante es llegar a un equilibrio entre eficacia del sistema de producción (y por tanto rentabilidad) y uniformidad de las plantas producidas.

En otros casos la situación es muy diferente y, a veces, el programa de producción puede incluso quedar arruinado por el grado de variación. Por ejemplo en una revisión sobre el empleo de diversas técnicas de cultivo *in vitro* para la producción en Australia, Smith y Drew (1990) citan que casi el 90% de las plantas de banana producidas *in vitro* mostraban un fenotipo aberrante en campo. Evidentemente, antes de usar un método de producción *in vitro* habría que estar seguro de que la tasa de variación está por debajo de un cierto umbral. En general, el nivel de exigencia será mayor cuando se trate de especies de cosecha y, dentro de estas, mayor aún en especies de ciclo largo: sería absurdo utilizar un método de producción que conduzca a una tasa insoportable de variación... y que ésto se vea al cabo de varios años.

La variación somaclonal es, pues, un fenómeno indeseable cuando las técnicas del cultivo *in vitro* se utilizan para ciertos fines; pero cuando se plantean objetivos diferentes, esta nueva fuente de variación intraespecífica puede ofrecer importantes aplicaciones.

### **3.- Selección somaclonal en la mejora de plantas ornamentales**

Según Moreno (1997), el cultivo *in vitro* de células vegetales es una tecnología que permite explotar el potencial genético de las células vegetales. En sus inicios, el cultivo *in vitro* se desarrolla como una técnica, o quizá mejor como un conjunto de técnicas, que sirven de apoyo en estudios con una orientación básica, fundamentalmente de tipo fisiológico. Posteriormente, el cultivo *in vitro* aporta diversas alternativas para conseguir la propagación clonal de genotipos seleccionados, así como el saneamiento del material vegetal.



La regeneración de plantas a partir de células cultivadas *in vitro* (es decir, la morfogénesis *in vitro*) se puede producir de forma directa o indirecta. Cuando la morfogénesis es de tipo directo la consecuencia es la estabilidad, es decir lo que cabe esperar es que no haya variación genética. En cambio, cuando la morfogénesis es indirecta, es decir cuando la regeneración se produce tras la formación de un callo, la consecuencia es totalmente distinta: en este caso lo que cabe esperar es que haya variación genética entre las plantas regeneradas. Esto nos lleva al concepto de variación somaclonal, es decir la “ variación genética que surge como consecuencia del cultivo *in vitro* y, más concretamente, de los procesos de regeneración por vía indirecta, o sea los que implican una fase de callo más o menos larga.

Skirvin y Janick (1976 a) fueron los primeros en darse cuenta del posible interés para la mejora de la variación somaclonal y quienes primero publicaron la selección de un variante de interés en cultivo *in vitro*: el variante “Velvet Rose” de *Pelargonium* (Skirvin y Janick, 1976b). Son sin embargo los trabajos publicados por Shepard y su equipo (Shepard, 1980; Shepard et al. 1980; Secor y Shepard, 1981) los que producen más impacto en el mundo científico y los que más contribuyen a despertar el interés de los mejoradores por esta nueva fuente de variación intraespecífica.

Larkin y Sconcroft (1981) acuñan los términos “ variación somaclonal” - en el sentido de “la variación que aparece como consecuencia del cultivo *in vitro*” - y “somaclon” - planta regenerada a partir de un callo, que, si deriva de un explante recibirá el nombre de “calliclon” y si procede de protoplastos “protoclon” - e incluso, señalan algunas de las causas de la variación somaclonal así como algunos de los factores que influyen sobre la tasa de la variación.

La selección “somaclonal” o selección a nivel de planta entera (somaclon) consiste en: i) establecer un cultivo celular; ii) regenerar plantas; iii) hacer una preselección a nivel de planta en la primera generación (es decir en la generación SC1) en base al carácter o caracteres deseables; y iv) hacer una selección definitiva, así como una caracterización genética, en las descendencias de los somaclones seleccionados (SC2, SC3, etc.)

### **3.1.- Causas de la variación somaclonal**

En ocasiones, la variación que aparece en las plantas regeneradas se debe a la variación preexistente en el material de partida. Por ejemplo, algunos tejidos vegetales son mixoploides

(tienen células con distinto número cromosómico) y ésta es una de las causas de la alta frecuencia de cambios numéricos en las plantas regeneradas. Otra está relacionada con el hecho de que algunas plantas son quimeras naturales: contienen sectores que proceden de capas meristemáticas con distinta constitución genética. La distribución diferencial de estas capas a lo largo de la morfogénesis *in vitro* explica, al menos en parte, la alta tasa de variantes que se observa en estos casos.

Por otro lado, la existencia de mutaciones somáticas en los explantes de partida es la causa de la aparición de algunos variantes somaclonales con cambios puntuales. Las plantas regeneradas *in vitro* a partir de estas células mutantes preexistentes en los explantes de partida darán lugar a variantes somaclonales.

En todo caso, la mayor parte de los cambios genéticos se producen a lo largo del cultivo celular. El cultivo *in vitro* es una situación excepcional para las células vegetales y el estrés al que las células se ven sometidas se traduce en consecuencias genéticas, aunque sea de forma indirecta. Por ejemplo, los cambios que se producen en el metabolismo celular generan la síntesis de compuestos que pueden actuar como mutágenos; la profunda alteración de los patrones de expresión génica produce una serie de cambios epigenéticos que, a la larga, se pueden traducir en cambios genéticos; la aceleración de los procesos de replicación y la anormal duplicación de los bloques de heterocromatina tienen consecuencias diversas; la alteración de los planes de división celular genera, como mínimo, un ruido de desarrollo incomparablemente mayor al que se produce *in vivo*. En conjunto éstos y otros procesos son la causa de los diversos tipos de cambios genéticos (mutaciones puntuales, cambios estructurales y cambios numéricos) observados en plantas regeneradas (Lee, 1985; Evans, 1989; Phillips *et al.*, 1990; Moreno y García-Sogo, 1993; Kaepler y Phillips, 1993 y Skirvin *et al.*, 1994).

No todos los cambios que se observan son genéticos: algunos son epigenéticos, es decir no se transmiten a la descendencia. En ocasiones, resulta incluso difícil decidir si estamos ante un cambio genético o epigenético, algo que, en principio, debería ser totalmente evidente. Phillips *et al.* (1994) han propuesto un modelo, basado en el fenómeno R.I.P. (repeat - induced point mutations), que explicaría una buena parte de las mutaciones puntuales que se producen a lo largo del cultivo *in vitro*. Según este modelo, la profunda alteración de los procesos de metilación-demetilación (un cambio esencialmente epigenético) sería la causa principal de la mayor parte de las mutaciones puntuales. Alternativamente, la profunda alteración de los

patrones de eucromatización-heterocromarización podría ser la causa de ciertas variaciones que inicialmente parecen de tipo genético pero que, a la larga, acaban por desaparecer.

Puede haber otras muchas causas de variación en cultivo celular: la replicación tardía de bloques heterocromáticos, los procesos de recombinación mitótica, la activación de elementos transponibles. Alguno de estos cambios puede, a su vez, ser la causa de la expresión de variación genética críptica, por ejemplo como consecuencia de la activación de pseudogenes o retropseudogenes o, alternativamente, por la reaparición de variación oculta por procesos de canalización genética (Moreno, 1997).

### 3.2.- Frecuencia de variación

Hay múltiples evidencias indirectas que muestran que la tasa de variación somaclonal suele ser muy alta. Trabajando con melón se ha observado una alta frecuencia de variación somaclonal en diversos caracteres (Hernandez Pina *et al.*, 1987; Moreno y Roig, 1990). En otro trabajo con la especie silvestre *Cucumis anguria* se encontró un calliclón que mostraba variación en 14 caracteres (Moreno y García-Sogo, 1993)

Skirvin *et al.* (1994) se atreven a cuantificar la tasa de variación que cabría esperar por término medio, es decir la que un investigador va a obtener en un experimento ideal. Siendo conservadores, sugieren un intervalo del 1 al 3%. En realidad, la cifra tiene poco sentido porque no alude a ningún caso concreto pero indica que, aún siendo conservadores, cabe esperar una elevada tasa de variación.

Tomando en consideración tanto las estimaciones de tipo directo como las evidencias de tipo indirecto, parece claro que la frecuencia de variación *in vitro* es enormemente superior a la tasa de mutación espontánea y no sólo eso: también es más alta que la tasa de mutación obtenida cuando se emplean tratamientos mutagénicos *in vivo*. Nuestra experiencia, adquirida en años de trabajo con diversas especies ornamentales nos obliga a estar de acuerdo con esta conclusión, aunque, la idea que se formará un investigador sobre la tasa de variación va a ser dependiente del material empleado y de las condiciones en las que trabaje.

El análisis de tipo molecular debería ayudar a despejar las dudas existentes sobre las tasas de variación, pero tampoco conviene llegar a conclusiones precipitadas. Por ejemplo, en el

trigo hay un juego de genes que codifican las gliadinas. Diversos autores han utilizado este sistema genético bien conocido para determinar las tasas de variación (Larkin *et al.*, 1984; Maddock *et al.*, 1985; Novoselskaya *et al.*, 1987; Metakovsky *et al.*, 1987). Frente a lo que cabría esperar, las conclusiones no han sido, ni mucho menos, las mismas. Simplificando, se puede decir que la tasa de variación encontrada es siempre bastante alta. En realidad es tan alta que algunos dudan de que estas estimas tengan algún significado.

En suma, como consecuencia del cultivo *in vitro*, las células y las plantas regeneradas a partir de ellas, sufren diversos cambios. Algunos son simplemente epigenéticos (aunque sus consecuencias fenotípicas puedan ser extremas); otros tienen una base genética. La tasa de mutación *in vitro* es muy elevada - incluso mayor que la que se obtiene por cualquier otro procedimiento - pero es difícil inclinarse por una cifra que esté de acuerdo con todas las estimaciones efectuadas. En cualquier caso, parece evidente que esta cifra es extremadamente dependiente de toda una serie de factores y, por tanto, la interpretación de cualquier estima debe hacerse en el marco concreto en el que se ha realizado el trabajo en cuestión.

### **3.3.- Factores que influyen sobre la frecuencia de variación somaclonal**

**3.3.1.- Genotipo.-** Hay evidencias contundentes que indican que la tasa de variación depende del genotipo. Pero no sólo la especie es importante: las tasas de variación pueden ser diferentes en función de la variedad, el cultivar o la línea empleada.

**3.3.2.- Material de partida.-** Parte de la variación que aparece como consecuencia del cultivo *in vitro* depende de la variación preexistente en el material de partida y ésto explica la importancia de este factor. Es evidente que la tasa de variación es mayor en protoclonos (plantas regeneradas a partir de protoplastos) que en calliclonos (plantas regeneradas a partir de explantes). Puede que ésto se deba, aunque de forma indirecta a los tratamientos empleados para aislar protoplastos (mucho más estresantes que los habitualmente utilizados para obtener explantes); pero la causa puede residir también en la naturaleza de los medios de cultivo (normalmente más complejos) y en el mayor número de subcultivos que se precisa para regenerar plantas a partir de protoplastos.

**3.3.3.- Formación de callo, periodo de cultivo y número de subcultivos.-** El tipo de morfogénesis (directa o indirecta) es el factor más determinante sobre la tasa de variación. En procesos de regeneración directa no cabe esperar variación o, si la hay, ésta suele ser mínima.

En cambio, el crecimiento inicialmente desorganizado (con la subsiguiente formación de callo) genera toda una gama de desórdenes de tipo metabólico y estructural (por ejemplo, los relacionados con la asimetría de los procesos de división celular) que se traducirán en variación, tanto epigenética como genética y, dentro de esta última, en diversos tipos de cambios: puntuales, estructurales o numéricos. Evidentemente, la tasa de variación va a ser muy dependiente de la longitud de la fase de crecimiento desorganizado (en unos casos relativamente escasa y en otros no), del periodo de cultivo y del número de subcultivos.

**3.3.4.- Composición del medio de cultivo.-** Suele haber un pensamiento generalizado de que la composición del medio de cultivo y, sobre todo, el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento, juegan un papel importante en la frecuencia de variación. Los componentes del medio de cultivo afectan a la tasa de variación (principalmente estructural y numérica), pero lo hacen de forma indirecta, influyendo sobre el grado de desorganización celular, la asimetría de la mitosis y la velocidad de división celular.

**3.3.5.- Tipo de respuesta morfogénica.-** La morfogénesis *in vitro* se puede verificar por dos vías alternativas: organogénesis y embriogénesis somática. Se ha sugerido en ocasiones que los cultivos embriogénicos están menos sometidos a cambios genéticos que los cultivos organogénicos. Los estudios más reveladores en torno a esta cuestión son aquellos en los que se comparan las frecuencias de variación en somaclones de la misma especie obtenidos por las dos vías morfogénicas. En uno de estos estudios, Barwale y Widholm (1987) no encontraron diferencias significativas en las tasas de variación de somaclones de soja regenerados por ambas vías. Armstrong y Phillips (1988) realizaron dos experimentos para comparar la frecuencia de variación en somaclones procedentes de cultivos de maíz tipo I (organogénicos) y tipo II (embriogénicos), observando que las frecuencias de variantes en somaclones de cultivos embriogénicos eran algo superiores (33,3% y 37,0%) a las observadas en somaclones de callos organogénicos (20,8% y 24,2%). En cambio, la frecuencia de plantas quiméricas fue menor en somaclones tipo II que en los de tipo I, pero la edad de cultivo tenía un mayor efecto sobre la frecuencia de plantas quiméricas que el tipo de cultivo (embriogénico y organogénico). En principio, en plantas regeneradas vía organogénesis cabe esperar cualquier tipo de cambio genético (puntual, estructural o numérico). En plantas regeneradas a partir de embriones pueden ser más frecuentes las mutaciones puntuales y quizás pequeñas alteraciones estructurales que los cambios más groseros de tipo estructural o numérico.

Hay otros factores que pueden influir sobre la tasa de variación somaclonal. Parece, por ejemplo, que el nivel de ploidía tiene una cierta influencia: la variación somaclonal parece ser mayor en especies de origen poliploide (auto o aloploiploide); pero esto puede ser debido a que, por su origen evolutivo, estas especies tienen mayor capacidad de tamponamiento y soportan mejor ciertos desequilibrios genéticos que no son admisibles en otras especies.

### **3.4.- La selección somaclonal como método de mejora:**

La variación somaclonal representa una fuente de variación intraespecífica para el mejorador de plantas. Desde un punto de vista técnico hay dos formas de aprovechar la variación somaclonal: mediante “selección celular” (es decir, imponiendo una presión selectiva en cultivo celular) o mediante “selección somaclonal” (identificando los genotipos deseables a nivel de planta).

Al considerar las posibilidades de la selección somaclonal como método de mejora hay que tener en cuenta no sólo los aspectos positivos sino también las limitaciones existentes. Empezando por estas últimas habría que citar, entre otras, las siguientes: i) El investigador tiene un control muy escaso, por no decir casi nulo, del tipo de variación; ii) aunque se ha avanzado en el conocimiento de los factores que influyen en la tasa de variación, nuestra capacidad para controlar la frecuencia de variantes es bastante limitada; iii) En otros casos el problema radica en que algunos de los nuevos caracteres se heredan de forma anómala y, cuando esto sucede, es difícil entender la causa. Seguimos sin tener un conocimiento suficiente sobre las causas que determinan la variación: los avances conseguidos son incuestionables pero es mucho lo que falta por conocer (Moreno, 1997).

La selección somaclonal como método de mejora es, hoy por hoy, aplicable a la mayor parte de las especies vegetales. El fundamento es sencillo y el único requisito es disponer de un protocolo que permita la regeneración de plantas a partir de callos procedentes de explantes o, alternativamente, de protoplastos. Esto último no es nada fácil, pero lo anterior es factible en la gran mayoría de las especies vegetales. También conviene destacar que la variación somaclonal afecta a todo tipo de caracteres: monogénicos, oligogénicos o poligénicos (Phillips *et al.*, 1990; Kaepler y Phillips, 1993). Además, la variación no sólo afecta a genes que residen en el núcleo: también se producen cambios en los genóforos extranucleares (Evans, 1989). Uno de los aspectos más interesantes de la variación somaclonal es que el espectro de variación es enorme y, desde luego, incomparablemente mayor al que suele aparecer cuando se emplean

tratamientos mutagénicos *in vivo*. Más aún: en los programas de selección somaclonal aparecen algunos cambios genéticos que son muy infrecuentes en experimentos de mutagénesis *in vivo*. No están muy claras las causas de este fenómeno pero, con independencia de cuáles sean, lo cierto es que éste ofrece la oportunidad de seleccionar variantes inéditos.

### **3.5.- La selección somaclonal en la mejora de especies ornamentales.**

Los objetivos que se persiguen en la mejora de una especie ornamental son habitualmente distintos a los de una especie de cosecha. Para el productor de plantas ornamentales uno de los objetivos prioritarios es la introducción de novedades. En estas especies lo que interesa, por ejemplo, es encontrar una planta con una nueva pigmentación (en las hojas, flores, etc.), con un tipo de hoja diferente, con un patrón de crecimiento distinto (por ejemplo, una planta enana o más compacta), etc. En definitiva, los variantes morfológicos, usualmente indeseables en especies de cosecha, son enormemente valiosos en plantas ornamentales. Si se tiene en cuenta que los cambios morfológicos son muy frecuentes en plantas regeneradas en cultivo *in vitro* y que la mayor parte de estos cambios pueden ser interesantes cuando aparecen en una planta ornamental, parece lógico deducir que la selección somaclonal va a ser una alternativa valiosa en la mejora de estas especies.

La variación somaclonal es un fenómeno indeseable cuando las técnicas del cultivo *in vitro* se utilizan para ciertos fines; pero cuando se plantean objetivos diferentes, esta nueva fuente de variación intraespecífica puede ofrecer importantes aplicaciones. En la medida en que seamos capaces de avanzar en el conocimiento de este fenómeno, podremos entender mejor el origen de la variación, los factores que modifican la frecuencia de variantes y la causa de las anomalías en el modo de herencia de algunos caracteres. Estos conocimientos son esenciales, porque nos permitirán un mayor control del fenómeno y un mejor aprovechamiento del mismo cuando lo que se persiguen son objetivos relacionados con la mejora genética (Moreno, 1997). No se puede descartar el que se consigan aplicaciones importantes en la mejora de especies de cosecha pero, desde nuestro punto de vista, es en la mejora de plantas ornamentales donde la selección somaclonal ofrece mayores posibilidades.



**Tabla 22.-** Variación somaclonal en algunas especies de ornamentales

PLANTA	TIPO DE CULTIVO	CARACTERES OBSERVADOS	REFERENCIA
<i>Coleus blumei</i>	cultivo de ápices	La micropropagación puede inducir cambios epigenéticos y/o cambios hereditarios en la variegación de la hoja	Marcotrigiano <i>et al.</i> , 1990
<i>Gerbera jamesonii hybrida</i>	cultivo de brotes e irradiación con rayos $\gamma$	- reducción de la tasa de multiplicación - variación en el color y la forma de la flor	Laneri <i>et al.</i> , 1990
<i>Ranunculus asiaticus L.</i>	embriogénesis directa	Diversos colores en las flores: algunas de color blanco y otras de color rojo y amarillo.	Meynet y Duclos, 1990a
	callo	Diferencias en susceptibilidad a la infección bacteriana	Meynet y Duclos, 1990b
<i>Pelargonium spp.</i>	Cultivo de ápices	Somaclones resistentes a <i>Xanthomonas campestris pv. pelargonii</i>	Dunbar y Stephens, 1989
<i>Lilium davidii var. willmottiae</i>	plántulas tratadas con radiación gamma y colchicina (1-4 mg/l)	Tasa de proliferación más alta, variación en el espesor de las hojas, colores de la hoja y el tamaño de los bulbos	Wang <i>et al.</i> , 1989
<i>Polianthes tuberosa L.</i>	cultivo de anteras	Longitud de las inflorescencias, número de yemas florales y color y tamaño de la flor	Gi y Tsay, 1989
<i>Cyclamen persicum Mill</i>	cultivo <i>in vitro</i>	Formas enanas, color y forma de las flores	Schwenkel <i>et al.</i> , 1990
<i>Coleus blumei</i>	cultivo de callos	Tolerancia a la salinidad	Ibrahim <i>et al.</i> , 1992
<i>Dianthus carophyllus</i>	cultivo de óvulos	3,3% de variación (enanismo y apariencia de los pétalos)	Frey y Janick, 1991
<i>Zinnia marylandica</i>	yemas adventicias	Altura de la planta y morfología y color de las flores	Stieve y Stimart, 1993
<i>Rosa hybrida L.</i>	plantas regeneradas de callos	Número, color y forma de los pétalos	Arene <i>et al.</i> , 1993
<i>Dianthus carophyllus</i>	cultivo de pétalos <i>in vitro</i>	Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i>	Mosquera <i>et al.</i> , 1992
<i>Rhododendron</i> cultivares: Aglo, Molly, Fordham, Scintillation	cultivo de ápices	- enanismo	Keith y Brand, 1995
		- distinta área de hoja	
		- ramificación	
<i>Rhododendron PJM</i>	brotes adventicios de explantes de hojas	variación somaclonal	Preece <i>et al.</i> , 1993
<i>Cyclamen persicum</i>	callo organogénico	Se producen cientos de plantas que muestran, a menudo, fenotipos y genotipos desviados	Dillen <i>et al.</i> , 1996
<i>Rosa multiflora Thunb.</i>	callo organogénico	Se trata de un variante sin espinas en el tallo, que al propagarse <i>in vitro</i> produce mucha variación	Rosu <i>et al.</i> , 1995

**Tabla 23.-** Algunos ejemplos de variantes somaclonales en plantas ornamentales

PLANTA	TIPO DE CULTIVO	CARACTERES OBSERVADOS	REFERENCIA
<i>Pelargonium</i> "Velvet Rose".	cultivo <i>in vitro</i> de callo	Distinta forma de hoja y planta y tamaño de la flor más grande	Skirvin y Janick, 1976a, 1976b
<i>Lilium</i> "Black Beauty"	cultivo <i>in vitro</i>	Hojas variegadas y un menor vigor	Stimart et al., 1980
<i>Paulownia tormentosa</i> "Somaclonal Snowstrm"	cultivo de callo de hipocotilo	Hojas irregularmente variegadas	Marcotriano y Jagannathan, 1988
<i>Eustoma grandiflorum</i>		Mayor ramificación	Griesbach y Semeniuk, 1987
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	plantas regeneradas de hojas y pétalos	Variantes con los <i>ray florets</i> de color lila	Khalid et al., 1989
<i>Rhododendron</i> "President Roosevelt" cultivar variegado	callo	Segregación de plantas de hojas variegadas o plantas totalmente verdes. Brotes adventicios miniturizados. Brotes axilares con tallos estrechos y hojas más grandes. Proliferan menos.	Pogany y Lineberger, 1990
<i>Cymbidium</i> x <i>Oriental Legend</i> "Cinnamon"	cultivo <i>in vitro</i> de protocormos	Producen racimos de flores con su labelo más largo y más puntiagudo y con pétalos de color amarillo-pardo	Laneri, 1990
<i>Torenia fournieri</i>	cultivo de callo	Un atractivo hábito de crecimiento compacto y con flores blancos (el parental tiene flores bicolor)	Brand y Bridgen, 1989
<i>Chrysanthemum</i> <i>sp.</i>	Brotes adventicios	Forma, tamaño y color de las flores. Forma del tallo y de la hoja	Ohishi y Sakurai, 1988
<i>Hemerocallis</i> Yellow Tinkerbelle	callo	Enanismo	Griesbach, 1989
<i>Dianthus carophyllus</i>	cultivo de óvulos	Enanismo, alta ramificación y floración prematura	Sparnaaij et al., 1990
<i>Anigozanthos hybrid</i> "Lemon whizz"	cultivo de tejidos	Compacto	Trimble y Membrey, 1991
<i>Ficus lyrata</i> "Ivonne"	cultivo de callo de hojas	Planta con las hojas variegadas	García-Pitarch y Moreno, 1991
<i>Rhododendron</i> <i>sp.</i> (azalea)	callo	Dos variantes con un contenido diferente en antocianos	Gertnere, 1992
<i>Begoniaxelatior</i> y <i>Saintpaulia ionantha</i>	cultivo de callo de disco de hoja	Variantes con hojas serradas y variegadas. Distinto número de flores por planta. Distintos tamaños de flores	Jain, 1993
PLANTA	TIPO DE CULTIVO	CARACTERES OBSERVADOS	REFERENCIA
<i>Dendranthema</i>	cultivo <i>in vitro</i> de <i>florets</i>	Color de las flores. Forma y número de floret por	Mizutani y

---

<i>morifolium</i>	y corolas	flor	Tanaka, 1991
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	cultivo <i>in vitro</i> de ray florets	Crecimiento vegetativo y floración	Malaure <i>et al.</i> , 1991a y 1991b
<i>Malus</i> y <i>Pyrus</i> cultivars ornamentales	cultivo <i>in vitro</i>	Enanismo y mucha ramificación	Baubalt <i>et al.</i> , 1992
<i>Caladiumxhortulanum</i>	cultivo de discos de hojas	Variantes con hojas de distintas coloraciones	Zhu <i>et al.</i> , 1993
<i>Saintpaulia</i> sp	cultivo de hojas	Hojas con distinta intensidad de color verde y variegadas	El Mardi <i>et al.</i> , 1993
<i>Ficus benjamina</i> "Mallorca"	cultivo de ápices	Hojas jaspeadas	García-Pitarch <i>et al.</i> , 1995a y b
<i>Rudbeckia hirta, laciniata, pupurea</i>	cultivo de callo	Variaciones en la forma de la flor, número de ray florets/flor, color de la flor, poliploidía y aneuploidía	Khilbas, 1995
<i>Torenia fournieri</i> "Compacta Blue"	callos a partir de discos de hojas	Plantas resistentes a mosca blanca y araña roja	Hadi y Bridgen, 1996
<i>Gerbera jamesonii</i>	cultivo <i>in vitro</i>	Termotolerancia	Marmilori <i>et al.</i> , 1997

---



## **II.- Objetivos**

Hasta hace poco, el mercado de las plantas ornamentales de interior ha sido muy competitivo pero, a la vez, poco dinámico. El abanico de plantas o variedades ofertadas era muy

estrecho y no permitía muchas posibilidades de elección a los consumidores, los cuales se limitaban a comprar en las floristerías las plantas habituales de siempre.

El carácter agrícola y familiar de las empresas convirtió al sector de las ornamentales en un sector muy inmovilista y reacio a los grandes cambios e innovaciones que se avecinaban. Además, en los últimos años, las nuevas técnicas de propagación *in vitro* y la modernización y mejora de las técnicas de producción (sistemas de riego, cultivo forzado en invernaderos, uso de fertilizantes y plaguicidas más adecuados, etc) supusieron un gran aumento en la producción y una saturación en el mercado de las variedades clásicas más habituales. Todo esto, unido al hecho de que los gustos del consumidor han ido evolucionando a lo largo del tiempo, ha obligado a los productores a iniciar, con todos los medios a su alcance, la búsqueda y desarrollo de variedades de plantas con nuevas características que sean más atractivas para el consumidor y que al mismo tiempo se puedan reproducir y cultivar sin problemas.

La variación somaclonal puede ser una herramienta muy útil en la selección de nuevas variedades de plantas ornamentales ya que representa una fuente de variación que hasta ahora ha sido poco explicada.

El objetivo de este trabajo ha sido el aprovechamiento de la variación somaclonal para la obtención de nuevas variedades de plantas ornamentales con características especiales que las hagan distintas a los cultivares existentes y que supongan novedades en el mercado. Las plantas se han seleccionado en función de las siguientes características:

- i) hábito de crecimiento más compacto, porte más uniforme y homogéneo, mayor número de hojas y/o alta capacidad de brotación (el variante compacto de *Spathiphyllum* y el “Selecta” de *Syngonium*)
- ii) distintos tipos de variegación en las hojas (el variante con hojas variegadas sectorizadas “Ivonne” de *Ficus lyrata*; el “Mallorca” de *Ficus benjamina* con hojas jaspeadas; el “Blue” de *Ficus elastica* con hojas de tres colores y el “Itaca” de *Syngonium* con hojas ligeramente variegadas de color verde intenso).

Las características vegetativas de estos nuevos variantes se han evaluado en plantas de diferentes edades y/o cultivadas en distintas condiciones ambientales con vistas a su posible interés comercial, su posterior propagación en gran escala y su introducción en el mercado de las plantas ornamentales.



### **III.- Variación somaclonal en *Ficus lyrata***





---

## **Introducción.-**

El importante y extenso género *Ficus* incluye cerca de 800 especies de plantas tropicales y subtropicales con muy diversos hábitos de crecimiento. El miembro más conocido del grupo es el que produce el higo comestible común (*F. carica*). Otros miembros conocidos son la planta del caucho o goma (*F. elastica*) y el árbol sagrado de la India (*F. religiosa*). Además de los *Ficus* de porte arbóreo y arbustivo, hay también algunos trepadores vigorosos de hoja minúscula. Muchos de ellos empiezan su vida, encaramándose a otros árboles, como epífitas y, eventualmente, pueden llegar a asfixiarlos.

El género *Ficus* pertenece a la familia de las *Moraceas*, que es una fuente muy importante de plantas ornamentales. Las *Moraceas* son una familia de árboles tropicales y subtropicales, repartidos ampliamente por estas regiones y, algunos, por regiones templadas de los dos hemisferios. Una característica general de los integrantes de esta familia es la presencia en ellos de una savia lechosa que contiene látex, que comienza a producirse en el embrión y continúa sintetizándose durante toda la vida de la planta. Resulta curioso que, a pesar de su aparente importancia, se desconozca su función. Las hojas alternadas, dispuestas helicoidalmente u opuestas, son enteras y lobuladas, de margen entero o dentado y con estípulas. Las flores son unisexuales, pequeñas y con periantio de cuatro segmentos, dispuestos en capítulo sobre receptáculos planos o cóncavos, o en racimo; las flores masculinas tienen cuatro estambres y las femeninas poseen dos carpelos de los que generalmente aborta uno, permaneciendo su estilo; tiene el ovario con un solo óvulo colgante. Las plantas son monoicas o dioicas<sup>1</sup>.

Las inflorescencias son variables y los frutos maduros son, en ocasiones, carnosos y comestibles. Las partes carnosas de éstos no se originan en el ovario, sino en el receptáculo hinchado en el que se insertan las semillas, como sucede por ejemplo en los géneros *Ficus*, *Artocarpus* y *Morus*.

Las *Moraceas* comprenden 75 géneros y unas 3000 especies ampliamente difundidas. Dentro de esta familia se encuentra el género *Ficus*, que engloba cerca de 800 especies entre árboles, arbustos y plantas trepadoras. Diversas especies de este género son utilizadas como

---

<sup>1</sup> Tomado de Thomas H. Everett. 1982. The New York Botanical Garden Illustrated. Encyclopedia of Horticulture.

plantas de interior por sus atractivas hojas, adaptadas a tolerar la luz y la humedad relativa del interior.

En los *Ficus* más comunes las hojas son lobuladas, aunque en la mayoría de las especies de este género las hojas son enteras, onduladas por el borde o incluso con un pequeño lóbulo. Las hojas pueden variar de coriáceas a membranosas, siendo su nerviación muy variable, hasta el punto de servir para su clasificación. Es un género que incluye plantas monoicas y raramente dioicas, de flores apétalas, en ocasiones muy pequeñas y desnudas, que se encuentran en unas cavidades más o menos cerradas llamados receptáculos. Poseen uno o dos estambres de filamentos cortos y soldados. Las flores con pistilo tienen un ovario sécil monocarpelar, que madura en forma de aquenio cubierto por el receptáculo.

Las intensidades luminosas óptimas para su producción en maceta varían con la especie, oscilando entre 35.000 y 80.000 luxes. Algunos *Ficus* de interior se cultivan inicialmente a pleno sol para aumentar el diámetro del tallo y, posteriormente, se trasladan a sombráculos para su aclimatación. Allí se producirán cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos, que permitirán que la planta viva en interiores con intensidades de luz bajas. En este proceso la planta cambia su punto de compensación lumínica y su tasa respiratoria, lo que permite adaptar su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales.

A pesar de sus diferentes hábitos de crecimiento, todos los *Ficus* comparten estructuras florales similares. Las minúsculas flores, sin pétalos, están, en mayor o menor medida, unidas al interior de unos receptáculos huecos con forma globular o de pera que son comúnmente llamados, aunque de forma errónea, frutos -botánicamente, los frutos verdaderos se desarrollan dentro de los abultados receptáculos, aunque aquí nosotros seguiremos la costumbre común y conveniente de referirnos a los receptáculos como frutos-. Cada receptáculo tiene una pequeña apertura en el final de uno de sus extremos, protegida por pequeñas brácteas superpuestas. Hay tres tipos de flores: masculinas fértiles, femeninas fértiles y femeninas estériles, llamadas también flores amargas. Algunas especies producen las tres clases de flores en el mismo receptáculo y son autofértiles. El receptáculo de otras especies, de tipo autoestéril, contiene o bien flores masculinas, o bien flores femeninas con flores amargas estériles, y las plantas individuales producen sólo un tipo de receptáculo, habiendo por tanto plantas masculinas y plantas femeninas. La transferencia de polen de las plantas masculinas a las femeninas se realiza por insectos llamados avispa amarga. Hay una clase diferente de insecto polinizador

---

por cada especie de *Ficus*. Existe una relación mutua ventajosa entre los insectos y las plantas: los insectos polinizan las flores y éstas suministran nutrientes a las larvas de los insectos.

La mayoría de las especies de *Ficus* llevan sus frutos en los brotes más jóvenes, aunque algunos los desarrollan en las ramas viejas y en el tronco, y los de un grupo, denominado *earth fig*, producen desde sus troncos unos tallos delgados de hasta 10 metros de longitud que se entierran en la superficie del suelo y desarrollan frutos a lo largo de los propios tallos.

Muchos *Ficus* son perennes, aunque unos pocos, incluyendo la higuera, pierden sus hojas durante una parte del año. Más extraordinarios son los llamados *Ficus* estranguladores, de los que hay muchas clases en los trópicos húmedos. Normalmente comienzan la vida en una grieta de la corteza de otro árbol o, a veces, sobre el tejado o sobre alguna otra parte de un edificio que permite espacio a una semilla caída desde un pájaro, murciélago o mono. Durante algún tiempo, después de la germinación de la semilla, la nueva planta se comporta como epífita, vive en el árbol huésped pero no se nutre directamente de él como si fuera un parásito.

Los jóvenes *Ficus* estranguladores aceptan alojamiento, pero no pensión. Al principio su nutrición viene de la lluvia y de los desechos orgánicos que quedan al alcance de sus raíces. A medida que aumenta su tamaño desarrollan una o más raíces que descienden de forma independiente y empiezan a tomar nutrientes directamente del suelo. Las raíces laterales crecen de las primarias verticales y ambas envuelven gradualmente el tronco y ramas del huésped formando un complejo o fuerte cesto; en el caso de crecer sobre un edificio, se extienden sobre su superficie, se introducen por juntas y aperturas y pueden llegar a dañar seriamente su estructura. En su crecimiento, el *Ficus*, invade con sus ramas y hojas el techo o la parte alta del huésped y cierra el camino de la luz necesario para un correcto desarrollo. Al mismo tiempo que crecen, las raíces del *Ficus* ejercen una fuerte presión sobre la corteza del árbol donde están instalados y, eventualmente, interrumpen el flujo de la savia, con lo que pueden secar o incluso matar algunas partes o extensiones del árbol nodriza. Por lo general, los *Ficus* estranguladores no llegan a desarrollar troncos substanciales desde la parte superior de la cesta que forman sus raíces al asirse al árbol huésped, aunque a veces las mismas raíces producen el efecto de un tronco masivo. Algunos *Ficus* estranguladores tienen el hábito de mandar raíces, que se forman en sus ramas, a considerables distancias del tronco central, que se establecen en el suelo y se desarrollan en forma de gruesos soportes en forma de tronco.

La mayor parte de los *Ficus* tienen gran importancia por su uso como árboles de sombra o como plantas ornamentales.

### **Generalidades sobre el cultivo de los *Ficus*.-**

Los *Ficus* ornamentales no son especialmente exigentes de cara a su cultivo. Crecen y se desarrollan bien a pleno sol si reciben agua suficiente, pero soportan una tupida sombra y son excelentes (tienen un buen comportamiento) en sitios donde no hay mucho sol durante gran parte del día o donde reciben luz solar tamizada. Prosperan en cualquier suelo ordinario que no permita agua estancada o, lo que es lo mismo, que permita un buen drenaje. No se necesitan podas sistemáticas, aunque admiten ciertas actuaciones con impunidad y los tipos con tamaño de hoja pequeño reponen bien al esquila. En este sentido pueden cultivarse en sombra y permitirles crecer hasta un tamaño conveniente. Se pueden podar en cualquier época del año, pero lo más usual es hacerlo justo antes del comienzo de la estación de crecimiento. Esto es preferible porque las ramas cortadas son sustituidas rápidamente por los nuevos brotes que se desarrollan.

Los especímenes cultivados en macetas u otros contenedores deben tener un drenaje libre. El suelo debe ser moderadamente rico y grueso, no del tipo que con el paso del tiempo se vuelve tan compacto que la aireación de las raíces se ve seriamente afectada. Si la parte superior del sustrato es demasiado pesada (arcillosa), su textura puede mejorarse mediante la adición de una parte de ladrillo machacado.

El trasplante sólo es necesario a largos intervalos de, incluso, algunos años en el caso de grandes especímenes. Así como la carencia excesiva de agua en el sustrato es muy perjudicial para los *Ficus* en contenedor, un exceso de humedad en el mismo puede ser igual de desastroso o más. El régimen de riegos debería permitir, pues, una situación intermedia en el contenido de agua del suelo. Entre los riegos, conviene que el suelo quede completamente seco y cada vez que se riega, el sustrato debe saturarse completamente de agua. Las plantas que han llenado sus contenedores con raíces sanas se benefician de aplicaciones de fertilizante líquido diluido una vez al mes, desde marzo a septiembre. El resto del año no se requiere ningún otro tipo de fertilización.

En el interior, estos *Ficus* ornamentales, crecen mejor cuando la temperatura mínima no es inferior a los 15°C. Sin embargo, la tasa máxima de fijación de CO<sub>2</sub> se produce a los 15°C. Esta temperatura es significativamente más baja que la temperatura de crecimiento recomendada usualmente, que es de unos 20°C (Ceulemans *et al.*, 1985). Cuando los *Ficus* enmacetados comienzan a producir ramificaciones, éstas pueden cortarse hasta el grado deseado sin ningún problema. La reproducción de los *Ficus* puede hacerse por acodo aéreo, esquejes de tallo y esquejes de un segmento nodal con una hoja y una yema. Las clases trepadoras pueden reproducirse por división de mata. En el caso concreto del *Ficus lyrata* y del *Ficus elastica* el método de esqueje de un nudo con una hoja produce un número mayor de plantas por metro cuadrado de planta madre que el método del acodo aéreo (Poole y Conover, 1984).

Algo menos del 50% de los cultivadores de *Ficus lyrata* en Texas destinan todo el espacio disponible de sus invernaderos para la producción de planta acabada, es decir, planta en el formato y contenedor adecuados para su venta. El resto de cultivadores destinan más de la mitad del espacio de sus invernaderos para el cultivo de plantas madres para la obtención de esquejes, en vez de ocuparlos con la planta acabada o incluso comprar planta procedente de cultivo de tejidos. Krafka *et al.* (1990), realizaron un estudio en el que llegaron a la conclusión de que es más rentable convertir las áreas de planta madre en invernaderos de planta acabada listas para su comercialización. De esta forma, se pueden eliminar las grandes extensiones que ocupan las plantas madres con el suministro de pequeñas plantas de calidad procedentes de micropropagación.

Atendiendo a Romstad (1989), la temperatura óptima para la producción de brotes largos de *Ficus lyrata* es de 30°C. Si la temperatura es igual o superior a 33°C, disminuye el tamaño de las hojas, aumenta el número de las mismas y la altura de la planta se reduce mucho. A temperaturas altas la intensidad luminosa se convierte en un factor limitante, aunque esto puede evitarse durante los días cortos mediante el uso de luz artificial suplementaria. El crecimiento más adecuado en el *Ficus lyrata* se produce cuando las temperaturas oscilan entre 21-30°C.

**Plagas y enfermedades.-**

La antracnosis, mancha de la hoja y agalla de la corona son las principales enfermedades que afectan a estas plantas. Las plagas más importantes en los *Ficus* son los *mealybugs*, incluidos los *mealybugs* de raíces, *scales* y trips. Algunos nemátodos también pueden afectar las raíces de los *Ficus*.

**Descripción de los cultivares.-**

El *Ficus lyrata* es uno de los *Ficus* más decorativos, apreciado por sus hojas ovales y coriáceas de color verde brillante y su porte elegante debido a que crece sin ramificaciones. Hermoso y muy distinguido, el *F. lyrata* comienza su vida en la naturaleza como una planta epífita.

No se conocen muchas variedades del *F. lyrata*. Las más importantes<sup>2</sup> son:

**lyrata (pandurata)** (África del Oeste) *Fiddleleaf plant*. Árbol denso de hasta 12 metros de altura, con grandes hojas gruesas y carnosas de 30 a 60 cm de longitud, en forma de violín, con un ápice ancho y redondeado. Las hojas son de color verde brillante, con márgenes ondulados y con atractivas venas de color verde amarillento. Los frutos tienen unos puntos blancos característicos.

**lyrata "Phyllis Craig"** (Craig 1956, Patentado). Un variante enano del *lyrata*, más corto y más arbustivo que el parental, con nudos densamente espaciados, muy uniforme y muy decorativo, con hojas en forma de violín y de color verde oscuro brillante que contrasta con las venas de color claro. Puede llegar a alcanzar de 20 a 40 cm de longitud y tiene los márgenes ondulados.

---

<sup>2</sup> Tomado de Exotica 3: Pictorial encyclopedia of exotic plants. Guide to care of plants indoors. Graf, A.B. Century, 1970

<b>Tabla 1.- Número de laboratorios de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales que multiplican a gran escala plantas de <i>Ficus lyrata</i> en Europa</b>		
<b>Países</b>	<b>1990</b>	<b>1993</b>
Alemania	1	-
Bélgica	3	-
Bulgaria	-	1
República checa	-	1
Eslovaquia	-	2
España	2	3
Finlandia	2	-
Francia	3	1
Grecia	1	1
Italia	2	-
<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>9</b>

Tomado del Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories. Ediciones 1990 y 1993. Commission of the European Communities.

En la tabla anterior, se observa que el número total de laboratorios que propagan el *F. lyrata* descendió en el año 1993 con respecto al año 1990. Este descenso es mucho más importante si consideramos que en el año 1990 no se disponía de los datos correspondientes a los países del Este, mientras que en el año 1993 casi la mitad de los laboratorios que producen la planta pertenecen a esta área geográfica. Sorprendentemente en España ha aumentado el número de laboratorios que propagan el *F. lyrata*. Este hecho va en contra a la tendencia que siguen las empresas de los restantes países de la Unión Europea.

Según el catálogo de las plantas de maceta de la Oficina Holandesa de Flores del año 1997, en la actualidad se comercializan el *F. lyrata* y el *F. lyrata* "Bambino".

La producción de esta planta tropical con fines comerciales comenzó en 1903 y, puesto que se precisa una gran especialización, en Holanda sólo un número reducido de empresas florícolas se dedican a esta tarea. Estas empresas se ocupan también de la propagación mediante cultivo de meristemas, y proporcionan un gran número de plantas de gran calidad a los cultivadores interesados<sup>3</sup>.

En este momento asistimos a una creciente demanda de plantas de pequeño tamaño para el hogar. Una de estas variedades es el *Ficus lyrata* "Bambino", obtenida por las firmas

<sup>3</sup> Tomado de Flor Cultivo & Comercio. 1995. Número 5. pp. 43-44.



holandesas André de Gruyter B.V. y de Wilgenlei y presentada por primera vez en la Exposición Internacional de Floricultura, que se celebra cada año en Aalsmer. Como ya indica su nombre, el *Ficus lyrata* "Bambino" se caracteriza por su tamaño compacto. La rápida producción de hojas, que alcanzan un tamaño de 20 por 13 centímetros, hace que la planta cambie continuamente de aspecto.

Esta novedad ha suscitado tanto entusiasmo que se prevé que conquiste una cuota importante de las 700.000 plantas de *F. lyrata* que se venden anualmente en las subastas holandesas de flores.

El *F. lyrata* "Bambino" necesita mucha luz. Pero hay que tener cuidado de no exponer la planta al sol directo. Además hay que resguardar la planta de las corrientes de aire; de esta manera adquieren vigor y pasan sin problemas otra temporada en ambientes cerrados. Resiste muy bien tanto el frío como el calor: la temperatura mínima que soportan es de 13° C. En los meses invernales la temperatura ha de ser de 15-18° C.

Hay que regar la planta con regularidad pero a dosis pequeñas. En verano hay que mojar la planta 2 veces por semana, en invierno cada 10 días. Antes de regar hay que comprobar que el mantillo esté bien seco: el *F. lyrata* es muy sensible a los restaños de agua que pueden llegar a pudrir las raíces y, por consiguiente, causar la caída de las hojas. También es importante remover a menudo la capa superior del mantillo a fin de mejorar la absorción de agua. En verano, cada quince días hay que enriquecer el riego con un abono líquido; en invierno es suficiente abonar una vez al mes. Necesita un grado elevado de humedad. A fin de evitar una atmósfera demasiado seca que podría ocasionar la caída de las hojas, se aconseja rociar las hojas semanalmente con agua tibia y poco calcárea, añadiendo algunas gotas de estimulante hormonal.

Hay que limpiar regularmente las ramas con agua destilada para evitar que se formen depósitos de polvo. En primavera hay que transplantar el *F. lyrata*, pero sólo si las raíces se asoman por el mantillo. Para los ejemplares grandes es suficiente añadir una nueva capa de mantillo. No han de quitarse nunca las raíces aéreas.

**Nuevas características deseables.-**

El *Ficus lyrata* es una planta de gran desarrollo y veloz crecimiento. Produce hojas de gran tamaño y, sobre todo en verano, es capaz de producir un gran número de hojas, incluso una por semana. Presenta un gran dominio apical y, por tanto, una ausencia de ramificaciones. Todas estas características hacen que el *F. lyrata* sea una planta de difícil cultivo ya que si las hojas que produce no son lo suficientemente grandes, la distancia internodal es demasiado larga o si ha perdido algunas hojas se obtiene una planta desgarbada y poco compacta que será muy difícil de vender. Esto hace que sea una planta que se va a comercializar en formatos muy grandes con respecto a otras plantas de interior. Este hecho supone un problema añadido ya que se requiere mucho espacio para su transporte, con el consiguiente aumento del precio y, por otra parte sólo podrá ser destinada por los decoradores a espacios grandes, cada vez más escasos en la nueva arquitectura moderna. También se precisa un espacio muy grande para su cultivo en los invernaderos lo que va a encarecer en gran medida su precio final.

Dada la tendencia actual del mercado de producir plantas de pequeño tamaño y comercializarlas rápidamente, es muy habitual el uso de reguladores de crecimiento para la obtención de plantas compactas. Pero esta práctica es de resultados dudosos. Así, el paclobutrazol, un enanizante muy utilizado en las plantas ornamentales, suprime el crecimiento de plantas de *Ficus lyrata* a todas las temperaturas ensayadas (Poole y Conover, 1988). Los *Ficus lyrata* deberían adaptarse a esta tendencia del mercado para poder competir con otras plantas de interior en maceta. Una vía sería la obtención de nuevas variedades más compactas, e incluso de crecimiento más lento, con hojas más pequeñas y entrenudos más cortos, para facilitar el transporte y su posterior venta. El *Ficus lyrata* "Bambino" es un ejemplo de planta más compacta que el parental.

Otra posibilidad sería la comercialización de otras variedades lo suficientemente diferentes como para que despertaran el interés del consumidor, como por ejemplo una planta con hojas variegadas. Más aún, una planta de porte compacto y con las hojas variegadas sería ideal y podría suponer un aumento de la cuota de mercado que ya posee el *Ficus lyrata*.

## **Materiales y métodos.-**

### **Material vegetal y métodos para el cultivo *in vitro*.-**

Se establecieron *in vitro* líneas organogénicas procedentes de explantes de hoja de *Ficus lyrata* siguiendo el método descrito por Debergh y De Wall (1977). Los cultivos se iniciaron el 20 de noviembre de 1987 y tras doce subcultivos de 6-8 semanas apareció una planta con las hojas variegadas entre un lote de 1076 plantas que se enraizaron con fecha 26 de abril de 1989. La planta se detectó durante la fase de aclimatación *in vivo*.

Se cortaron trozos cuadrados de hoja de 1 centímetro de lado que contenían segmentos de vena central o principal y se lavaron con agua corriente. A continuación se desinfectaron mediante una inmersión rápida de 6-8 segundos en etanol al 70% y una solución de hipoclorito sódico (lejía comercial con 50 g/l de cloro activo) al 2% durante 15 minutos, a la que se añadieron 2 gotas/100 ml de Tween 20. Después de tres lavados en agua destilada estéril (5-10 minutos cada uno), se redujeron los cuadraditos de hojas hasta un tamaño de 0,5 cm de lado, para eliminar los bordes quemados por la acción de la lejía, y se instalaron en tubos de ensayo de vidrio de 25x100 mm, cubiertos con tapones de polipropileno y sellados con Parafilm, que contenían 15 ml de medio de cultivo cada uno.

El medio de cultivo para el establecimiento de los explantes de hoja y para su posterior multiplicación consistía en los macroelementos de Murashige y Skoog (1962), los microelementos de Nitsch & Nitsch (1970); 20 mg/l de ácido ascórbico; 20 g/l de ácido cítrico; 0,1 mg/l de tiamina; 0,5 mg/l de piridoxina; 0,5 mg/l de ácido nicotínico; 100 mg/l de mio-inositol; 20 g/l sacarosa; 7 g/l de agar industrial Pronadisa; 2,5 mg/l de IBA y 2,5 mg/l de BAP. El pH se ajustó a 5,7 mediante la adición de unas gotas de KOH 1N. Los recipientes de cultivo con el medio nutritivo se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Durante la primera semana, los explantes recién implantados, se mantuvieron en oscuridad y a continuación se incubaron a una temperatura de 23±2°C bajo una intensidad luminosa de 1500 lux, tanto durante el resto de la fase de iniciación como durante las fases de multiplicación y enraizamiento. El fotoperíodo fue de 16 horas luz/8 horas de oscuridad.

El medio de enraizamiento consistía en los macroelementos MS (Murashige y Skoog 1962) diluidos a la mitad, la totalidad de los microelementos MS; 0,2 mg/l de tiamina; 1 mg/l de ácido nicotínico; 1 mg/l de piridoxina; 100 mg/l de myo-inositol; 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar industrial. El pH del medio de cultivo y el método de esterilización fueron los mismos que para la fase de iniciación y multiplicación.

Los frascos de cultivo utilizados durante las diferentes fases de cultivo *in vitro* fueron del modelo B-60 de Vicasa (400 ml de volumen y de cristal) y cubiertos con tapa de rosca de PVC. Cada frasco contenía unos 80-100 ml de medio de cultivo. En cada recipiente se introducían 15 inóculos en la fase de multiplicación y 35-40 brotes individualizados en la fase de enraizamiento.

Los inóculos que se sembraban en el medio de cultivo durante la fase de multiplicación (de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) resultaban de la subdivisión de los callos organogénicos que se obtenían a lo largo de varios subcultivos durante la fase de iniciación. Estos subcultivos tenían una duración de unas 8-10 semanas y se realizaban de manera consecutiva. Para el enraizamiento se individualizaban los brotes procedentes de los callos después de la fase de multiplicación y se repicaban al medio de enraizamiento en el que permanecían unas 3-4 semanas hasta obtener plantas aptas para superar la fase de aclimatación.

El variante de hojas variegatas *Ficus lyrata* "Ivonne", que se detectó a simple vista en la fase de aclimatación, se reintrodujo en cultivo *in vitro* con vistas a comprobar su estabilidad fenotípica y para propagarlo a gran escala. Para el establecimiento *in vitro* y la iniciación del cultivo se tomó la yema apical de la única planta con este fenotipo a los dos meses del inicio del proceso de aclimatación en invernadero.

Se aisló la yema apical junto con 1 cm de tallo adyacente, se desinfectó con sumo cuidado en una solución suave de hipoclorito sódico (lejía comercial con 50 g/l de cloro activo) al 1% durante 10 min a la que se añadieron 2 gotas/100 ml de tween 20. Se eliminó la lejía con 3 lavados de agua destilada estéril (10 min cada uno) y se estableció el ápice *in vitro* en un tubo de 25x150 mm con 15 ml de medio de cultivo.

El medio de iniciación, que fue también el utilizado durante la fase de multiplicación, consistía en los macroelementos de Murashige y Skoog (1962); microelementos de Nitsch &

Nitsch; 100 mg/l myo-inositol; 170 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,4 mg/l tiamina; 80 mg/l de sulfato de adenina; 30 g/l de sacarosa; 7g/l de agar-agar; 0,25 mg/l BAP y 0,05 mg/l IBA. El medio de enraizamiento era similar al utilizado para las plantas salvajes de *F. lyrata*.

La temperatura, la intensidad luminosa, el fotoperiodo, los frascos de cultivo y el número de inóculos durante las fases de multiplicación y enraizamiento fueron idénticos a los descritos anteriormente para la multiplicación *in vitro* de *Ficus Lyrata* salvaje.

Los brotes que aparecían en los sucesivos subcultivos (cada 4-5 semanas) durante la fase de mutiplicación se individualizaban y repicaron a medio de cultivo fresco, para seguir aumentando el número de plantas de *Ficus* "Ivonne" o, alternativamente, se pasaban a medio de enraizamiento para obtener plantas que ya podían ser aclimatadas en el invernadero.

Durante la fase de multiplicación *in vitro* del *F. lyrata*, los operarios encargados de realizar las sucesivas transferencias del material vegetal en las cabinas de flujo laminar, seleccionaron en cada subcultivo los inóculos que transferían a medio fresco, con objeto de mantener durante el mayor tiempo posible el fenotipo variegado. De hecho, el fenotipo de las plantas de *F. lyrata* "Ivonne" permaneció estable con una excepción. Al cabo de unos 10 subcultivos se detectó en un callo una plantita con las hojas aparentemente verdes. Al aumentar el tamaño se vio que, en realidad, las hojas presentaban dos tonalidades de color verde: una más clara alrededor de la vena central y otra más oscura (de la misma intensidad que en el salvaje) alrededor de la misma. Se aisló esta plantita y se cultivó *in vitro* siguiendo el procedimiento utilizado para el *F. lyrata* "Ivonne". Posteriormente, se propagó para comprobar su estabilidad fenotípica y hacer un estudio comparativo con respecto al parental salvaje y el variante "Ivonne". Al nuevo variante se le dio el nombre de *Ficus lyrata* "Ivonne-2".

#### **Aclimatación del material vegetal.-**

Después de tres o cuatro semanas de permanecer en el medio de enraizamiento, las plantitas del parental salvaje *Ficus lyrata* y de los variantes "Ivonne" e "Ivonne 2" se transplantaban a packs con celdillas de 4 cm de lado. El sustrato era una mezcla de turba, perlita y arena en una relación 3:1:1. La aclimatación de las nuevas plantas a condiciones normales de crecimiento tenía lugar en invernadero, bajo túnel de plástico, que proporcionaba un nivel de sombra adecuado, con riegos intermitentes por aspersión con la frecuencia necesaria

---

para mantener un nivel alto de humedad alrededor de la planta, y con calefacción por medio de cama caliente, durante los primeros quince días.

Las condiciones de humedad y temperatura ambiente a las que eran sometidas las plantas así como los tratamientos fitosanitarios preventivos eran similares a los empleados en los procesos de aclimatación de otras plantas.

Tras la aclimatación, las plantas se cultivaron en invernaderos de tipo prefabricado de placa ondulada y cubierta de PVC, con refrigeración de apertura cenital. Se eliminó cualquier tipo de malla de sombreo ya que los *Ficus* -plantas leñosas y arbustivas- no sólo toleran sino que requieren, para su mejor crecimiento, una mayor intensidad luminosa, sobre todo en verano que es cuando producen una gran cantidad de hojas en un periodo de tiempo muy corto. Se llevaron a cabo trasplantes a contenedores gradualmente mayores, de forma sucesiva en distintas épocas del año en función de las diferentes necesidades de tamaño de contenedor y nutrientes que presentaron las plantas durante su cultivo. En general, se intentaba hacer el trasplante a principios de primavera, durante los meses de marzo o abril, que es cuando se aprovecha, e incluso se favorece, el momento óptimo de desarrollo de las plantas. Los formatos utilizados oscilaban entre los 9 y 25 cm de diámetro, pasando por los de 14 y 17 cm de diámetro.

Durante el cultivo en los invernaderos se realizaron fertilizaciones, tratamientos fitosanitarios y riegos de forma continua, con la frecuencia requerida en cada estación y dependiendo de las diferentes situaciones climáticas. Así, en verano, cuando la velocidad de crecimiento es muy alta, el riego y los abonados eran muy frecuentes. Las plantas se cultivaron hasta alcanzar el tamaño máximo adecuado para su comercialización que era en contenedor de 25 cm de diámetro. Esto ocurrió, aproximadamente, a los dos años a partir de la etapa de aclimatación.

### **Caracterización fenotípica de los nuevos variantes somaclonales.-**

Se estudiaron diversas características del *Ficus lyrata* y de los variantes "Ivonne" e "Ivonne-2" a lo largo del tiempo. En la primera, segunda y tercera hojas desarrolladas de cada planta se midieron las siguientes variables: longitud de las hojas, anchura de las hojas, longitud y anchura de la zona de color verde en el "Ivonne", longitud y la anchura de la zona de color

verde claro en el "Ivonne-2", altura total de la planta, número total de hojas, distancia internodal, número de nudos y peso fresco (g).

Con el fin de estudiar la evolución de las características de las plantas a lo largo del tiempo, las medidas se realizaron en distintas fases de crecimiento: i) Después de varios subcultivos en la etapa de enraizamiento *in vitro*; ii) Después de un año de cultivo en invernadero en maceta de 14 cm de diámetro; iii) Después de dos años de cultivo en invernadero en maceta de 14 cm de diámetro; iv) Después de 4 años de cultivo en invernadero en maceta de 14 cm de diámetro.

El número de plantas sobre las que se hacían estas anotaciones dependía de la fase de crecimiento en que se encontraban las plantas y de la cantidad de material vegetal disponible en cada momento. Así, después de la etapa de enraizamiento *in vitro*, se caracterizaron 5 plantas de cada tipo. Posteriormente, y tras un año de cultivo en los invernaderos se tomaron las medidas en 4 plantas de *F. lyrata* estándar, 8 de *F. lyrata* "Ivonne" y 4 de *F. lyrata* "Ivonne 2". Después de dos años de crecimiento, se midieron las características de 3 plantas de cada tipo. Finalmente, a los cuatro años se realizaron anotaciones en 3 plantas del "Ivonne", una del *F. lyrata* estándar y una del "Ivonne-2".

Se midió también el área de la primera hoja desarrollada, la altura total de la planta, el número de hojas totales y la distancia internodal en los tres cultivares. En los variantes variegados "Ivonne" e "Ivonne-2" se midió el área de la zona no variegada y el área de la zona de color verde claro, respectivamente, de las primeras hojas desarrolladas en las cuatro fases de cultivo.

Para estudiar los distintos grados y tipos de variegación que presentan las hojas de los variantes, se procedió a la determinación, en análisis independientes y en diferentes fechas del año, del contenido en clorofilas a y b y clorofila total en las hojas de las plantas. Se tomaron muestras de hojas de *Ficus lyrata*, *Ficus lyrata* "Ivonne" y *Ficus lyrata* "Ivonne2" de plantas de dos años de edad en septiembre, octubre y noviembre. Las trozos de las hojas seleccionadas de los variantes variegados contenían, a partes iguales, zonas representativas de las superficies con diferente color para que los resultados reflejaran un valor medio aproximado del contenido total de clorofila por gramo de hoja.

En otro experimento posterior se tomaron trozos de hojas que procedían de zonas con un color concreto ( blanco, verde oscuro o verde claro, según el cultivar) para comparar los contenidos en clorofila en cada área de diferente color. Esto se realizó en los tres cultivares.

### **Método para la determinación de las clorofilas.-**

Para la determinación de la clorofila se ha seguido el método colorimétrico descrito en AOAC (1975). Se introdujeron de 0,5 a 1 g de hojas (según el contenido en clorofila) finamente dividido en un triturador. El triturado obtenido, se filtró a través de papel Whatman nº 2 a un kitasato, con ayuda de succión mediante trompa de agua, lavando con acetona al 80% hasta que la pulpa retenida sobre el papel fuese incolora o ligeramente amarillenta (la cantidad de acetona utilizadas en el triturado y en el lavado fue de 100 ml). El extracto acetónico se pasó a un embudo de decantación que contenía unos 40 ml de éter etílico donde se vertió la misma cantidad de agua destilada para favorecer el paso de los pigmentos al éter. La fase éter se lavó tres veces con 75 ml de agua destilada, haciendo salir el extracto por el extremo del embudo inmerso en el agua destilada contenida en otro embudo de decantación colocado debajo.

Después de eliminar el agua del último lavado, se aforó a 50 ml con éter etílico y se añadió sulfato sódico anhidro ( en proporción de 7,5 g/25 ml) para eliminar los últimos restos de agua.

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 662 y 644,5 nm utilizando éter etílico como blanco. Los resultados se expresan como mg de clorofila por gramo de tejido fresco, según las fórmulas:

$$\text{Clorofila total (mg/l)} = 7,12 \times A_{662} + 16,8 \times A_{644,5}$$

$$\text{Clorofila a (mg/l)} = 9,93 \times A_{662} - 0,777 \times A_{644,5}$$

$$\text{Clorofila b (mg/l)} = 17,6 \times A_{644,5} - 2,81 \times A_{662}$$

y transformando estos valores en:

$$\text{mg de clorofila/g de peso fresco} = \frac{\text{mg de clorofila} / \text{lx} \cdot 50}{1000 \times \text{g de peso fresco}}$$



## **Resultados y discusión.-**

Durante la aclimatación de una tanda de plantas de *Ficus lyrata*, se identificó una con las hojas claramente variegadas que contrastaba con el resto de plantas de hojas completamente verdes. Las plantas procedían de una línea celular permanente organogénica de *F. lyrata* mantenida por subcultivos repetidos durante unos dos años. Después de superar la transferencia de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, la planta se multiplicó clonalmente siguiendo el método descrito en el apartado de materiales y métodos. El fenotipo variegado se mantuvo a lo largo de las sucesivas fases de la propagación, es decir, durante las fases de multiplicación *in vitro*, enraizamiento *in vitro* y aclimatación *in vivo*. Así, entre el 20.04.90 y el 26.09.95 se realizaron más de 35 subcultivos, con una periodicidad de unas 5-8 semanas, y se aclimataron 32.241 plantitas que conservaban, todas ellas, el fenotipo del variante original.

El transplante a suelo de las plantas variantes propagadas *in vitro* se llevó a cabo sin problemas y se alcanzó un alto porcentaje de supervivencia. Así el 30.05.95 se aclimataron 650 plantas de un lote de 658 enraizadas *in vitro*, es decir el 98,78%; el 20.01.92 se aclimataron 1200 plantas de un lote de 1268 enraizadas *in vitro*, es decir el 94,64%; el 29.11.94 se aclimataron 1650 plantas de un lote de 1695 plantas enraizadas *in vitro*, es decir el 97,34% y el 24.09.95 se aclimataron 1008 plantas de un lote de 1020 enraizadas *in vitro*. Estos datos indican que la aclimatación puede lograrse en casi el 100% de las plantas transplantadas.

Al cabo de 10 subcultivos *in vitro* del *Ficus lyrata* "Ivonne", el 30.05.91 se detectó una plantita en un callo organogénico que, aparentemente, tenía las hojas de color verde, es decir no seguía el mismo patrón de variegación que presentaban el resto de las plantitas del callo. Se aisló la planta y se cultivó *in vitro* en el medio de enraizamiento descrito para el *Ficus lyrata*, hasta que, al aumentar su tamaño, se observó que, en realidad, las hojas presentaban dos tonalidades de color verde: la zona central, alrededor de la vena principal, era de color verde más claro, mientras que la zona periférica era de color verde oscuro, con la misma intensidad de verde que poseería una hoja de *Ficus lyrata* estándar. A este nuevo variante lo denominamos como *F. lyrata* "Ivonne-2".

Se compararon las características de las plantas del *F. lyrata* salvaje y de los variantes "Ivonne" e "Ivonne-2" en la fase de enraizamiento *in vitro*, después de 5 subcultivos de 5 semanas cada uno (Tabla 1). En cada subcultivo, las plantas se transferían a medio fresco y se eliminaban las raíces que habían desarrollado. Se observó que los valores correspondientes a la

longitud de la 1ª, 2ª y 3ª hoja desarrollada eran muy parecidos en los tres cultivares, con la excepción de la 2ª hoja más desarrollada del *Ficus lyrata* "Ivonne-2" que alcanzaba los 3,74±0,13 cm frente a los 2,67±0,13 cm del "Ivonne" y los 2,79±0,24 cm del cv. estándar. En general, la longitud de las hojas de los cultivares de hoja verde (estándar e "Ivonne-2") tendía a ser mayor que la del cultivar "Ivonne" de hojas variegadas

**Tabla 2.-** Características del *Ficus lyrata* "Ivonne", "Ivonne-2" y estándar después de varios subcultivos en la fase de enraizamiento *in vitro* (1).

VARIABLES	"Ivonne"	"Ivonne-2"	Estándar
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	2,24±0,16	2,30±0,10	2,32±0,10
2ª hoja desarrollada	2,67±0,13	3,74±0,13	2,79±0,24
3ª hoja desarrollada	2,24±0,12	3,09±0,16	2,68±0,17
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	1,22±0,07	1,41±0,08	1,36±0,06
2ª hoja desarrollada	1,34±0,05	2,15±0,08	1,82±0,09
3ª hoja desarrollada	1,29±0,16	1,60±0,08	1,44±0,05
<b>Longitud del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	1,60±0,32	1,12±0,27	-
2ª hoja desarrollada	2,19±0,16	2,56±0,30	-
3ª hoja desarrollada	1,85±0,17	0,87±0,32	-
<b>Anchura del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	0,68±0,12	0,29±0,05	-
2ª hoja desarrollada	0,68±0,09	0,83±0,09	-
3ª hoja desarrollada	0,76±0,04	0,28±0,08	-
<b>Altura de la planta total (cm)</b>	3,26±0,20	3,11±0,28	3,04±0,15
<b>Nº total de hojas</b>	7,40±0,40	4,20±0,49	5,00±0,45
<b>Longitud internodal (cm) (3)</b>	0,25±0,03	0,31±0,02	0,30±0,01
<b>Nº de nudos</b>	13,40±1,08	10,60±0,40	10,00±0,32
<b>Peso (g)</b>			
1ª hoja desarrollada	23,58±2,51	27,56±3,78	26,00±1,21
2ª hoja desarrollada	31,02±1,92	72,40±5,79	47,90±6,86
3ª hoja desarrollada	24,54±2,54	42,62±4,73	40,24±6,24

(1) Edad: 5 meses. Fecha 18/02/97.

(2) Se refiere a las zonas de distintos colores de las hojas. En el *Ficus lyrata* "Ivonne" es el área correspondiente a la zona verde de la hoja y en el *Ficus lyrata* "Ivonne 2" es la correspondiente a la zona de color verde claro.

(3) Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.

En los valores correspondientes a la anchura de las hojas se observó un patrón similar, es decir, el valor máximo se dió en la 2ª hoja desarrollada del variante "Ivonne-2" y, al mismo tiempo, se puso en evidencia la tendencia a que las hojas de las plantas de hojas verdes fueran ligeramente mayores que las del "Ivonne".

La altura total de la planta fue similar en los tres cultivares. Sin embargo, el número de hojas totales resultó ser mayor en el *Ficus lyrata* "Ivonne" (7,40±0,40) que en el *Ficus lyrata* estándar (4,20±0,49) y en el *Ficus lyrata* "Ivonne-2" (5,00±0,45). Del mismo modo, el número de nudos fue mayor en el "Ivonne" (13,40±1,08) que en el "Ivonne-2" (10,40±0,40) y en el estándar (10,00±0,32). Los valores correspondientes a la longitud y anchura de la zona variegada indicaron que el área de esta zona en el cv. "Ivonne" y el área de la zona de color verde claro en el variante "Ivonne-2" eran mayores en la segunda hoja desarrollada de cada cultivar (1,49 cm<sup>2</sup> y 2,12 cm<sup>2</sup> respectivamente).

En la tabla 2 se muestran las características de los tres cultivares de *Ficus lyrata*, después de 12 meses de cultivo en invernadero y en una maceta de 14 cm de diámetro. Se apreciaron diferencias claras en los tamaños de las hojas. En general, las hojas del *Ficus lyrata* estándar eran ligeramente mayores que las del "Ivonne-2" y mucho mayores que las del "Ivonne". Después del primer año de cultivo, las hojas con variegación verde-blanco ("Ivonne") verde oscuro-verde-claro ("Ivonne-2") se desarrollaron menos que las hojas completamente verdes (parental salvaje). Con el fin de poder apreciar mejor las diferencias en el tamaño de las hojas, se tomó el área de la hoja como un rectángulo cuyos lados eran la longitud y la anchura de la hoja. Empleando esta forma de medir la superficie, el tamaño de la 2ª hoja desarrollada en el *Ficus lyrata* estándar era de 374,75 cm<sup>2</sup>, en el "Ivonne-2" de 262,53 cm<sup>2</sup> y en el "Ivonne" de 96,96 cm<sup>2</sup>. De estos valores se deduce que, al cabo de un año de cultivo en invernadero, las hojas del parental eran un 30% mayores que las del "Ivonne 2" y cuatro veces más grandes que las del "Ivonne".

**Tabla 3.-** Características del *Ficus lyrata* "Ivonne", "Ivonne-2" y estándar después de 1 año de cultivo(1) en invernadero.

VARIABLES	"Ivonne"	"Ivonne-2"	Estándar
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	14,25 $\pm$ 1,27	16,62 $\pm$ 0,81	21,15 $\pm$ 1,20
2ª hoja desarrollada	13,21 $\pm$ 0,48	20,32 $\pm$ 1,42	23,09 $\pm$ 2,34
3ª hoja desarrollada	12,34 $\pm$ 0,36	16,76 $\pm$ 1,08	15,68 $\pm$ 1,13
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	7,81 $\pm$ 1,06	10,33 $\pm$ 0,95	15,19 $\pm$ 1,15
2ª hoja desarrollada	7,34 $\pm$ 0,64	12,92 $\pm$ 0,78	16,23 $\pm$ 1,91
3ª hoja desarrollada	7,00 $\pm$ 0,46	10,14 $\pm$ 0,84	10,68 $\pm$ 0,74
<b>Longitud del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	13,44 $\pm$ 0,93	13,18 $\pm$ 1,54	-
2ª hoja desarrollada	12,49 $\pm$ 0,29	15,18 $\pm$ 1,55	-
3ª hoja desarrollada	11,56 $\pm$ 0,57	9,58 $\pm$ 1,56	-
<b>Anchura del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	6,88 $\pm$ 0,87	4,52 $\pm$ 0,69	-
2ª hoja desarrollada	5,83 $\pm$ 0,67	7,78 $\pm$ 0,88	-
3ª hoja desarrollada	5,74 $\pm$ 0,63	4,28 $\pm$ 1,04	-
<b>Altura de la planta total (cm)</b>	7,95 $\pm$ 0,06	13,95 $\pm$ 1,87	21,45 $\pm$ 2,26
<b>Nº total de hojas</b>	6,50 $\pm$ 0,65	9,00 $\pm$ 0,45	9,75 $\pm$ 0,25
<b>Longitud internodal (cm) (3)</b>	0,69 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,16	1,86 $\pm$ 0,16
<b>Nº de nudos</b>	11,50 $\pm$ 0,29	11,60 $\pm$ 0,24	11,50 $\pm$ 0,29
<b>Peso (g)</b>			
1ª hoja desarrollada	2,15 $\pm$ 0,56	3,48 $\pm$ 0,56	7,00 $\pm$ 1,35
2ª hoja desarrollada	1,73 $\pm$ 0,14	5,62 $\pm$ 0,99	9,70 $\pm$ 1,47
3ª hoja desarrollada	1,43 $\pm$ 0,06	3,22 $\pm$ 0,56	4,58 $\pm$ 2,01

(1) Cultivado en maceta de 14 cm de diámetro. Fecha: 19/12/96.

(2) Se refiere a las zonas de distintos colores de las hojas. En el *Ficus lyrata* "Ivonne" es el área correspondiente a la zona verde de la hoja y en el *Ficus lyrata* "Ivonne 2" es la correspondiente a la zona de color verde claro

(3) Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.

Se apreciaron diferencias muy grandes en la altura total de la planta: 21,45 $\pm$ 2,26 cm en el *F. lyrata* estándar; 13,95 $\pm$ 1,87 cm en el "Ivonne-2" y 7,95 $\pm$ 0,06 cm en el "Ivonne". El número total de hojas fue mayor en los cultivares de hoja verde (estándar e "Ivonne-2") que en el "Ivonne", y la longitud internodal tenía una relación de 1:2:3 en las plantas del "Ivonne", "Ivonne-2" y *F. lyrata* estándar, respectivamente. El número de nudos fue el mismo para los tres cultivares y los pesos de la 1ª, 2ª y 3ª hojas desarrolladas fueron más grandes en el "Ivonne" que en el "Ivonne 2" y en el *F. lyrata* estándar. Las hojas de mayor tamaño en los tres cultivares eran las segundas hojas desarrolladas.

**Tabla 4.-** Características del *Ficus lyrata* "Ivonne", "Ivonne-2" y estándar después de 2 años de cultivo(1) en invernadero.

VARIABLES	"Ivonne"	"Ivonne-2"	Estándar
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	12,03 $\pm$ 0,24	20,70 $\pm$ 3,17	18,87 $\pm$ 2,88
2ª hoja desarrollada	13,80 $\pm$ 1,31	23,33 $\pm$ 2,44	23,15 $\pm$ 2,14
3ª hoja desarrollada	12,70 $\pm$ 1,29	20,37 $\pm$ 1,82	22,65 $\pm$ 1,12
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	8,10 $\pm$ 0,46	12,67 $\pm$ 2,48	11,30 $\pm$ 1,75
2ª hoja desarrollada	8,37 $\pm$ 0,82	16,07 $\pm$ 2,16	16,73 $\pm$ 1,67
3ª hoja desarrollada	8,28 $\pm$ 1,03	13,43 $\pm$ 2,08	15,77 $\pm$ 0,99
<b>Longitud del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	11,50 $\pm$ 0,23	11,23 $\pm$ 1,39	-
2ª hoja desarrollada	12,03 $\pm$ 1,59	16,90 $\pm$ 3,85	-
3ª hoja desarrollada	11,73 $\pm$ 1,64	9,40 $\pm$ 1,32	-
<b>Anchura del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	6,20 $\pm$ 0,50	4,27 $\pm$ 1,07	-
2ª hoja desarrollada	6,30 $\pm$ 0,66	5,23 $\pm$ 0,43	-
3ª hoja desarrollada	6,33 $\pm$ 1,11	2,33 $\pm$ 0,64	-
<b>Altura de la planta total (cm)</b>	17,13 $\pm$ 1,96	26,17 $\pm$ 3,42	40,50 $\pm$ 2,29
<b>Nº total de hojas</b>	18,67 $\pm$ 0,33	14,33 $\pm$ 2,33	13,33 $\pm$ 0,67
<b>Longitud internodal (cm) (3)</b>	0,91 $\pm$ 0,13	1,84 $\pm$ 0,05	2,98 $\pm$ 0,10
<b>Nº de nudos</b>	18,67 $\pm$ 0,33	14,33 $\pm$ 2,33	13,67 $\pm$ 1,20
<b>Peso (g)</b>			
1ª hoja desarrollada	1,53 $\pm$ 0,09	6,97 $\pm$ 2,58	5,03 $\pm$ 1,43
2ª hoja desarrollada	1,80 $\pm$ 0,47	8,83 $\pm$ 2,73	8,33 $\pm$ 1,62
3ª hoja desarrollada	2,00 $\pm$ 0,45	6,13 $\pm$ 2,07	6,93 $\pm$ 0,75

(1) Cultivado en macetas de 14 cm de diámetro. Fecha:17/02/97.

(2) Se refiere a las zonas de distintos colores de las hojas. En el *Ficus lyrata* "Ivonne" es el área correspondiente a la zona verde de la hoja y en el *Ficus lyrata* "Ivonne-2" es la correspondiente a la zona de color verde claro

(3) Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.

A los dos años de cultivo en contenedor de 14 cm de diámetro en el invernadero, se tomaron nuevas medidas en las plantas de los 3 cultivares de *Ficus lyrata* (Tabla 3). El tamaño de las hojas no varió mucho con respecto al de las plantas de un año (ver Tabla 2). La hoja más grande fue, en todos los casos, la segunda y tanto la longitud como la anchura de la hoja se mantuvieron, a pesar del tiempo transcurrido, en el mismo orden de valores relativos que en las plantas de un año. La única diferencia que se observó en las plantas de 2 años con respecto a las de un año fue que la tercera hoja era mayor en los tres casos llegando a igualar el tamaño de las dos primeras hojas desarrolladas. Como consecuencia, las plantas presentaban un aspecto más homogéneo. Las diferencias en los tamaños de las hojas más desarrolladas se mantuvieron en

los tres cultivares. Así la segunda hoja del *Ficus lyrata* tenía una superficie de unos 387,30 cm<sup>2</sup> y la del *Ficus lyrata* "Ivonne" de unos 115,50 cm<sup>2</sup>.

La extensión de la zona verde en las hojas de plantas de dos años del "Ivonne" era del mismo tamaño que en las hojas de las plantas de 1 año, y lo mismo se puede decir de la extensión de la zona de color verde claro de las hojas del "Ivonne2" en las plantas de uno y dos años, respectivamente.

Sin embargo, la altura de las plantas en los tres genotipos de *Ficus lyrata* aumentó de forma considerable y se pudieron apreciar grandes diferencias entre los tres cultivares. El *Ficus lyrata* estándar alcanzó los 40,50±2,29 cm, el "Ivonne2" llegó hasta los 26,17±3,42 cm de altura, mientras que el *Ficus lyrata* "Ivonne" sólo alcanzó los 17,13±1,96 cm de altura. Al igual que sucedía en las plantas de un año, la relación 1:2:3 de la distancia internodal entre los tres cultivares se mantuvo en las plantas de dos años, aunque, en valores absolutos, las longitudes aumentaron en cada cultivar. El número total de hojas y el número de nudos fueron mayores en el variante variegado "Ivonne" que en el "Ivonne-2" y en el *Ficus lyrata* estándar.

Plantas representativas de los tres tipos se mantuvieron en los invernaderos en macetas de 14 cm de diámetro durante unos cuatro años. Al cabo de este tiempo se tomaron nuevas medidas y los resultados se muestran en la tabla 4. Conviene resaltar que los datos correspondientes al "Ivonne-2" y al *F. lyrata* estándar pueden ser poco representativos porque sólo se pudieron tomar en una planta de cada tipo.

Los valores correspondientes a la longitud y anchura de las hojas indican que, tal y como sucedía en los dos primeros años de cultivo, durante el tercer y cuarto años no se produjo un aumento en el tamaño de las hojas del *Ficus lyrata* "Ivonne-2" ni en las del *Ficus lyrata* estándar (ver Tabla 3, donde se muestran los valores en plantas de dos años). Sin embargo, sí que se produjo un aumento espectacular en el tamaño de las hojas del variante "Ivonne" durante el tercer y cuarto año de cultivo. En efecto, a los cuatro años el tamaño de la primera hoja desarrollada de plantas del "Ivonne" era de unos 288,43 cm<sup>2</sup> mientras que a los dos años el tamaño de la misma hoja era de tan sólo 97,44 cm<sup>2</sup>.

En las plantas de uno y dos años se apreciaron grandes diferencias entre los tamaños de las hojas del cultivar "Ivonne" con respecto al de los cultivares "Ivonne-2" y estándar. En

cambio, en las plantas de 4 años las diferencias se redujeron debido, sobre todo, al aumento del tamaño de las hojas del variante "Ivonne" y al casi nulo crecimiento de las hojas de los cultivares de hoja verde.

**Tabla 5.-** Características de *Ficus lyrata* "Ivonne", "Ivonne-2" y estándar después de 4 años de cultivo(1) en invernadero.

VARIABLE	Ivonne	Ivonne-2	Estándar
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	20,03±0,74	23,30	23,00
2ª hoja desarrollada	17,78±1,39	24,20	19,50
3ª hoja desarrollada	18,33±1,07	20,70	23,70
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	14,40±0,91	15,90	13,80
2ª hoja desarrollada	13,90±1,67	17,40	13,30
3ª hoja desarrollada	13,83±0,91	15,30	14,30
<b>Longitud del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	19,20±0,90	17,00	-
2ª hoja desarrollada	16,47±2,21	22,00	-
3ª hoja desarrollada	17,90±1,06	12,50	-
<b>Anchura del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	11,80±1,12	2,40	-
2ª hoja desarrollada	11,17±1,84	5,20	-
3ª hoja desarrollada	10,60±1,53	1,80	-
<b>Altura de la planta total (cm)</b>	42,33±0,60	74,80	71,00
<b>Nº total de hojas</b>	25,00±0,58	28	29
<b>Longitud internodal (cm) (3)</b>	1,13±0,01	1,74	1,65
<b>Nº de nudos</b>	37,33±0,33	43	43
<b>Peso (g)</b>			
1ª hoja desarrollada	6,17±0,81	9,20	8,20
2ª hoja desarrollada	5,33±0,93	11,00	9,80
3ª hoja desarrollada	5,50±0,78	6,40	7,10

(1) Cultivado en maceta de 14 cm de diámetro. Fecha: 17/02/97.

(2) Se refiere a las zonas de distintos colores de las hojas. En el *Ficus lyrata* "Ivonne" es el área correspondiente a la zona verde de la hoja y en el *Ficus lyrata* "Ivonne-2" es la correspondiente a la zona de color verde claro

(3) Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.

Por otro lado hubo un aumento de la extensión de la zona verde en las hojas del "Ivonne" y de la zona de color verde claro en las del "Ivonne-2". En el primer caso, este aumento, fue proporcional al crecimiento que se produjo en el tamaño total de la hoja. En el caso del "Ivonne-2" las hojas de las plantas de 4 años no aumentaron de tamaño con respecto a las plantas de 2 años (e incluso de 1 año) pero la extensión de la zona de color verde claro sí lo hizo, principalmente en lo que se refiere a la longitud.

La altura total de las plantas del "Ivonne-2" y del *Ficus lyrata* estándar fue similar, (71,00 y 74,80 cm respectivamente) mientras que el "Ivonne" creció menos y sólo alcanzó los 42,33±0,60 cm de altura. El número total de hojas y de nudos fue ligeramente menor en el "Ivonne" que en los otros dos cultivares. Las longitudes internodales se igualaron en el "Ivonne2" y en el estándar, y, a pesar del gran crecimiento que había experimentado, fueron menores en el variante "Ivonne".

En otro ensayo paralelo se decapitó la yema apical de plantas de tres años de los tres genotipos, ("Ivonne", "Ivonne2" y del parentel *lyrata*). Las plantas decapitadas se cultivaron en invernadero, en macetas de 14 cm de diámetro, durante otro año adicional hasta obtener plantas de 4 años. Se eligió una planta significativa de cada tipo y se midieron las características (Tabla 5).

**Tabla 6.-** Características del *Ficus lyrata* "Ivonne", "Ivonne-2" y estándar en plantas decapitadas a los tres años y cultivadas(1) durante un año más en invernadero.

VARIABLE	Ivonne	Ivonne-2	Estándar
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	19,60	24,30	22,50
2ª hoja desarrollada	20,10	27,50	26,80
3ª hoja desarrollada	17,20	23,30	22,10
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	13,40	18,00	17,80
2ª hoja desarrollada	13,50	19,40	21,50
3ª hoja desarrollada	13,40	17,80	19,10
<b>Longitud del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	19,00	16,10	-
2ª hoja desarrollada	20,00	21,70	-
3ª hoja desarrollada	16,50	14,50	-
<b>Anchura del área central (cm) (2)</b>			
1ª hoja desarrollada	11,20	5,70	-
2ª hoja desarrollada	12,00	11,20	-
3ª hoja desarrollada	11,70	6,50	-
<b>Altura de la planta total (cm)</b>	41,50	57,50	54,50
<b>Nº total de hojas</b>	15,00	12,00	12,00
<b>Longitud internodal (cm) (3)</b>	1,06	1,47	1,36
<b>Nº de nudos</b>	39,00	39,00	40,00
<b>Peso (g)</b>			
1ª hoja desarrollada	7,20	12,20	9,10
2ª hoja desarrollada	7,50	16,80	14,70
3ª hoja desarrollada	6,60	13,40	11,70

(1) Cultivado en maceta de 14 cm de diámetro. Fecha: 17/02/97.

(2) Se refiere a las zonas de distintos colores de las hojas. En el *Ficus lyrata* "Ivonne" es el área correspondiente a la zona verde de la hoja y en el *Ficus lyrata* "Ivonne-2" es la correspondiente a la zona de color verde claro

(3) Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.



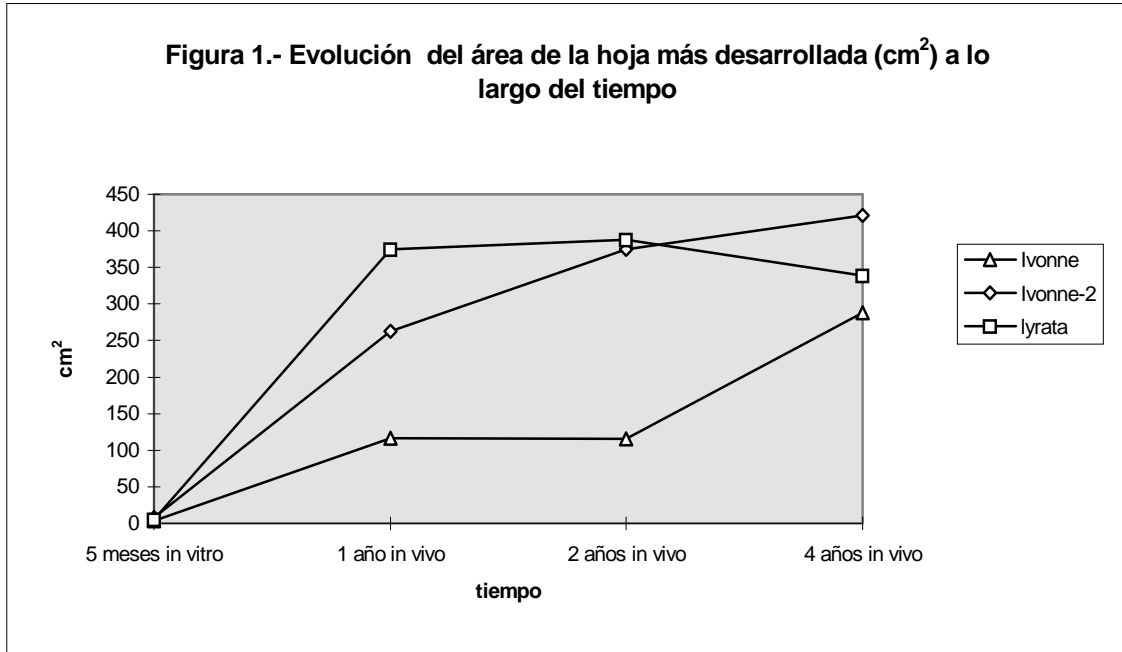
Al comparar estos nuevos datos con los de la Tabla 4 (que corresponden a plantas de 4 años no decapitadas) se observó que el tamaño de las tres primeras hojas y los valores de la extensión de la zona no variegada del "Ivonne" y de la zona de color verde claro del "Ivonne-2" se ven escasamente afectados por el proceso de decapitación. Otros parámetros que tampoco cambian son el número total de hojas, el número total de nudos y la longitud internodal.

En las siguientes figuras se muestra la evolución a lo largo del tiempo de los variantes, "Ivonne" e "Ivonne-2" y del parental *F. lyrata*. En la figura 1 se representa la evolución del área de la hoja más desarrollada a lo largo del tiempo. La superficie se ha estimado considerando la hoja como un rectángulo cuyos lados son la longitud y la anchura. Otra característica es la que se refiere a la extensión de la zona de color verde en las hojas del "Ivonne" y la extensión de la zona de color verde claro del "Ivonne-2" (fig. 2). Por último, el resto de características que se representan son la altura total de la planta (fig. 3), el número total de hojas (fig. 4) y la longitud o distancia internodal (fig. 5).

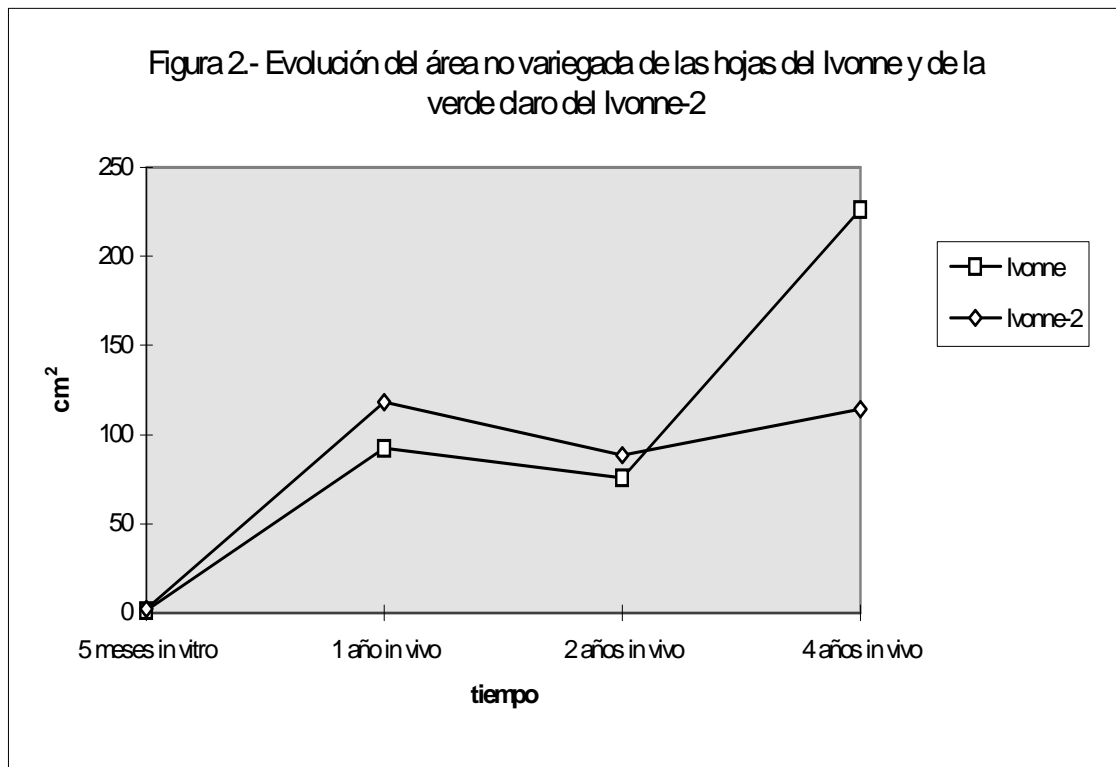
El tiempo se representa en el eje de las abscisas y los puntos que aparecen en los mismos corresponden a: i) Las plantas obtenidas después de varios subcultivos en la fase de enraizamiento *in vitro* (5 meses). ii) Después de 1 año de cultivo en invernadero. iii) A los 2 años de cultivo en invernadero. iv) A los 4 años de cultivo.

En la figura 1 se representa la evolución del tamaño de la hoja más desarrollada del "Ivonne", "Ivonne-2" y *F. lyrata* estándar a lo largo del tiempo.

En la mayoría de los casos la hoja más grande coincidía con la segunda hoja. Se observa que las hojas del "Ivonne" eran siempre menores que las del "Ivonne-2" y las del *Ficus lyrata* estándar. Las hojas del "Ivonne-2" fueron muy parecidas a las del *lyrata* estándar. Durante los dos primeros años de cultivo tenían un tamaño ligeramente inferior, aunque a los cuatro años de cultivo, las hojas de las plantas que no sufrieron ningún tipo de pinzamiento superaron en tamaño a las del parental salvaje.

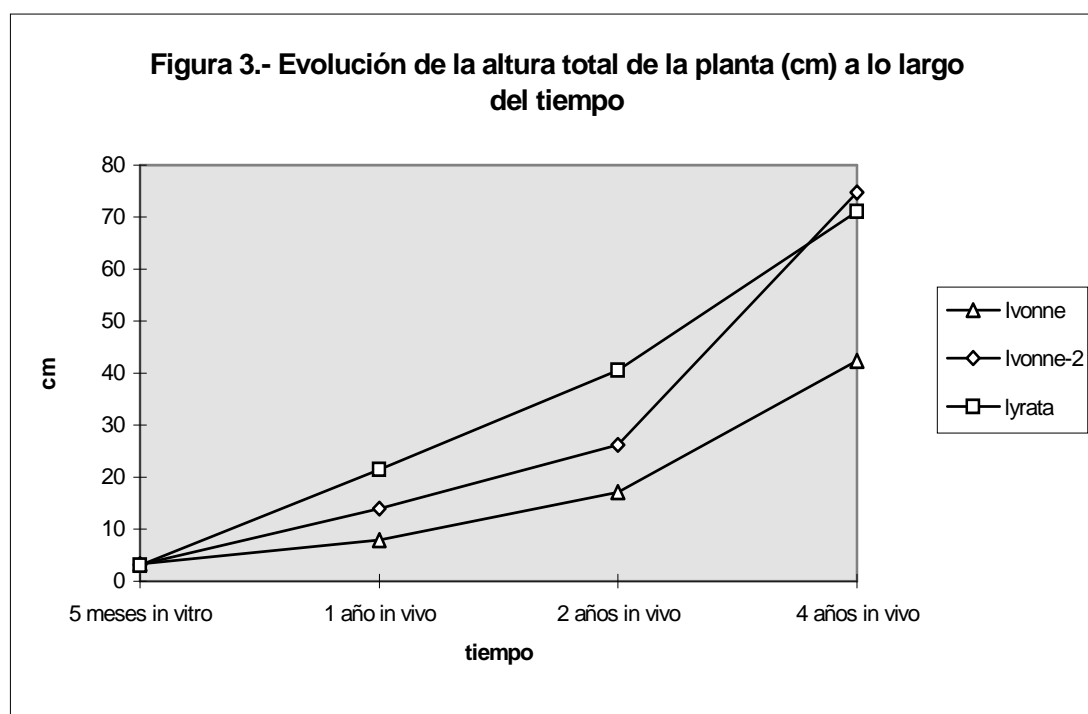


La evolución de la extensión de la zona de color verde en las hojas del "Ivonne" y de la zona verde claro en las hojas del "Ivonne-2" se representan en la figura 2. Durante los dos primeros años de cultivo, las áreas de color verde de las hojas del "Ivonne" fueron ligeramente menores que las zonas correspondientes de color verde claro del "Ivonne-2". Sin embargo, esta tendencia se invirtió a los cuatro años de manera muy notable.

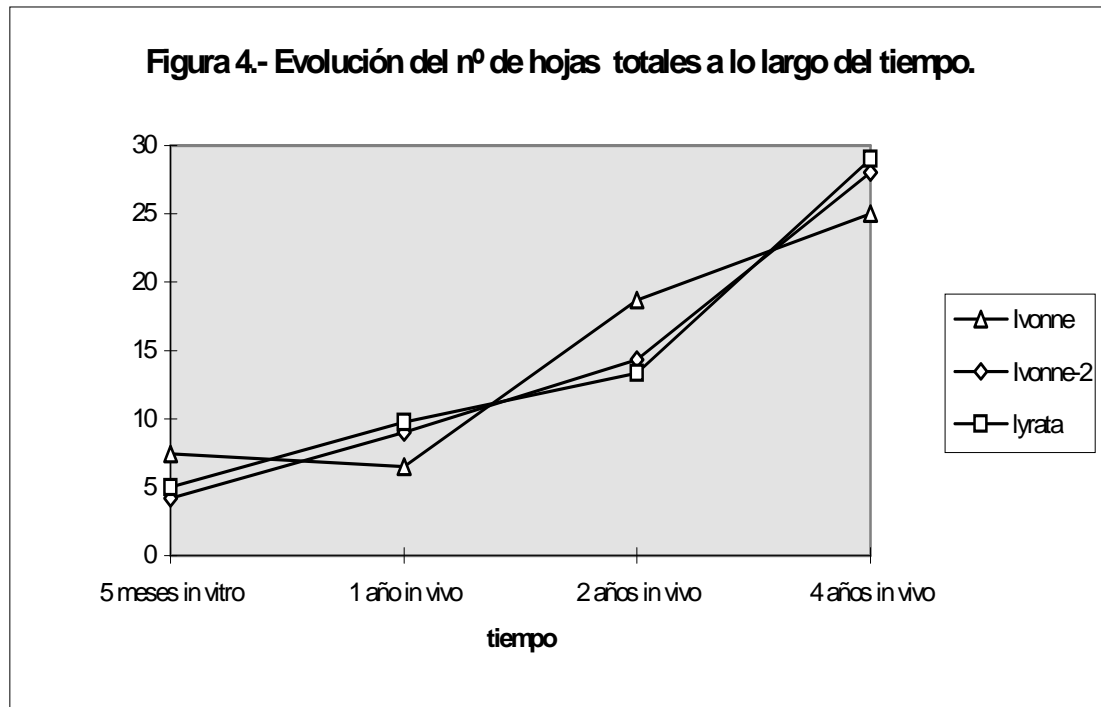


Al representar la altura total de la planta a lo largo del tiempo (figura 3) se observa que durante los dos primeros años de cultivo en invernadero las plantas del "Ivonne" no crecieron tanto como las del "Ivonne-2" que, a su vez, fueron menores que las del parental *F. lyrata*. Sin embargo, a los cuatro años de cultivo, las alturas de las plantas del "Ivonne-2" y *F. lyrata* estándar tendieron a igualarse mientras que las plantas del variante "Ivonne" continuaron siendo más pequeñas que las de los otros dos.

Las plantas del "Ivonne" eran más bajas (fig. 3) y tenían hojas más pequeñas (fig. 4) que las del "Ivonne-2", mientras que la altura y tamaño de hojas de este último eran casi iguales e incluso mayores que las del *Ficus lyrata* estándar.

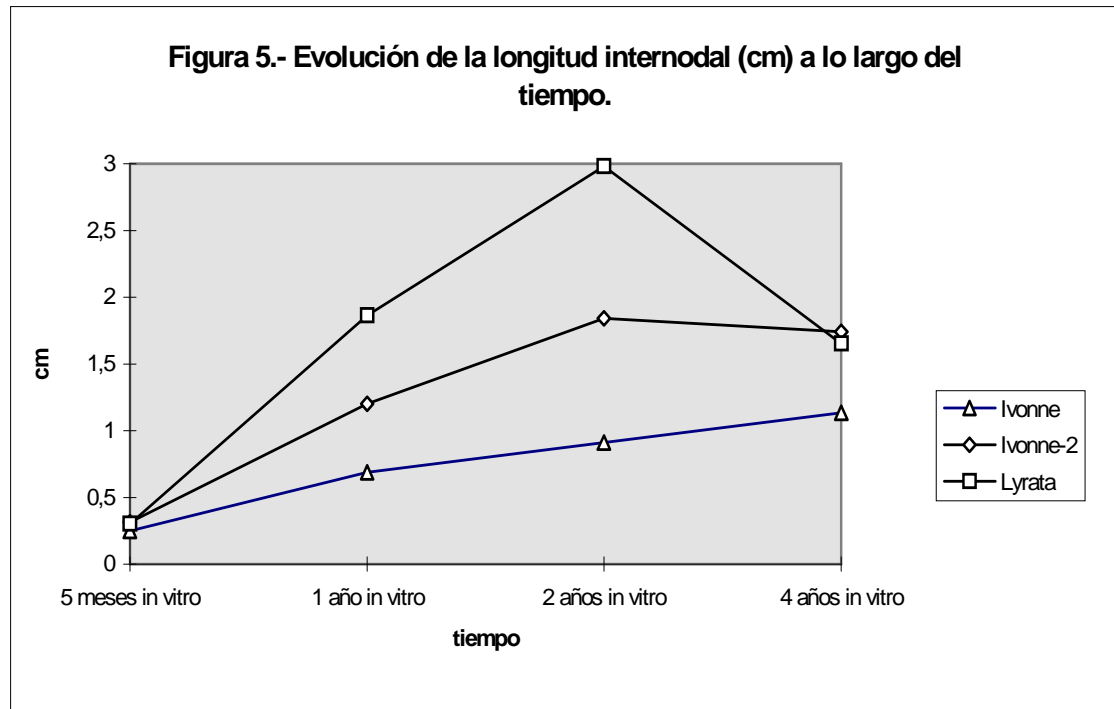


En la figura 4 se observa que en las primeras fases de desarrollo, el parental *lyrata* tenía más hojas que el "Ivonne-2" y éste más aún que el "Ivonne". Este hecho puede ser debido a que, en general, las plantas con hojas totalmente verdes tienen menor tendencia a la pérdida foliar que las plantas con hojas variegadas. Las hojas no variegadas se desarrollan más y resisten mejor todos los cambios y oscilaciones ambientales durante el cultivo en invernadero, lo que repercute en una menor caída de las hojas y, por tanto, en una mayor facilidad para adaptarse a cualquier entorno.



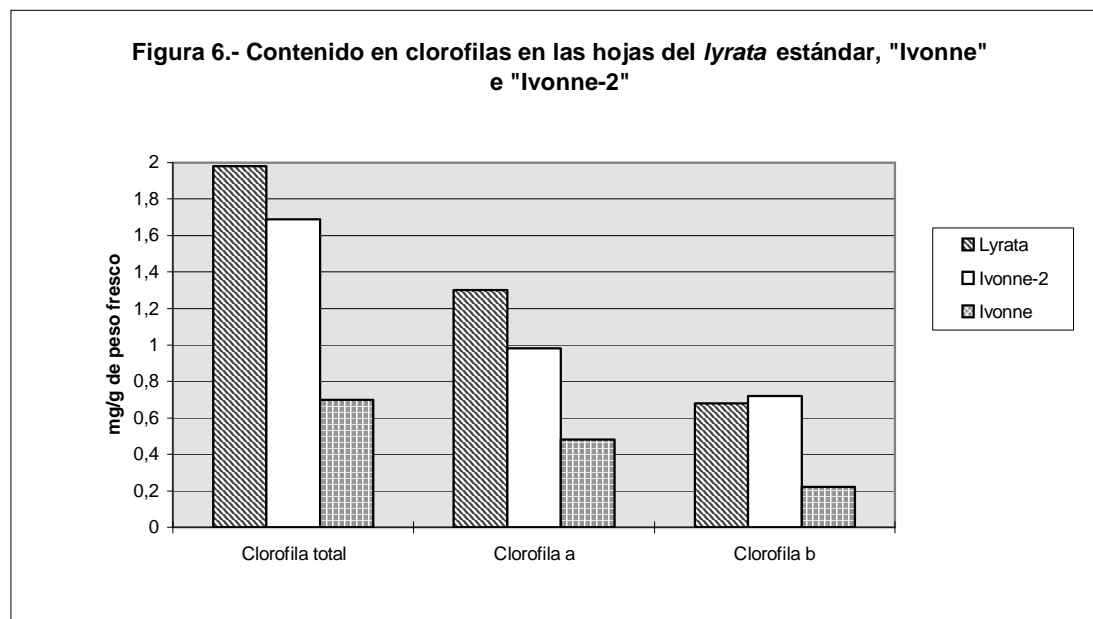
En las plantas con hojas variegadas (como las del cv. "Ivonne") se necesita controlar en mayor grado las condiciones de cultivo con el fin de evitar la pérdida de hojas, lo que significaría una devaluación del carácter ornamental de las plantas. Según nuestra experiencia podemos afirmar que las plantas de *Ficus lyrata* "Ivonne" son muy delicadas y tienen una mala respuesta frente a los problemas de cultivo que se presentan con mucha frecuencia, como los cambios bruscos de temperatura y los traslados de un lugar a otro. Esto último significa un grave problema a la hora del transporte de las plantas desde el lugar de cultivo al punto de venta y desde éste a la casa del consumidor.

Por otra parte, en la figura 5 se observa cómo los valores de la longitud internodal media de los cultivares "Ivonne", "Ivonne-2" y *lyrata* responden a la relación 1:2:3 durante los dos primeros años de cultivo. Sin embargo, a los cuatro años estos valores se igualan en los tres cultivares.



En septiembre de 1996 se tomaron muestras de hojas de los nuevos cultivares "Ivonne", "Ivonne-2" y del parental *lyrata* y se realizaron extracciones de clorofilas. Los trozos de hoja del *Ficus lyrata* en los que se midió el contenido en clorofilas eran, como es natural, de color verde intenso. En cambio, los trozos de hoja del *Ficus lyrata* "Ivonne-2" estaban formadas por dos partes iguales, una de color verde intenso y la otra de color verde claro, que son los dos tonalidades de verde que componen las hojas del variante en cuestión. De forma similar las hojas del variante "Ivonne" están compuestas por tres zonas de colores diferentes: verde oscuro, verde claro y blanco amarillento. En este último caso se tomaron trozos de hojas con áreas iguales de cada uno de los colores existentes en las hojas.

Tal y como era de esperar, los resultados indicaron que el contenido en clorofilas (total, a y b) del *Ficus lyrata* estándar son mayores que los del "Ivonne-2", que, a su vez, son mayores que los del "Ivonne" (figura 6).

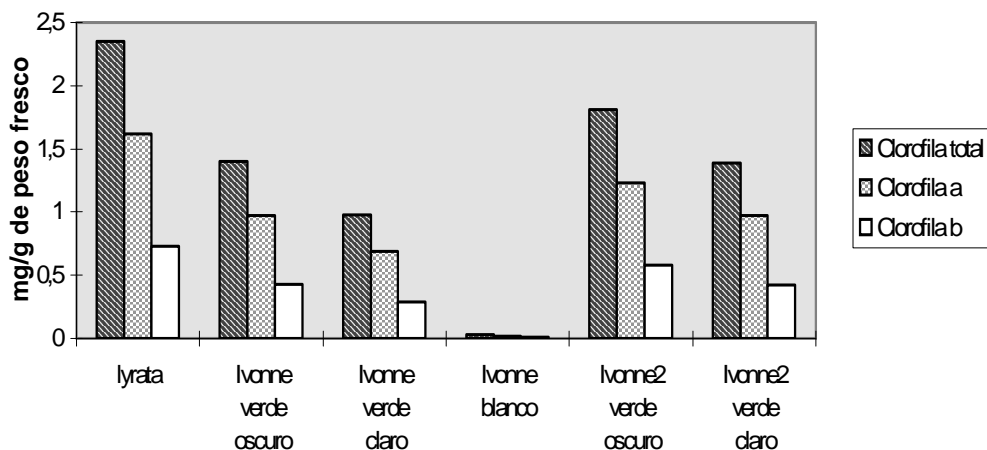


Con el fin de estudiar el contenido en clorofila total y en clorofilas a y b de las zonas con distinta coloración en las hojas de cada cultivar, se realizaron, en diciembre de 1996, diversas extracciones de las clorofilas contenidas en cada parte de la hoja, tomadas de manera separada e independiente. En el *Ficus lyrata* estándar se analizó el contenido en clorofilas de diversos segmentos de hojas de color verde intenso. En el "Ivonne-2" se analizaron las clorofilas en trozos de hoja de color verde intenso, por un lado, y en trozos de hoja de color verde claro, por otro. En el "Ivonne" se analizaron las clorofilas contenidas en trozos de hoja de color blanco, verde claro y verde oscuro.

Se observó que el contenido en clorofilas (total, a y b) de las hojas del *Ficus lyrata* fue mayor que el correspondiente a los segmentos de color verde oscuro de las hojas del "Ivonne-2" que, a su vez, fue mayor que en los segmentos de color verde oscuro en las hojas de "Ivonne" (figura 7).

Los contenidos en clorofila total, a y b en los segmentos de color verde claro de las hojas del "Ivonne-2" fueron mayores que los de los segmentos de color verde claro de las hojas del "Ivonne". El contenido en clorofilas de los segmentos blanco amarillento de las hojas del variante "Ivonne" fueron, como era de esperar, muy bajos.

**Figura 7.- Contenido en clorofilas en segmentos de un color de hojas de *lyrata*, "Ivonne" e "Ivonne-2".**



## Resumen.-

### “IVONNE”

Apareció durante la fase de aclimatación de un lote de plantas de *Ficus lyrata* que procedían de una línea organogénica mantenida por subcultivos repetidos durante unos dos años. El nuevo variante somaclonal *Ficus lyrata* “Ivonne” tiene unas hojas irregularmente variegadas con tres tonos de coloración, lo que supone una novedad en el mercado de las plantas ornamentales. Se trata de una variedad con un porte más compacto que el parental, hojas más pequeñas, entrenudos más cortos y una menor altura total de la planta. La mayor compacidad de las plantas del “Ivonne”, en comparación con los cultivares de hoja verde, la gran densidad foliar, el crecimiento homogéneo y uniforme y el patrón de variegación de sus hojas (verde intenso alrededor de la vena principal, verde claro y verde amarillento en el área central, y blanco en los márgenes de las hojas) que además presentan nervaduras de color crema y peciolo rojos, hacen pensar en que el *Ficus lyrata* “Ivonne” podría tener una buena aceptación en el mercado de las plantas ornamentales de interior. Su interés potencial aumenta si tenemos en cuenta otros aspectos como son la ausencia de problemas para la micropropagación a gran escala del nuevo variante y la facilidad con que las plantitas obtenidas *in vitro* superan la fase de aclimatación *in vivo*.

---

Los rasgos que distinguen al "Ivonne" del parental *Ficus lyrata* son:

1.- El patrón de variegación de sus hojas, que contiene un área central de color verde intenso situada alrededor de la vena central. Esta zona, a su vez, está rodeada por una franja de un color verde más claro que la separa de la zona, más externa, de color blanco cremoso que se extiende hasta el margen. Las hojas del parental salvaje son completamente verdes.

2.-El nuevo variante presenta un porte mucho más compacto que el del parental. Sus entrenudos son más cortos y el tamaño de las hojas menor. El desarrollo de las plantas del cv. "Ivonne" es menor que en el *F. lyrata* estándar debido, probablemente, al menor contenido en clorofila de sus hojas.

3.- Las hojas del "Ivonne" son más rizadas u onduladas que las del parental. Esto puede ser debido a diferencias de crecimiento en las zonas con distinto contenido en clorofilas. Sea por esta o por otra causa, la superficie de las hojas del "Ivonne" es bastante irregular. Las hojas del parental *lyrata* tienen un crecimiento más regular y uniforme, aunque su superficie tiene también ligeras ondulaciones en su margen.

4.- Las venas principales y laterales del "Ivonne" son ligeramente rojizas, mientras las del parental son de color verde intenso.

#### **Descripción del "Ivonne".-**

**Propagación:** Se puede propagar mediante esquejes o mediante cultivo de tejidos. Si se opta por el cultivo de tejidos las plantas son más compactas y uniformes.

**Planta:** La planta tiene la forma usual de los *Ficus lyrata*. El tallo es erecto y poco ramificado. Las ramas, si las hay, forman ángulos de 30° con la principal. La ramificación sólo se produce en plantas adultas de más de 2 m de altura; por tanto, en los viveros, la decapitación de la yema apical para forzar el desarrollo de las yemas laterales es una práctica habitual. Las plantas jóvenes tienen el tallo de color verde; con la edad, el tallo forma corteza y toma un color marrón oscuro.



**Crecimiento:** La apariencia general y el hábito de crecimiento del "Ivonne" es idéntico al del *Ficus lyrata* estándar. No obstante, debido al menor contenido en clorofila, el cv. "Ivonne" crece mucho menos que el parental.

#### **Hojas:**

- **Forma:** de violín o pandureiformes.
- **Tamaño:** (A los 2 años): 12 cm de longitud y 8 cm de anchura.
- **Margen:** Profundamente ondulado.
- **Aspecto:** La superficie es muy ondulada.
- **Textura:** Gruesa y carnosa.
- **Pecíolo:** De unos 2 cm de longitud.
- **Venas:** Una vena central y otras laterales de color rojizo y gruesas que se hacen más finas a medida que nos acercamos al margen.
- **Variegación:** La zona central, alrededor de la vena principal, es de color verde intenso. Esta zona está rodeada por otra franja más estrecha de un color verde más claro, que la separa de la zona blanca de la hoja que se extiende hasta el margen de la misma.

#### "IVONNE-2"

El "Ivonne-2" apareció en un grupo de plantas procedentes de un callo organogénico de *F. lyrata* "Ivonne". Se distinguió claramente de las otras plantas porque tenía las hojas verdes. La plantita se aisló y se multiplicó *in vitro* para estudiar sus nuevas características.

Las características vegetativas del nuevo variante somaclonal *Ficus lyrata* "Ivonne-2" son muy parecidas a las del parental salvaje. La altura total de las plantas, el tamaño de las hojas más desarrolladas, el número total de hojas y la longitud internodal de los dos cultivares se van igualando con el tiempo y llegan a ser idénticas en las plantas de cuatro años. La diferencia más destacable entre ambos cultivares radica en que las hojas del *Ficus lyrata* "Ivonne-2" tienen dos áreas con dos intensidades de color verde claramente distintas: una central de color verde claro y otra periférica de color verde oscuro. Esta característica es suficiente para diferenciar los dos cultivares entre sí y, al mismo tiempo, puede aumentar el

valor ornamental de la planta desde el punto de vista de un consumidor o de un productor muy especializado.

El nuevo variante "Ivonne-2" presenta unos rasgos que lo distinguen fácilmente tanto del "Ivonne" como del *Ficus lyrata*:

1.- Sus hojas son de color verde con dos tonalidades: intenso en la periferia y verde claro en la zona central. La forma de esta área, de color verde claro, es irregular y su extensión es variable según la hoja de que se trate.

2.- El "Ivonne-2" se desarrolla algo más que el parental, sus entrenudos son un poco más largos y el tamaño de la hoja es ligeramente mayor. Estos valores, sin embargo, son muy parecidos a los característicos en el *F. lyrata* estándar.

3.- Las hojas son similares a las del *F. lyrata* estándar y, aparte de la variegación, sólo se diferencian porque son más onduladas y más irregulares.

4.- La peciolas son de color verde intenso, mientras que en el "Ivonne" son más rojizos.

#### **Descripción del "Ivonne-2":**

**Propagación:** Al igual que el "Ivonne" y el *F. lyrata* estándar, el "Ivonne-2" puede propagarse mediante cultivo *in vitro* o mediante esquejado.

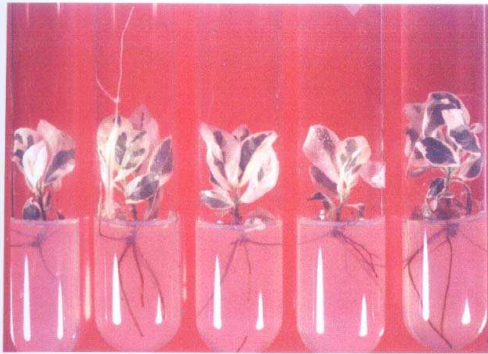
**Planta:** Su forma es similar a la del parental *Ficus lyrata*. Es erecta y poco o nada ramificada.

**Crecimiento:** Se corresponde con el crecimiento habitual de los *Ficus lyrata*. En este aspecto no hay casi diferencias con respecto al parental.

**Hojas:**

- **Forma:** Pandureiforme
- **Tamaño:** (A los 2 años): 23,7 cm de longitud y 16 cm de anchura.
- **Margen:** Ligeramente ondulado.
- **Aspecto:** La superficie de la hoja ligeramente ondulada.
- **Textura:** Gruesa y carnosa.
- **Pecíolo:** De unos 2 cm de longitud.
- **Venas:** Una vena central y otras laterales de color verde intenso.
- **Variación:** Las hojas presentan una zona de color verde claro en la parte central de la hoja, alrededor de la vena principal, y una zona de color verde oscuro que se extiende hacia el margen.





Propagación *in vitro* de yemas axilares del variante "Ivonne" de *Ficus lyrata*



Plantitas de *Ficus lyrata* "Ivonne" durante la fase de multiplicación *in vitro*



Plantas del variante "Ivonne" después de superar con éxito la fase de aclimatación



Aspecto general del cultivo a gran escala del variante "Ivonne" en condiciones controladas de invernadero



De izquierda a derecha: *Ficus lyrata* "Ivonne", *F. Lyrata* "Ivonne-2" y *F. Lyrata* estándar



Grupo de plantas del variante "Ivonne-2" en el que se aprecia la distinta tonalidad de verde que presentan sus hojas



**IV.- Variación somaclonal en *Ficus elastica***





## **Introducción.-**

El *Ficus elastica* o *rubber plant* se cultiva comúnmente en macetas. En un principio, se utilizó para la obtención de la goma de India y para la fabricación de gomas de borrar. A finales del siglo XIX se establecieron grandes cultivos de árboles de esta especie y sus troncos se perforaron para obtener látex. El producto que se obtenía era de una calidad muy inferior al que proporcionaba el *Hevea brasiliensis* sudamericano y por tanto, cuando la goma procedente del *Hevea* estuvo disponible, su explotación comercial finalizó prematuramente<sup>4</sup>. La madera de los *Ficus elastica* no es de calidad y no tolera condiciones de alta humedad. En ocasiones, se emplea para la construcción de postes y con otros propósitos poco nobles, ya que esta especie no proporciona tablones de interés comercial. Los forestales de Sudamérica consideran los *Ficus* como mala hierba o cizaña, aunque algunos de ellos pueden alcanzar más de 45 m de altura.

En Hawaii, Florida del Sur, California del Sur y otras regiones cálidas se cultivan en el exterior como plantas ornamentales. También se cultivan en los invernaderos y como plantas de interior.

El *Ficus elastica* es muy conocido en casi todo el mundo, al menos como planta cultivada en maceta. Por su uso tan extendido y durante tanto tiempo, es la planta ornamental por excelencia. En la India y Malasia (sus hábitats naturales) se comporta como una planta epífita y, más tarde, se desarrolla como un árbol de más de 30 metros de altura.

Este tipo de planta soporta sus grandes ramas con sus propias raíces que con el tiempo se vuelven troncos secundarios. En los especímenes del tamaño de un árbol las hojas, brillantes y coriáceas, tienen numerosas venas laterales paralelas y finas que forman ángulos casi rectos con sus respectivas venas principales. Las hojas tienen, a menudo, 15 cm de longitud, pero en especímenes jóvenes pueden llegar a superar los 30 cm de longitud. La anchura de las hojas es aproximadamente la mitad de su longitud.

---

<sup>4</sup> Tomado de Thomas H. Everett. 1982. The New York Botanical Garden Illustrated. Encyclopedia of Horticulturae.

Una de las características más destacable de los *Ficus elastica* es la presencia de grandes estípulas de color rosáceo que envuelven las yemas de las hojas hasta que éstas se abren, momento que coincide con la caída de las estípulas.

Los frutos son de color verde amarillentos, tienen forma de huevo, de 1,25 cm de longitud y crecen en parejas sobre cortas varillas. En Hawái, donde existen árboles de *Ficus elastica* de 100 años de edad, los frutos caen prematuramente y no producen semillas al no estar presente la peculiar avispa necesaria para la polinización de las flores.

Algunas de las variedades más atractivas del *F. elastica* común se cultivan en todo el mundo. El más conocido es el *Ficus elastica* "Decora" de hoja estrecha. Se trata de un variante que, se supone, apareció en 1930, en unos viveros de Bélgica, como una plántula de semilla. Es muy probable que más de un variante se cultive bajo el mismo nombre. Otras variedades hortícolas muy similares al cv. "Decora" son: a) el *Ficus elastica*. "Belgica", cuyas hojas tienen las venas principales de color crema rosáceo. b) el *Ficus elastica* "Schhzijevareana", que tiene los peciolos rojizos. Es una variedad vigorosa con hojas estrechas, variegadas y con zonas diferentes de color verde, gris-verdoso, crema-amarillo y blancas. c) El *Ficus elastica* "Doescheri" posee unas hojas variegadas con verde, gris-verdoso, amarillo-crema y blanco. Tienen los peciolos de color rosa. d) El *Ficus elastica* "Rubra", que se caracteriza por el típico y distintivo color marrón-rojizo de las hojas jóvenes y por las venas principales rojizas en las hojas más adultas.

El uso principal de los *Ficus elastica* en el exterior es como árbol de sombra ornamental. Se emplean como especímenes solitarios, en avenidas y como árboles de calle. También se utilizan mucho como planta de interior, cultivadas en contenedores y también se pueden encontrar en porches, balcones y terrazas durante las estaciones cálidas. El *F. elastica* es uno de los *Ficus* más fiables y hermosos y, al mismo tiempo, muy atractivo y decorativo. Esta planta puede crecer y desarrollarse, con unos cuidados mínimos, en un amplio rango de ambientes distintos, desde apartamentos bien iluminados hasta casas con menos luz.

Enorme, ramificado, venerable y asimétricamente artístico, el *Ficus elastica* puede decorar escaparates, halls y cualquier zona de cualquier inmueble. Puede vivir en condiciones muy umbrías donde no sobrevivirían otras plantas de interior. La variedad de hojas estrechas *Ficus elastica* "Decora" es también muy hermosa pero no tolera tanto las pobres condiciones de

cultivo como las tolera el *F. elastica* estándar. Las variedades de hojas variegadas son incluso más delicadas.

### **Cultivo de los *Ficus elastica* en general.-**

Desde mediados del siglo pasado, la cabeza indiscutible de la familia de los *Ficus* ha sido el *F. elastica* "Decora". En un principio sólo se cultivaba el *F. elastica* estándar de hojas estrechas, pero en la actualidad esta variedad, pasada de moda, ha sido sustituida por los cultivares "Decora" y "Robusta" que son mucho más atractivos. En general, las plantas de *Ficus elastica* con las hojas completamente verdes son mucho más fáciles de cultivar que las que tienen hojas variegadas (Hessayon, 1982).

Su multiplicación se efectúa por esqueje, por acodo aéreo y por cultivo de tejidos. El esqueje se puede realizar a partir de un brote con tres o cuatro hojas o a partir de trozos de tallo con 1 o 2 hojas y con, al menos, una yema. Balakrisna y Battacharjee (1991) obtuvieron buenos resultados usando esquejes apicales de 15 cm de longitud con dos hojas y tratados con IBA en polvo con talco a una dosis de 6.000 ppm. Pimpini *et al.*, (1983) tomaron esquejes de tallo de 3 cm de longitud que comprendían hojas y yemas. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los segmentos de tallo ni contenían la yema apical ni se encontraban por debajo de la 7ª hoja, y con un tratamiento de NAA a 1.000 ppm. Poole y Conover (1984) sugirieron que la propagación de *Ficus elastica* mediante el esqueje de nudo simple produce muchas más plantas por m<sup>2</sup> de stock que por acodo aéreo, aunque si las hojas son grandes, se requieren grandes áreas de propagación y, por otra parte, para conseguir un buen enraizamiento en los esquejes es necesaria la presencia de hojas.

El acodado o acodo aéreo<sup>5</sup> se suele practicar en primavera y en madera del año anterior. También se puede realizar a finales del verano en ramas parcialmente endurecidas. En algunas ocasiones pueden usarse tallos de más de 1 año de edad, pero en estos casos el enraizamiento es menos satisfactorio y las plantas grandes que se obtienen son más difíciles de manejar, sobre todo después del enraizamiento. En los tallos acodados, la presencia de numerosas hojas activas acelera la formación de raíces. En plantas tropicales de invernadero, el acodado debe hacerse después de que se hayan desarrollado varias hojas activas ya que, de este modo, se acelera la formación de raíces. El primer paso en un acodo aéreo es anillar o cortar la corteza del tallo. En

---

<sup>5</sup> Tomado de Hartman y Kester. Propagación de plantas.

los *Ficus*, se ha demostrado que el anillado ocasiona déficit de agua y manchas en las hojas. Para reducir el déficit de agua conviene proporcionar a las plantas un 50% de sombra. La aplicación de un estimulador del enraizamiento, como ácido indolbutírico, a la herida expuesta resulta beneficioso. Posteriormente se cubre la zona con musgo o turba y se sella, para evitar la deshidratación, con film de plástico o con papel aluminio. Esta técnica se realiza en invernadero.

El cultivo *in vitro* proporciona plantas de *Ficus elastica* "Decora" de gran calidad, desde un formato de tamaño pequeño, ramificadas y homogéneas. Capellades *et al.*, (1991) señalan que la micropropagación ha producido un tremendo impacto en la producción de *Ficus*, así que, en la actualidad, el mayor problema que se presenta es la superproducción. La mayor parte de los *Ficus* pueden ser micropropagados y uno de los de más interés comercial es el *Ficus elastica*. La calidad de los miniesquejes obtenidos por cultivo *in vitro* es comparable a la de los esquejes estándar, aunque la velocidad de crecimiento es mayor. Cuando se desean plantas compactas y ramificadas de tamaño pequeño se deben utilizar plantas micropropagadas como punto de partida. En efecto, según Conover y Poole (1978) para obtener plantas de *Ficus elastica* "Decora" de calidad equiparable por métodos convencionales hay que descabezar las plantas de un sólo tallo (obtenidas de esquejes tradicionales) por encima de los 50 cm y el resultado son plantas de gran calidad de 1 m de altura, después de 16 meses de cultivo a partir de un esqueje de una sola yema.

Si se desea producir un mayor número de esquejes en plantas madre y conseguir plantas más ramificadas también se pueden utilizar algunos productos químicos inductores del desarrollo de yemas laterales aunque por lo general, este tipo de tratamientos resultan costosos y poco efectivos (Hodge y Morgan, 1978)

El uso del cultivo de tejidos *in vitro* es recomendable también para la propagación a gran escala de variedades con dificultad para ser reproducidas por otros métodos clásicos, como son las variedades de *Ficus* de hojas variegadas (Kumar *et al.*, 1985)

Uno de los problemas de la propagación *in vitro* a gran escala es que, en ocasiones, puede resultar un proceso caro, debido sobre todo al gran número de operaciones manuales que se requieren. En el caso de los *Ficus* en general y de los *Ficus elastica* en particular, el costo de producción puede reducirse desde un 35,6% hasta un 70% si se obvia la etapa de enraizamiento

*in vitro* y si se aclimatan las plantas directamente sin raíces (Rajbhandary, 1992 y Donnan *et al.*, 1978).

El cultivo del *Ficus elastica* es muy simple y se realiza en invernadero climatizado. La duración es de cuatro a seis meses a partir del esquejado y de uno a dos meses a partir del acodo. Moes (1975), realizó diversos ensayos en invernadero y comprobó que las plantas enmacetadas de *Ficus elastica* estaban listas para su venta a las 42 semanas de la plantación, siguiendo un régimen de temperaturas de 13-16 °C por la noche y 19 °C por el día.

Los sustratos que admite, a base de turba enriquecida, son muy variados y los riegos deben ser ligeros y frecuentes. El cultivo debe hacerse sin cambios bruscos de temperatura.

#### **Plagas y enfermedades.-**

Las plagas que afectan más habitualmente a los *Ficus elastica* son los nemátodos, arañas rojas, pulgones y cochinillas. La enfermedad más frecuente es la producida por el *Gloeosporium elasticae*, que provoca manchas redondeadas sobre las hojas que, desde el borde, pueden llegar a cubrir todo el limbo. Se combate evitando los cambios de temperatura y tratando regularmente con fungicidas sistémicos.

#### **Cultivares más relevantes.-**

Las variedades más conocidas e importantes<sup>6</sup> del *Ficus elastica* son:

**elastica** (India, Malasia) "India rubber plant". Es una planta de larga duración muy utilizada como planta de interior. Puede dar grandes árboles de hasta 30 metros de altura. Produce raíces aéreas desde sus propias ramas. Las plantas jóvenes son erguidas, con un tallo leñoso de color marrón y con las hojas carnosas, coriáceas, oblongas, tersas y profundamente verdes. Las hojas jóvenes están encerradas en vainas de color rosa. Produce un látex que contiene una savia lechosa.

**elastica "Belgica"**. Es una selección hortícola más ramificada que el cv. "Decora". Tiene las hojas cerosas de color verde oscuro y las hojas principales tiene un color que va de crema a rosa.

**elastica "Decora"** (Indonesia). Tiene las hojas más grandes, más anchas y más pesadas que las del *F. elastica* estándar; las hojas son tersas, de color verde oscuro y con unas venas laterales prominentes que forman un angulo recto con la vena central de color marfil. Las vainas que protegen las puntas o yemas de crecimiento son rojas.

**elastica "Decora Schrijvereana"** (1959). Es un cultivar belga muy robusto procedente del cv. "Decora" de hojas estrechas. Posee unas hojas tersas y profundamente verdes que exhiben una variegación irregular de color gris verdoso en el centro que se va tornando en verde claro, verde mar y crema o amarillo claro según nos vamos alejando desde el centro hacia el borde. La vena central es crema y los peciolo son rojos.

**elastica "Doescheri"** (New Orleans, 1925). Es un destacable cultivar variegado que tiene en sus hojas una amplia gama de colores: desde el verde grisáceo hasta el blanco, pasando por el crema amarillento. Las venas centrales y los peciolo son de color rojo. Los colores son estables y no revierten a verde.

**elastica "Rubra"**. Es un cultivar que se distingue por los colores marrones y rojo de sus hojas jóvenes y por las venas centrales de color rojo. Las hojas, ovales, son cortas y puntiagudas; no tan largas como las del cv. "Decora" pero más estrechas

**elastica variegata**. Es idéntica a la "rubber plant" común pero en forma variegata. Sus hojas carnosas tienen una variegación gris y una zona central de color amarillo cremoso.

### **La micropropagación del *Ficus elastica*.**

La micropropagación ha supuesto un cambio muy importante en los métodos de reproducción que se utilizaban en el *Ficus elastica* (esquejado y acodo aéreo). En la actualidad, la propagación a gran escala de los *F. elastica* se basa fundamentalmente en la

---

<sup>6</sup> Tomado de Exotica 3: Pictorial encyclopedia of exotic plants. Guide to care of plants indoors. Graf.

micropropagación. El número de plantas de *Ficus* que se micropropagaron en Holanda en los últimos años fue el siguiente:

---

<u>AÑO</u> <sup>7</sup>	<u>NÚMERO DE UNIDADES</u>
1982	314,500
1983	390,000
1984	330,000
1985	161,500
1986	148,000
1988 <sup>8</sup>	1,777,075
1995 <sup>9</sup>	4,279,000

De las más de cuatro millones de plantas de *Ficus* que se comercializaron en Holanda en el año 1995, unos tres millones procedían de laboratorios situados en países con mano de obra barata, como Polonia, India, etc.

Por otro lado, en el año 1988 se propagaron cerca de 1.000.000 de *Ficus* en los laboratorios comerciales de Norteamérica (Zimmerman y Barnhill, 1991)

En el año 1989, el *Ficus elastica* fue una de las 10 plantas, ornamentales o no, más micropropagadas en España, con una producción superior a las 100.000 unidades.

La producción total de *Ficus* en laboratorios comerciales de Europa fue de 7.002.000 de plantas en 1988 y el número total de laboratorios comerciales de 82 (Ríordáin, 1992)

En la tabla siguiente se muestra el número de laboratorios comerciales de distintos países que se dedicaron a la multiplicación *in vitro* de *Ficus elastica*, *Ficus* "Robusta", *Ficus* "Decora", *Ficus* "Tineke", *Ficus* "Sophia", *Ficus* "Tricolor" y *Ficus* "Decora" variegata.

Se observa que, a pesar de que en el año 1993 se contabilizaron también los laboratorios comerciales de los países situados en la Europa del Este (antes no había datos), se produjo una fuerte disminución en el número de los laboratorios que micropropagaron el *Ficus*

---

<sup>7</sup> Tomado de Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

<sup>8</sup> Tomado de Pierik, R. L. M. 1991. Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. Debergh, P.C. and Zimmerman, R. H. (eds.). *Micropropagation*, 155-165. Kluwer Academic Publishers.

<sup>9</sup> Tomado de Pierik, R.L.M and M.A. Ruibing. 1997. Developments in the micropropagation industry in The Netherlands. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. Vol 3, Nº 3, 152-156



*elastica*. Probablemente esto se debe a que, durante este periodo (1990-1993), hubo una gran superproducción de esta planta (así como de otras) y, por tanto, algunas empresas dejaron de producirlo a gran escala, porque los mercados estaban saturados y los precios habían disminuido hasta niveles tan bajos que era muy difícil obtener beneficios.

<b>Tabla 1.- Número de laboratorios de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales que multiplican a gran escala plantas de <i>Ficus elastica</i> en Europa</b>		
<b>País</b>	<b>1990</b>	<b>1993</b>
<b>Alemania</b>	2	-
<b>Belgica</b>	5	4
<b>Eslovaquia</b>	-	1
<b>España</b>	3	3
<b>Francia</b>	7	2
<b>Grecia</b>	2	3
<b>Holanda</b>	3	-
<b>Hungría</b>	-	1
<b>Italia</b>	8	5
<b>Noruega</b>	1	-
<b>Suiza</b>	2	1
<b>Total</b>	33	20

Tomado del Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories. Ediciones 1990 y 1993. Commission of the European Communities.

En la actualidad, los cultivares más importantes que se producen en Holanda son el *Ficus elastica* "Robusta" y los cultivares variegados *Ficus elastica* "Sylvie" y *Ficus elastica* "Tineke" (Catálogo de plantas de maceta. Oficina Holandesa de Flores. 1997/1998).

En las plantas ornamentales en general, y en los *Ficus elastica* en particular, las quimeras son importantes y se debe prestar una atención especial a la segregación. Hay algunas plantas de interior con las hojas variegadas que son quimeras, y que son micropropagadas (*Ficus benjamina* "Golden King" y "Golden Princess", *Ficus decora* "Belga plant", etc...). A menudo, la mayor parte de las quimeras son del tipo periclinal o mericlinal estable, y, por tanto, pueden ser micropropagadas con éxito sin la rotura de sus capas constituyentes, siempre que se usen los métodos de proliferación de brotes por vía axilar (Capellades *et al.*, 1991)

**Nuevas características deseables.-**

Debido a la tendencia actual a comercializar plantas de pequeño tamaño, las características más valoradas son: a) ramificación abundante, b) distancia internodal corta, c) gran número de hojas y d) tamaño foliar parecido en todas las hojas más desarrolladas.

Estas características se pueden conseguir mediante la propagación *in vitro* de los *Ficus*. El cultivo de tejidos vegetales proporciona, por lo general, plantas más homogéneas, uniformes y compactas que los métodos de propagación tradicionales. Esto facilita el cultivo en los invernaderos, así como la manipulación y el transporte de las plantas.

Al tratarse de plantas ornamentales, los profesionales y los consumidores del sector valoran mucho las plantas con hojas variegadas que exhiben zonas con distintas intensidades o tonalidades de color (verde, verde amarillento, amarillo, crema, etc.). La variegación puede proporcionar una apariencia más bella y, por otra parte, puede aportar o suponer una novedad con respecto a las variedades ya existentes en el mercado. No obstante, hay que tener presente que, normalmente, los cultivares de hoja variegada son difíciles de cultivar y reproducir. Por consiguiente, es importante seleccionar variantes de tipo variegado que no encarezcan los costes de producción o, alternativamente, conseguir novedades con las que se pueda obtener un precio en el mercado que compense el mayor coste de producción.

**Materiales y métodos.-****Material vegetal y métodos para el cultivo *in vitro*.-**

Se establecieron *in vitro* yemas apicales de *Ficus elastica* "Decora" para su posterior propagación en gran escala. Después de 12 subcultivos de unas 8 semanas en un medio de multiplicación apareció, en uno de los callos organogénicos, una planta con las hojas de color verde claro. Se aisló la plantita y se reintrodujo *in vitro*, observándose que, a medida que se

desarrollaba y aumentaba el tamaño, sus hojas exhibían varias zonas, claramente diferenciadas, con distintas tonalidades o intensidades de color verde.

Las yemas apicales de plantas de *Ficus elastica* "Decora" se instalaron *in vitro* siguiendo la técnica descrita por Batlle y Melé (1984). En primer lugar, las yemas apicales (de 1 cm de longitud) se desinfectaron con una solución de hipoclorito sódico (lejía comercial con 50 g/l de cloro activo) al 2% durante 15-20 minutos a la que se añadieron 2 gotas/100 ml de tween 20. Después de tres lavados en agua estéril (10 minutos cada uno), se eliminaron las hojitas más externas de los ápices, recortando también los extremos de los segmentos de tallo que resultaron quemados por la acción de la lejía. A continuación, se sembraron en tubos de ensayo de vidrio (25x150 mm) tapados con tapones de plástico, que contenían 15 ml de medio de cultivo.

Tanto para la fase de iniciación como para la fase de multiplicación, el medio de cultivo, estaba compuesto por los macro y microelementos de Murashige y Skoog (1962), FeNaEDTA (46,75 mg/l), tiamina (0,4 mg/l), myo-inositol (100 mg/l), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (170 mg/l), sacarosa (30 g/l), agar-agar (8 g/l), IBA (0,25 mg/l) y BAP (1,25 mg/l). El pH se ajustó con KOH 1N a 5,7. Una vez distribuido el medio de cultivo en los recipientes, se llevó a cabo la esterilización al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

A lo largo de las fases de iniciación multiplicación y enraizamiento, las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo bajo una intensidad luminosa (proporcionada por tubos fluorescentes Osram del tipo luz día) de unos 1.500-2.000 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. La temperatura de cultivo se mantuvo alrededor de los 23±2°C.

En la etapa de iniciación, los explantes se sembraron en los tubos de ensayo anteriormente indicados a razón de una yema por tubo. En la etapa de multiplicación se sembraron unos 20 brotes individualizados, que procedían de subcultivos previos, en frascos de vidrio de 400 ml de volumen con tapa de plástico que contenían, cada uno, unos 80 ml de medio nutritivo.

El medio de enraizamiento de los brotes consistía en los macroelementos (diluidos a la mitad) y los microelementos de Murashige y Skoog (1962), 0,2 mg/l de tiamina, 1 mg/l de a. nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 100 mg/l de myo-inositol, 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar industrial. El pH del medio y el método de esterilización fueron los mismos que los empleados

en las fases de iniciación y multiplicación. Se introdujeron unas 35-40 plantas en cada frasco de cultivo de 400 ml y permanecieron en el medio de enraizamiento durante unas tres o cuatro semanas.

El variante de *Ficus elastica* "Decora" que se detectó en la fase de multiplicación *in vitro* (y al que luego denominamos "Blue") se aisló y se pasó a un tubo de 25x150 mm que contenía 15 ml del medio de enraizamiento (sin reguladores de crecimiento) para observar su evolución. A las pocas semanas, las hojas comenzaron a desarrollarse y lo que en un principio parecían hojas de color verde más claro que las del parental, se convirtieron en hojas que exhibían zonas irregulares con diferentes tonalidades de color verde. Ante el posible interés del nuevo variante, se procedió a su multiplicación *in vitro* con vistas a obtener un número suficiente de plantas para aclimatarlas a condiciones *in vivo* y estudiar su fenotipo a nivel de planta adulta.

#### **Aclimatación del material vegetal.-**

Dado el gran parecido existente entre las hojas del nuevo variante y las del cultivar "Tricolor" cuyas hojas presentan un modelo de variegación similar al exhibido por las del "Blue" nos pareció interesante estudiar las características del nuevo variante, las del parental y también las del "Tricolor". Se aclimataron diversos lotes de plantas de *F. elastica* "Decora", "Blue" y "Tricolor" para comparar sus características después de permanecer cierto tiempo en el invernadero. Las plantas (enraizadas *in vitro*) se aclimataron bajo túnel de plástico. Durante el tiempo que permanecieron en el túnel se regaron frecuentemente con aspersores para reducir el estrés hídrico y se les suministró calor ambiental mediante el uso de generadores de aire caliente que afectó solamente la parte aérea de las plantas. A las raíces, se les aplicó el calor procedente de un lecho caliente (tubos de PVC por donde circulaba agua caliente). Las plantitas se sembraron en packs de A-60 en un sustrato a base de turba. Después de 3-6 semanas (según la época del año) de permanencia en el túnel, las plantas se trasladaron a otras bancadas sin túnel de plástico, bajo invernadero donde se cultivaron hasta su posterior trasplante a macetas de 7, 9, 11, 14, 17 y 25 cm de diámetro sucesivamente.

Se realizaron los riegos, las fertilizaciones y los tratamientos fitosanitarios necesarios con el fin de que las plantas crecieran y se desarrollaran de la forma más adecuada posible.

### **Caracterización fenotípica del nuevo variante somaclonal.-**

Se compararon las características de plantas de *Ficus elastica* “Decora”, “Tricolor” y “Blue” a lo largo del tiempo. Se tomaron la primera, segunda y tercera hoja y se midieron la longitud de las hojas (cm), la anchura de las hojas (cm) y, en los cultivares variegados, “Tricolor” y “Blue”, la longitud y la anchura de las zonas de color verde situadas, generalmente, alrededor de la vena central, mientras que la zona de color verde amarillento, está situada en la zona periférica de la hoja, formando una franja más o menos estrecha alrededor del borde exterior de la misma.

También se midieron la altura total de la planta (cm), el número de hojas totales, la longitud internodal promedio y el número de nudos. Las medidas se realizaron: i) después de un subcultivo de 6 semanas en la fase de enraizamiento *in vitro*, ii) después de un año de cultivo de las plantas en invernadero en maceta de 9 cm de diámetro y iii) después de 2 años de cultivo en invernadero en maceta de 12 cm de diámetro.

También se estudió la evolución de las características más representativas a lo largo del tiempo. Estas características fueron: el tamaño de las hojas, la extensión de las áreas de color verde de las hojas, la altura de la planta, el número de hojas, el número de nudos y la longitud internodal promedio.

El número de plantas caracterizadas después de la fase de enraizamiento *in vitro* fue de 5 plantas de cada cultivar. Después del primer año de cultivo, se caracterizaron 3 plantas de *Ficus elastica* “Decora”, 3 del “Tricolor” y 1 del “Blue”. Tras 2 años de cultivo se midieron las características vegetales en 2 plantas del “Decora”, 3 del “Tricolor” y 3 del “Blue”. El número de plantas adultas del cv. “Blue” puede parecer pequeño pero, en realidad, eran las primeras plantas que se habían obtenido en el laboratorio y, por tanto, las únicas de las que disponíamos para realizar las medidas.

Por otra parte, se realizaron extracciones de clorofila en las hojas de los cultivares seleccionados del “Decora”, “Tricolor” y “Blue”, para determinar el contenido en clorofila a, b y clorofila total en plantas de 8 semanas de edad y en plantas de año y medio de edad.

### **Resultados y discusión.-**

El *Ficus decora* "Blue" es una planta de hojas irregularmente variegadas que se obtuvo directamente a partir de un callo organogénico de *Ficus elastica* "Decora". El cultivo de yemas apicales de *Ficus elastica* "Decora" se inició en marzo de 1996 y tras 10 subcultivos de 6 semanas en un medio estándar de multiplicación, se detectó una plantita diferente al resto de plántulas que se originaban en el mismo callo. Era una planta cuyas hojas exhibían una tonalidad de color verde más claro que las de las otras plantas que surgían del citado callo.

La planta, se aisló y se sembró en el medio de enraizamiento *in vitro* con el objeto de estudiar su fenotipo y la morfología a lo largo del tiempo. Después de varias semanas de cultivo y a medida que sus hojas se iban desarrollando, se pudo constatar que, en realidad, existían tres zonas diferenciadas con tres colores o tonalidades totalmente distintos. Una de color verde oscuro y otra de color verde más claro (que envuelve a la primera) situadas alrededor de la vena central y una tercera zona de color crema amarillento, en la parte externa de la hoja junto al borde de la misma. Este tipo de variegación es similar al que muestran las hojas del *Ficus elastica* "Tricolor" y por lo tanto, se consideró de interés el comparar las características del nuevo variante obtenido con las del parental "Decora" y con las del "Tricolor".

Después de varios subcultivos en el medio de multiplicación, se transfirieron a medio de enraizamiento algunos lotes de plantas procedentes de diferentes subcultivos. Así, el 09/08/95 se aclimataron con éxito 288 plantas (73,5%) de un lote de 392. El 10/11/95 se aclimataron 260 plantas (89,65%) de un lote de 290 y el 21/02/96 se aclimataron 240 plantas (66,3%) de un total de 362. De estos resultados se desprende que la aclimatación del *Ficus elastica* "Blue" ocasionó algunos problemas, ya que se produjo un número elevado de bajas en plantas que no superaron las condiciones ambientales en el proceso de aclimatación. Sin embargo, la aclimatación de plantas de *Ficus elastica* "Decora" y "Tricolor" no fue tan problemática y, para su cultivo en gran escala bajo invernadero, sólo fueron necesarios unos cuidados mínimos. Así pues, para cultivar las plantas del cv. "Blue" con ciertas garantías de éxito fue necesario ajustar perfectamente las condiciones ambientales para obtener un gran número de plantas de calidad.

Las plantas del *Ficus elastica* "Blue" se distinguían claramente de las del "Tricolor", porque las hojas jóvenes del cv "Blue" (que estaban en crecimiento activo) no presentaban la típica zona de color crema característica de las plantas del cv. "Tricolor". Las hojas del nuevo cultivar "Blue" exhibían dos zonas claramente diferenciadas: una de color verde claro y otra,

central, de color verde oscuro, mientras que las hojas del "Tricolor" ( las jóvenes y las adultas) presentaban tres zonas de colores distintos: una central de color verde oscuro, otra que rodea la anterior, de color verde claro y una última zona que, a su vez envuelve las otras dos, de color crema amarillento. Conviene destacar también que las hojas más jóvenes del "Tricolor", a diferencia de las del "Blue" (cuyos peciolo son de color verde) tienen el peciolo y el envés de color rojizo.

En la tabla 2 se muestran las características del *Ficus elastica* "Blue", "Tricolor" y "Decora" en plantas cultivadas *in vitro* en el medio de enraizamiento durante 6 semanas. Se apreciaron ligeras diferencias entre la altura de las plantas del *Ficus elastica* "Decora" (4,67±0,13 cm) y la de las del "Tricolor" y "Blue" (4,02±0,16 cm y 3,88±0,28 cm, respectivamente). Sin embargo, el número de hojas, el número de nudos y la longitud internodal promedio eran muy parecidos en los tres cultivares.

**Tabla 2.-** Características del *Ficus elastica* "Blue", "Tricolor" y "Decora" en la fase de enraizamiento *in vitro*.

VARIABLE	Blue	Tricolor	Decora
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	1,41±0,09	2,08±0,11	1,56±0,02
2ª hoja desarrollada	1,58±0,16	2,10±0,10	1,66±0,03
3ª hoja desarrollada	1,58±0,08	2,13±0,19	1,68±0,06
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	0,84±0,04	0,85±0,03	1,00±0,02
2ª hoja desarrollada	0,94±0,05	0,91±0,06	1,04±0,02
3ª hoja desarrollada	0,92±0,04	0,95±0,08	1,05±0,04
<b>Longitud del área central<sup>(1)</sup> (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	0,36±0,15	1,66±0,15	-
2ª hoja desarrollada	0,70±0,09	1,88±0,16	-
3ª hoja desarrollada	0,48±0,13	2,04±0,19	-
<b>Anchura del área central<sup>(1)</sup> (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	0,14±0,05	0,61±0,07	-
2ª hoja desarrollada	0,17±0,02	0,75±0,07	-
3ª hoja desarrollada	0,19±0,06	0,82±0,08	-
<b>Altura total de la planta (cm)</b>	3,88±0,28	4,02±0,16	4,67±0,13
<b>Número de hojas totales</b>	10,40±1,12	11,80±0,97	9,60±0,24
<b>Longitud internodal<sup>(2)</sup> (cm)</b>	0,32±0,03	0,33±0,02	0,34±0,01
<b>Número de nudos</b>	12,40±0,87	12,40±0,51	13,60±0,24
(1)Es el área correspondiente a la extensión de color verde en los cultivares variegados.			
(2)Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.			

La longitud de las hojas del "Tricolor" era ligeramente superior a la de las hojas del "Decora" y "Blue" (cuyos valores eran muy parecidos entre sí). Sin embargo, las hojas del *Ficus elastica* "Decora" eran más anchas que las del "Blue" y "Tricolor". El mayor tamaño de

hoja correspondió a la tercera hoja más desarrollada del *Ficus elastica* "Tricolor" (2,02 cm<sup>2</sup>). En general, las hojas del nuevo cultivar "Blue" eran las más pequeñas, mientras que las del cv. "Tricolor" eran las más grandes.

La diferencia más importante entre los cultivares de hojas variegadas ("Blue" y "Tricolor") era la relativa a la extensión (longitud x anchura del área central) de la zona de color verde claro y verde oscuro de las hojas. Esta superficie era mucho mayor en las hojas del "Tricolor" que en las del "Blue" (1,67 cm<sup>2</sup> en la tercera hoja del "Tricolor" frente a los 0,13 cm<sup>2</sup> en la segunda hoja del "Blue"). De los resultados obtenidos se puede concluir que las plantas cuyas hojas contienen zonas de color verde más pequeñas se desarrollan menos y, por tanto, crecen menos en altura.

Posteriormente, se caracterizaron plantas de los cultivares "Decora", "Tricolor" y "Blue" tras 1 año de cultivo en contenedor de 9 cm de diámetro (tabla 3). Las alturas de las plantas fueron las siguientes: 20,87±3,37 cm en el *Ficus elastica* "Decora", 8,27±0,19 cm en el "Tricolor" y 6,50 cm en el "Blue". Hay que destacar que en los cultivares "Decora" y "Tricolor", el número de hojas era 7,33±0,33 y 6,67±0,33, respectivamente, mientras que en el "Blue" sólo había 3 hojas. Hubo, por tanto, una fuerte pérdida de hojas durante su cultivo lo que, tal y como indicábamos al hablar de la aclimatación de plantas, sugiere que nos encontramos ante una variedad de cultivo difícil y delicado, que responde a los cambios de temperatura, al estrés hídrico o a otros cambios ambientales bruscos, con la pérdida progresiva de sus hojas. Esto podría representar un problema importante a la hora de introducir el *Ficus elastica* "Blue" en el mercado de las plantas ornamentales. Este problema habrá que resolverlo antes de considerar la introducción del *Ficus elastica* "Blue" en el mercado de plantas ornamentales.

Después de un año de cultivo en invernadero, el tamaño de las hojas del cultivar "Decora" (126,55 cm<sup>2</sup>), fue mayor que el tamaño de las hojas de los cultivares de hojas variegadas (24,11 cm<sup>2</sup> y 24,79 cm<sup>2</sup> en el "Tricolor" y "Blue", respectivamente).



**Tabla 3.-** Características del *Ficus elastica* "Blue", "Tricolor" y "Decora" con plantas de 1 año cultivadas en macetas de 9 cm de diámetro.

VARIABLE	Blue	Tricolor	Decora
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	6,30	7,03±0,32	12,93±0,62
2ª hoja desarrollada	6,10	7,00±0,30	14,63±0,78
3ª hoja desarrollada	6,70	6,87±0,28	14,02±0,60
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	2,95	3,43±0,36	7,47±0,78
2ª hoja desarrollada	3,10	3,35±0,24	8,65±1,34
3ª hoja desarrollada	3,70	3,38±0,19	7,88±1,01
<b>Longitud del área central<sup>(1)</sup> (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	3,20	6,30±0,15	-
2ª hoja desarrollada	4,80	6,53±0,28	-
3ª hoja desarrollada	5,50	6,07±0,23	-
<b>Anchura del área central<sup>(1)</sup> (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	0,60	2,83±0,38	-
2ª hoja desarrollada	1,10	2,50±0,29	-
3ª hoja desarrollada	1,80	2,67±0,17	-
<b>Altura total de la planta (cm)</b>	6,50	8,27±0,19	20,87±3,37
<b>Número de hojas totales</b>	3	6,67±0,33	7,33±0,33
<b>Longitud internodal<sup>(2)</sup> (cm)</b>	0,72	0,71±0,00	1,74±0,28
<b>Número de nudos</b>	9	12,00±0,00	12,00±0,00
(1)Es el área correspondiente a la extensión de color verde en los cultivares variegados.			
(2)Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.			

La extensión de la zona de color verde en las hojas del "Tricolor", después del primer año en invernadero, seguía siendo más grande que la de las hojas del cv. "Blue". Esta superficie era de 17,83 cm<sup>2</sup> en la primera hoja del "Tricolor" y de 9,9 cm<sup>2</sup> en la tercera del "Blue". Estas dos hojas eran las que poseían una mayor área de color verde en las plantas estudiadas.

En la tabla 4 se muestran las características de plantas de dos años cultivadas en macetas de plástico de 12 cm de diámetro. A los dos años de cultivo en invernadero, las plantas de los tres cultivares mostraban diferencias notables en sus características: Las plantas del *Ficus elastica* "Decora" alcanzaron una altura de 54,05±3,05 cm, las del "Tricolor" 37,10±1,36 cm y las del "Blue" 24,93±2,03 cm. Cabe destacar el incremento en la altura de las plantas parental "Decora", que fue dos veces mayor que el de las plantas del variante somaclonal "Blue". La longitud internodal era también mayor en el "Decora" (3,28±0,08 cm) que en el "Tricolor" (1,99±0,07 cm) y "Blue" (1,15±0,08 cm).

**Tabla 4.-** Características del *Ficus elastica* "Blue", "Tricolor" y "Decora" en plantas de 2 años cultivadas en macetas de 12 cm de diámetro.

VARIABLE	Blue	Tricolor	Decora
<b>Longitud de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	15,40±0,36	15,87±0,09	22,70±0,70
2ª hoja desarrollada	14,60±0,42	15,53±0,64	24,05±0,95
3ª hoja desarrollada	14,03±0,96	14,87±0,74	22,85±0,15
<b>Anchura de las hojas (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	9,02±0,16	9,57±0,03	12,55±0,25
2ª hoja desarrollada	8,95±0,13	9,35±0,23	13,25±0,75
3ª hoja desarrollada	8,57±0,41	9,42±0,21	13,15±0,65
<b>Longitud del área central<sup>(1)</sup> (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	12,17±0,24	14,03±0,43	-
2ª hoja desarrollada	12,03±0,78	14,13±0,44	-
3ª hoja desarrollada	11,77±0,93	13,43±0,85	-
<b>Anchura del área central<sup>(1)</sup> (cm)</b>			
1ª hoja desarrollada	5,83±0,44	8,03±0,52	-
2ª hoja desarrollada	5,47±0,09	7,03±0,80	-
3ª hoja desarrollada	5,53±0,29	7,50±0,36	-
<b>Altura total de la planta (cm)</b>	24,93±2,03	37,10±1,36	54,05±3,05
<b>Número de hojas totales</b>	22,00±2,08	18,33±0,88	16,00±0,00
<b>Longitud internodal<sup>(2)</sup> (cm)</b>	1,15±0,08	1,99±0,07	3,28±0,08
<b>Número de nudos</b>	21,67±1,33	18,67±0,33	16,50±0,50
(1)Es el área correspondiente a la extensión de color verde en los cultivares variegados.			
(2)Es el valor correspondiente a la media de las distancias internodales de cada planta.			

El número de hojas totales era mayor en el cv. "Blue" (22,00±2,08) que en el "Tricolor" y "Decora" (respectivamente, 18,33±0,88 y 16,00±0,00 hojas). Estos resultados indican que, a pesar de la pérdida de hojas que sufrió el "Blue" durante el primer año de cultivo, la tendencia se invierte y al segundo año se consiguen plantas de calidad aceptable. El número de nudos fue mayor en el "Blue" (21,67±1,33) que en el "Tricolor" (18,67±0,33), y en el "Decora" (16,50±0,50).

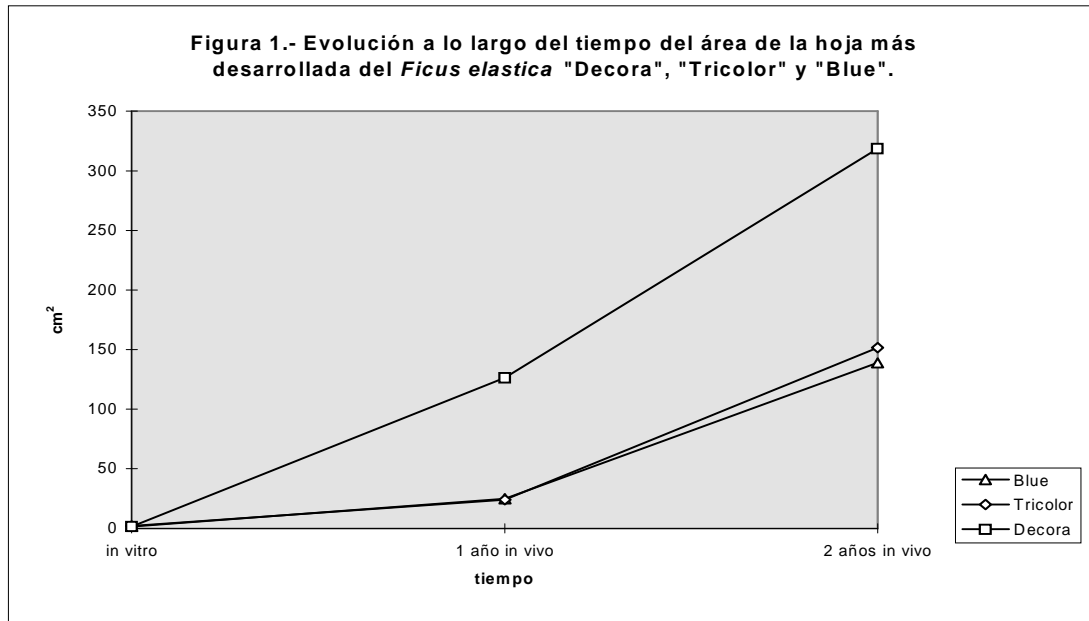
Las hojas más desarrolladas de los cultivares variegados "Blue" y "Tricolor" tenían un tamaño muy parecido. La hoja más desarrollada del cv. "Blue" (la primera hoja desarrollada) alcanzó un tamaño de 138,91 cm<sup>2</sup> y la más desarrollada del cv. "Tricolor" (que se correspondía también con la primera hoja desarrollada) llegó a alcanzar los 151,88 cm<sup>2</sup>. Las hojas del cultivar de hoja verde, *Ficus elastica* "Decora" eran mucho mayores (318,66 cm<sup>2</sup>).

Las extensiones de las áreas de color verde seguían siendo menores en el "Blue" que en el cv. "Tricolor". Así, mientras el área de color verde de la primera hoja desarrollada en el *Ficus elastica* "Blue" era de 70,95 cm<sup>2</sup>, en la primera hoja desarrollada del "Tricolor" esta superficie alcanzaba un valor de 198,24 cm<sup>2</sup>.

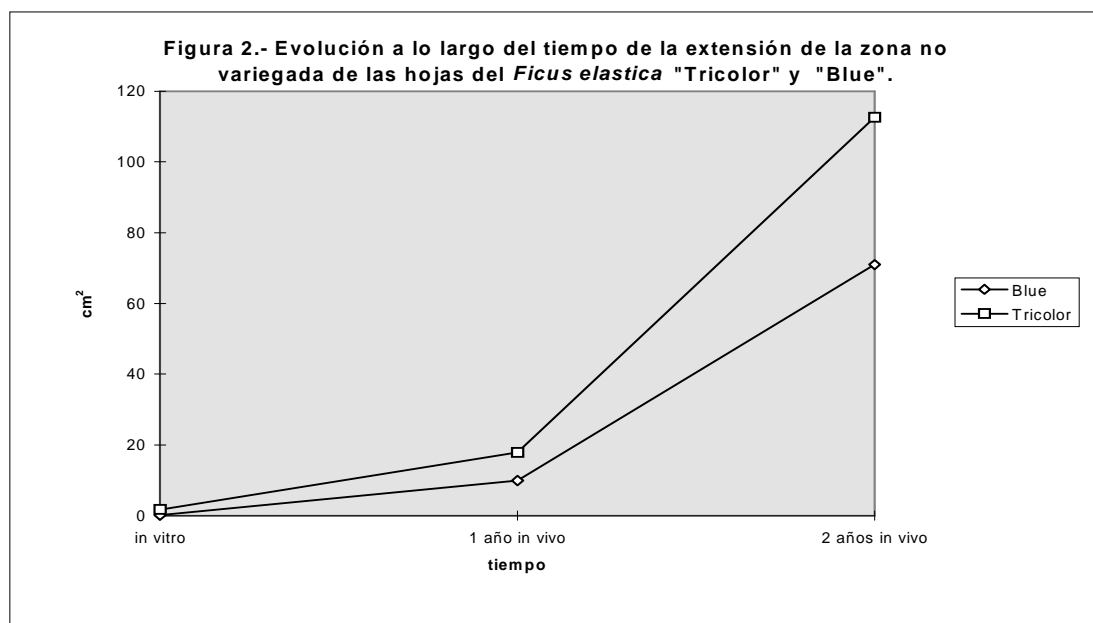
En las figuras siguientes se representa la variación a lo largo del tiempo de algunas características de las plantas de *Ficus elastica* "Decora", "Tricolor" y "Blue". Una de ellas fue la variación del tamaño de la hoja más desarrollada a lo largo de los dos primeros años de cultivo. Esta característica se calculó considerando la hoja como un rectángulo cuyos lados vienen definidos por la anchura y la longitud de la hoja. Otra rasgo que se representó gráficamente fue la relativa a la extensión de la zona de color verde de las hojas de los cultivares de hojas variegadas, "Tricolor" y "Blue". También se representaron gráficamente a lo largo del tiempo la altura total de la planta (cm), el número de hojas totales y la distancia internodal (cm).

Los momentos en los que se tomaron las medidas fueron: 1.- Tras la etapa de enraizamiento *in vitro*, 2.- Al año de cultivo en invernadero y 3.- Después de dos años en invernadero.

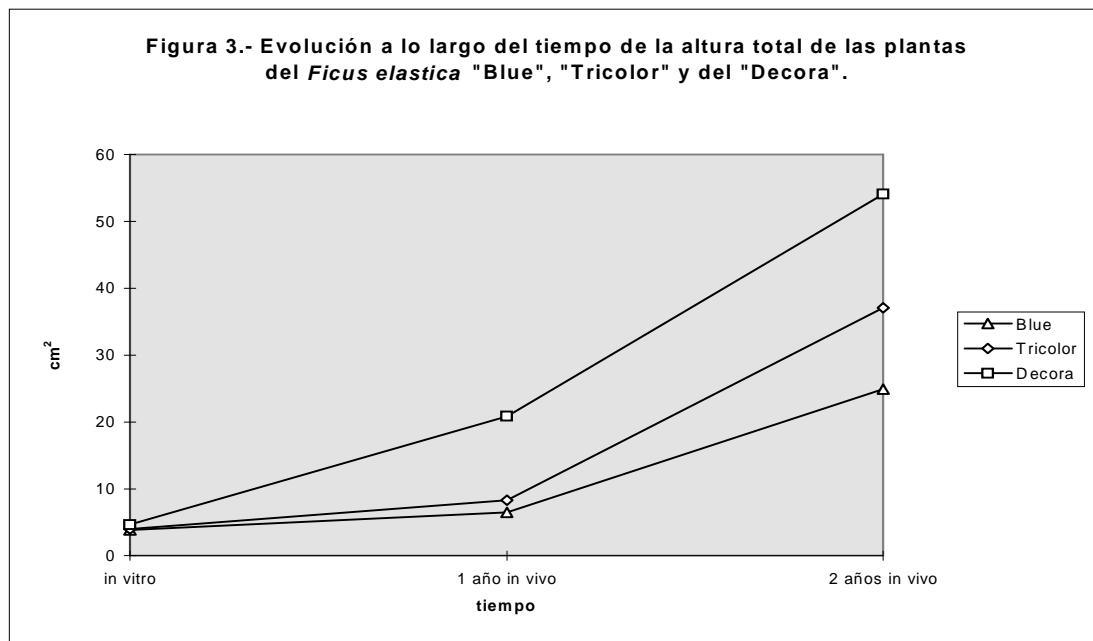
En la figura 1 se muestra la evolución del tamaño de la hoja más desarrollada. Como puede verse, a medida que las plantas iban creciendo, las diferencias en el tamaño de las hojas del cv. "Decora", por un lado, y de los cvs. "Blue" y "Tricolor", por otro, se iban acentuando. Las hojas del "Tricolor" y "Blue" fueron casi iguales, al menos durante los dos primeros años de cultivo en el invernadero.



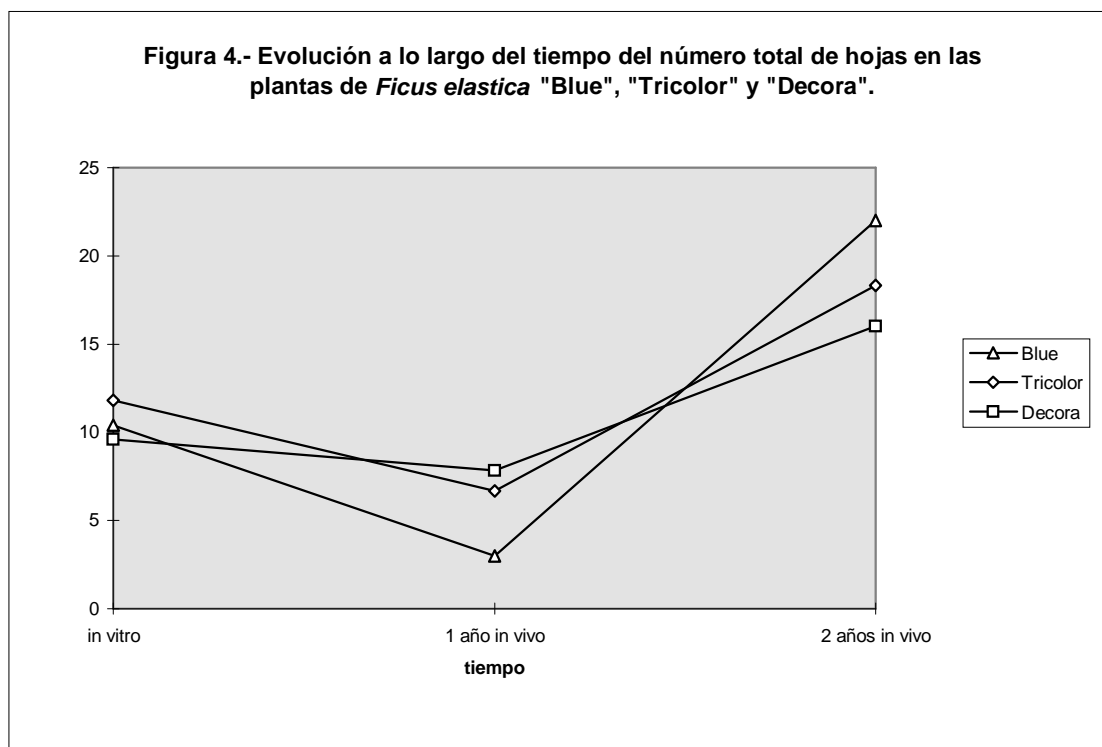
En la figura 2 se muestra la evolución en el tiempo de la extensión de la zona de color verde en las hojas de los cultivares de hoja variegada. Los resultados indican que la superficie de la zona central de color verde o verde claro de las hojas del "Tricolor" era, en todo momento, mayor que la del "Blue".



Al estudiar la evolución de la altura de las plantas (figura 3) se comprobó que las plantas del cultivar de hojas verdes, *Ficus elastica* "Decora", crecían más rápidamente y con mayor vigor que las plantas de los cultivares de hojas variegadas. Hubo diferencias importantes en el crecimiento de las plantas de los cvs. "Tricolor" y "Blue". La altura del variante "Blue" era siempre menor que la del "Tricolor". El crecimiento del cultivar "Blue" fue más lento y menos vigoroso que el de los otros cultivares debido, probablemente, a la menor extensión de zonas de color verde en las hojas.

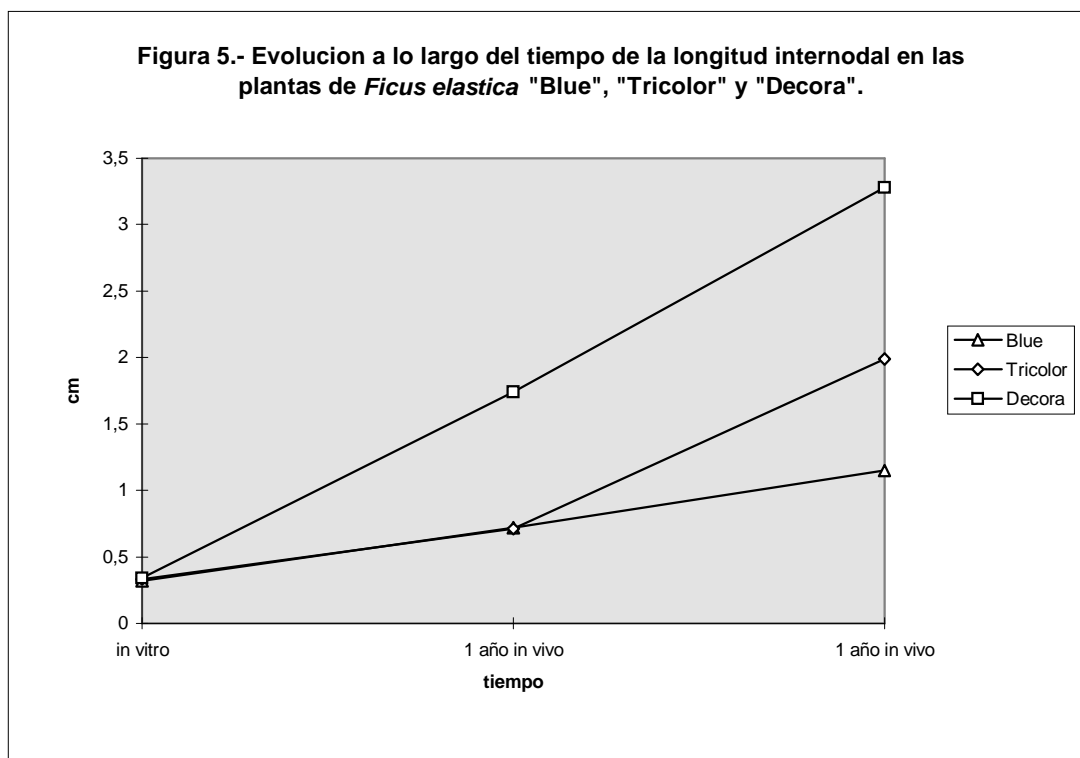


Tal y como puede verse en la figura 4, hubo un momento crítico en el cultivo de las plantas del *F. elastica* "Blue": al año de cultivo en invernadero, las plantas del cv. "Blue" habían perdido una buena parte de las hojas. En general, la pérdida de hojas en los *Ficus elastica* suele estar asociada a ciertos problemas ambientales y de cultivo, tales como el exceso de humedad en el sustrato, bajas temperaturas, etc. En este caso se comprobó que las plantas del *Ficus elastica* "Blue" perdían sus hojas con mayor facilidad que los otros cultivares ("Tricolor" y "Decora") debido, probablemente, a estar sometidas a ambientes poco favorables. Este hecho parece indicar que se trata de una planta de cultivo difícil.



Sin embargo, contra lo que cabría esperar, a los 2 años de cultivo las plantas del nuevo cultivar "Blue" tenían un mayor número de hojas que las de los cvs. "Decora" y "Tricolor". Esto indica que, con el tiempo, las plantas se habían habituado a las condiciones climáticas del invernadero, tolerando mejor los cambios climáticos que se producían a lo largo del desarrollo de las plantas.

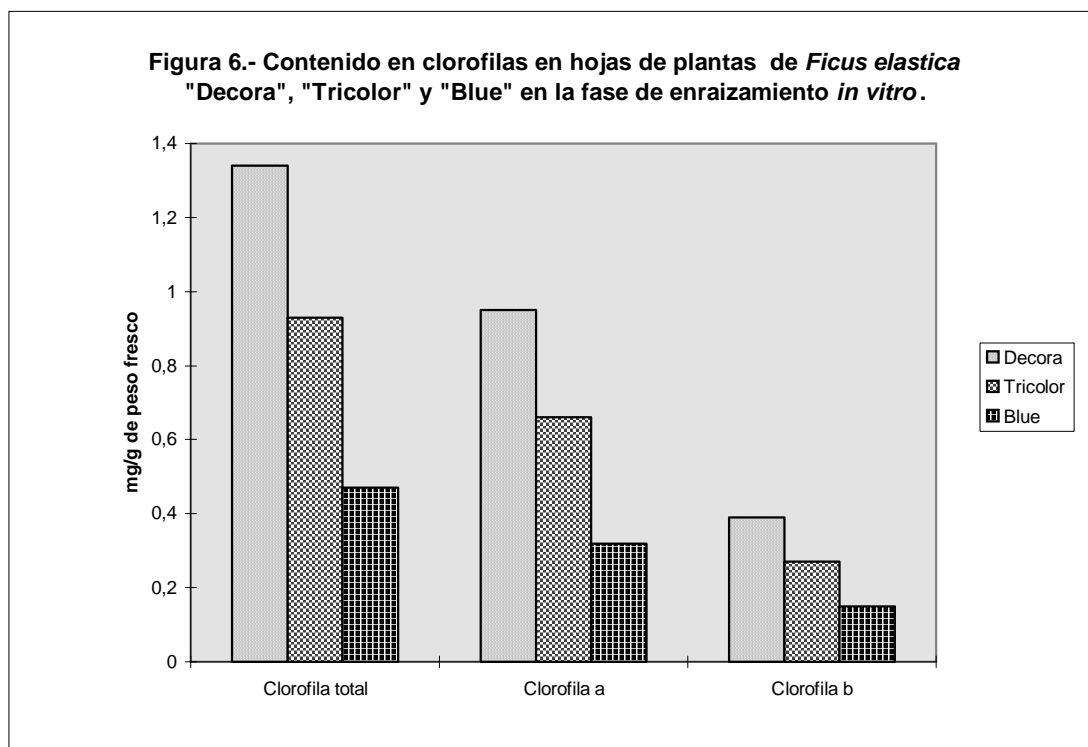
En la figura 5 se muestra la evolución de la longitud internodal con el tiempo. Las plantas del cv. "Decora" tuvieron en todo momento una longitud internodal mayor que las del "Tricolor" y éstas, a su vez, mayor que las plantas del "Blue". Estos valores fueron aumentando con el tiempo.



**Contenido en clorofila total, a y b en hojas del *Ficus elastica* "Decora", "Tricolor" y "Blue".-**

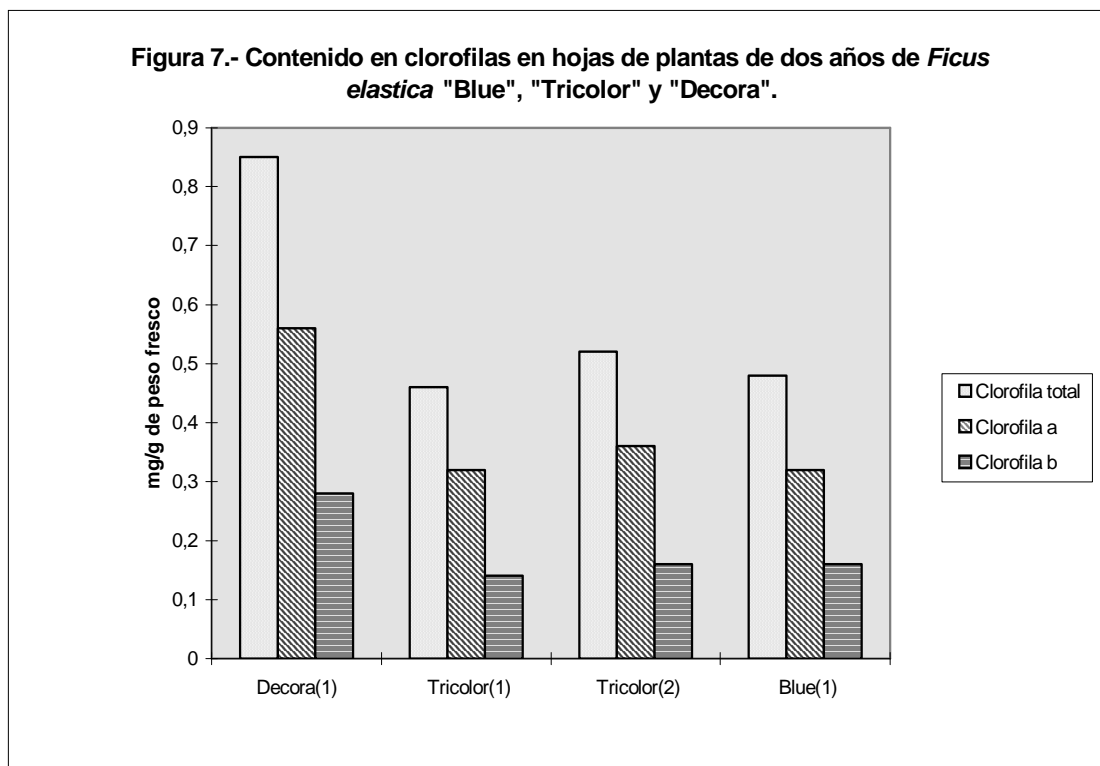
El 17 de agosto de 1997 se tomaron hojas de plantas en la fase de enraizamiento *in vitro* de los tres cultivares "Decora", "Tricolor" y "Blue" y se les realizó una extracción de clorofilas totales para ver las diferencias que pudieran existir, sobre todo, entre los cultivares de hojas variegadas.

Como se aprecia en la figura 6, el contenido en clorofilas en las hojas del parental *Ficus elastica* "Decora" fue mayor que el de las hojas del "Tricolor" que, a su vez, fue mayor que el de las hojas del nuevo variante "Blue".



Posteriormente, el 26 de noviembre, de 1998 se realizó otra extracción de clorofilas en hojas de plantas de 2 años de edad de los tres cultivares (figura 7). En el caso del "Tricolor", en esta ocasión se tomaron hojas de plantas situadas en dos invernaderos diferentes: uno de ellos permitía un mayor paso de la luz y en el otro, la intensidad luminosa era menor por el sombreado con una malla negra. A pesar de ello, no apreciamos grandes diferencias en el contenido de clorofilas en las hojas de las plantas del "Tricolor" cultivadas en estos dos invernaderos con distinta luminosidad. Tampoco encontramos diferencias en el contenido en clorofilas de las hojas de plantas de los cvs. "Blue" y "Tricolor". Las hojas del parental "Decora" contenían, como es natural, más clorofila que los cultivares de hojas variegadas aunque las diferencias se habían reducido mucho en comparación con los valores que se habían obtenido en el ensayo anterior. Todas las extracciones de clorofilas se realizaron siguiendo el método descrito en el apartado correspondiente al *Ficus lyrata*.





- (1) Hojas de plantas tomadas del invernadero más umbrío  
 (2) Hojas de plantas tomadas del invernadero más luminoso

## Resumen.-

El cultivar "Blue" es un nuevo variante de *Ficus elastica* que se caracteriza por una variegación especial en sus hojas que presentan una zona de color verde, verde intenso y verde claro alrededor de la vena central. Esta área está rodeada por otra zona de color crema o blanco amarillento que se extiende hasta los márgenes de la hoja. Se distingue de otros cultivares de hoja variegada de *Ficus elastica*, porque la superficie de la zona de color verde es menor (151,88 cm<sup>2</sup> en el "Blue" frente a 318,66 cm<sup>2</sup> en el "Tricolor") y porque las hojas jóvenes no tienen la típica zona de color crema, aunque ésta va apareciendo gradualmente, a medida que las hojas se hacen adultas.

El variante "Blue" apareció en un tarro de cultivo, entre un grupo de plantas de *Ficus elastica* "Decora" cultivadas *in vitro*, y lo detectamos gracias al color verde claro de sus hojas y que lo hacían diferente al resto de las plantitas. La nueva planta se propagó vegetativamente mediante cultivo de tejidos, siguiendo un procedimiento estándar y, además, las características fenotípicas se mantuvieron.

---

Las características que distinguen al cv. "Blue" de otras variedades de *Ficus elastica* son:

1.- El color de las hojas del "Blue" es blanco o amarillo claro, con una variegación de color verde oscuro y verde claro de dimensiones variables, que se extiende desde la vena principal hacia ambos lados de la misma. El tipo de variegación de la hoja es similar al del "Tricolor" (otro cultivar de hojas variegadas) pero el área de color blanco en el "Blue" es mucho mayor que en el "Tricolor". Esto da como resultado una planta de apariencia diferente a la de otras variedades del *F. elastica*.

2.- Las hojas nuevas presentan 2 zonas con distintas intensidades de color verde. Una zona central de color verde oscuro y otra, más marginal, de color verde claro. En este tipo de hojas no existe, en ningún caso, ninguna zona de color blanco o crema. El color blanco está presente sólo en las hojas adultas, pero no en las hojas en crecimiento activo. Este rasgo diferencia, claramente, al nuevo variante "Blue" de otros cultivares de hojas variegadas del *Ficus elastica*.

3.- Entre la zona de color blanco y la otra zona irregular de color verde intenso, que se encuentra rodeando la vena central, existe una zona de color verde más claro que las separa.

4.- El color del peciolo de las hojas del cv. "Blue" es de color verde claro, mientras que el peciolo del "Tricolor" es de color rojizo.

#### **Descripción del variante "Blue".-**

**Propagación:** Se puede propagar mediante esquejes o por cultivo de tejidos. El mejor método es la propagación por cultivo de tejidos ya que el material vegetal obtenido por este sistema nos proporciona hojas jóvenes de color verde claro y verde intenso. Estas plantas son, por lo general, más ramificadas y, por consiguiente son mucho más atractivas que las procedentes de un esquejado tradicional, cuyas hojas, por tratarse de un material más adulto, contienen grandes áreas de color blanco y su crecimiento es mucho más lento. Las plantas obtenidas son uniformes y mantienen sus características fenotípicas iguales a las del parental.

**Planta:** La planta tiene la forma usual de todos los *F. elastica*. El tallo principal es erecto, con algunas ramas que presentan un ángulo de 45°-60° con respecto a la vertical. La ramificación es

más bien escasa o incluso rara con excepción de las plantas procedentes del cultivo *in vitro*. Si las plantas se han reproducido de esqueje, la ramificación sólo ocurre en plantas adultas con una altura de 80-100 cm o más. Las partes jóvenes del tallo son verde claro y empiezan a endurecerse y tomar color de madera rápidamente a partir de la base del peciolo.

**Crecimiento:** La apariencia general y el hábito de crecimiento del "Blue" se corresponden con los de otras variedades de la especie. No obstante, debido a las grandes áreas de color blanco en las hojas, el cv. "Blue" crece algo menos que el *Ficus elastica* "Tricolor" y mucho menos que el *Ficus elastica* "Decora" (ver tablas 1,2 y 3).

### **Hojas:**

- **Forma:** De elíptica a acuminada con un extremo puntiagudo, estrechas y carnosas. El cv. "Blue" tiene las hojas algo más redondeadas si las comparamos con las hojas, generalmente ovales, del "Tricolor" y del "Blue", sobre todo en las primeras fases de crecimiento.

- **Tamaño medio:** 16 cm de longitud y 9 cm de ancho a los 2 años

- **Margen:** liso.

- **Aspecto:** La superficie de la hoja es ligeramente ondulada.

- **Textura:** Brillante y lustrosa.

- **Peciolo:** De unos 2 cm de longitud.

- **Venas:** Una vena central gruesa y unas venas laterales finas que se extienden desde la vena central hasta el margen. La vena central de las hojas jóvenes es de color verde intenso y, más tarde, cambia a verde claro o casi amarillo.

- **Variación:** La zona central, alrededor de la vena central, es de color verde intenso y luego verde claro. Esta zona ocupa menos del 50% de la superficie total de la hoja. La superficie restante es de color blanco amarillento o crema.



(A) Propagación *in vitro* de *Ficus elastica* "Blue". (B) Plantas del variante "Blue" tras la fase de aclimatación. (C) Vista general de un cultivo a gran escala de plantas del variante "Blue" en maceta de 9 cm de diámetro. (D y E) Detalle de la pigmentación de las hojas del variante "Blue". (F) Grupo de plantas de *F. Elastica* "Blue" cultivadas en maceta de 14 cm de diámetro.



**V.- Variación somaclonal en *Ficus benjamina***



---

## **Introducción**

El *Ficus benjamina* es un arbusto de interior de crecimiento denso. Tiene ramificaciones colgantes y está provisto de ramas flexibles y tallo no demasiado robusto. En la naturaleza emite raíces aéreas y puede incluirse dentro de las especies denominadas "estranguladoras", las cuales desarrollan su aparato radicular hasta alcanzar el sustrato. Al crecer como epífitos rodean al patrón u hospedante con su estructura hasta llegar a formar una especie de tronco hueco, en cuyo interior se destruye lentamente la planta patrón. Sin embargo, este fenómeno sólo ocurre en las zonas de las que procede la especie, pudiendo también comportarse como planta terrestre, sin manifestar esta característica<sup>10</sup>.

El *Ficus benjamina* (*weeping fig* o ficus llorón) es muy similar al *Ficus retusa*, pero con las ramas caídas hacia abajo, tiene las hojas tersas, en forma de huevo, puntiagudas y perennes, que pueden llegar a medir 12,5 cm de longitud. Es indígena de las zonas más húmedas de la India y Burma y de varias islas incluyendo las Filipinas. Emite raíces desde sus ramas y desarrolla un sistema extensivo de raíces superficiales que salen radialmente del tronco.

Las hojas son pecioladas, brillantes, moderadamente coriáceas, de color verde oscuro; ovales, elíptico-ovaladas u oval-lanceoladas, más bien estrechas y con el ápice acuminado, alcanzan de 8 a 12 cm de longitud y unos 2,5 cm de ancho; los nervios laterales son finos y bastante numerosos, entrecruzándose libremente en los bordes de la hoja. Son enteras y algo arrugadas, su peciolo mide aproximadamente 2,5 cm de longitud. Las flores se encuentran en las axilas, de dos en dos y son sésiles. Los frutos son pequeños, globosos u ovoides de color rojo oscuro al llegar a la madurez y suelen alcanzar unos 0,8 cm de diámetro.

La planta puede alcanzar hasta los 5 m de altura en sus regiones originarias, pero en nuestras latitudes pocas veces llega a los 3 m.

En el invernadero requiere humedad constante todo el año. Durante el verano precisa cierta cantidad de agua, mientras que en invierno los riegos han de ser escasos, ya que es una planta sensible al exceso de agua. Su temperatura mínima es de unos 10°C y la máxima de unos 24°C. La multiplicación se realiza tradicionalmente por esqueje, ya que la reproducción por

---

<sup>10</sup> Tomado del New York Botanical Garden Illustrated. Encyclopedia of Horticulture. Thomas H. Everett.



semilla está poco estudiada. El método del anillado es el mejor para realizar el acodo aéreo en las plantas de *Ficus benjamina* (Broschat y Donslam, 1985).

En general, el valor ornamental de las plantas de *Ficus benjamina* es mayor en un régimen de altas temperaturas. Los requerimientos de calor de estos cultivos se pueden suministrar mediante sistemas de cama caliente aplicando temperaturas mayores de 30°C a la zona de las raíces (Vogelezang, 1991). Zocca y Benini (1993) cultivaron plantas de *Ficus benjamina* cv. "Cleo" procedentes de micropropagación en macetas de 10 cm de diámetro con temperaturas y sustratos diferentes. Los resultados mostraron que temperaturas mayores de 30°C y una fertilización de 600-700 mg de N/l estimulan el crecimiento de las plantas.

El uso de reguladores de crecimiento para conseguir plantas más compactas y retardar su crecimiento está muy extendido. Barret y Nell (1985) comprobaron que un tratamiento con isopyrimol y paclobutrazol a 5-10 mg en una solución aplicada directamente al sustrato o 500 ppm en forma de *spray* reducía la elongación de brotes en plantas de *Ficus benjamina*. De forma similar, las plantas de *Ficus benjamina* tratadas con una solución de 0,125-8 mg/l de paclobutrazol directamente al suelo en macetas de 10 cm de diámetro, mostraban una disminución en la altura, en la producción de hojas, en la longitud internodal y en el tamaño de las hojas (Le Cain *et al.*, 1986). En otros experimentos la aplicación de los reguladores de crecimiento B-Nine SP (Daminozide) a 2500-10,000 ppm, B-Nine SP+Cycocel (Chlormequat) a 1000 ppm, Cycocel a 2000 ppm, Sumagic (Uniconazole) a 10-30 ppm o Bonzi (Paclobutrazol) a 60 ppm tuvo un efecto importante en el retraso del crecimiento de plantas de *Ficus benjamina* y, por otro lado, no produjo ningún efecto tóxico (Tjosvold, 1991). La intención de los tratamientos con reguladores de crecimiento es obtener productos más compactos y homogéneos, que resulten más fáciles de cultivar en los invernaderos y que sean más atractivos para el consumidor. Este efecto se puede conseguir mediante la propagación clonal de las plantas por cultivo de tejidos, eliminando de esta forma los costes de la mano de obra necesaria para efectuar los tratamientos y del producto en sí que, por lo general, son muy altos.

Si a las plantas de *Ficus benjamina* se les aumenta el nivel de sombreado y los niveles de fertilización, aumenta el nivel de clorofilas en las hojas, el tamaño de las plantas y la calidad visible. Se ha comprobado que el contenido en clorofilas por unidad de área de la hoja aumenta con el nivel de fertilización. Sin embargo, el tamaño de las hojas y la calidad visible disminuye con niveles de fertilización excesivos. Hay un máximo en el nivel de fertilización hasta el cual el crecimiento, expresado en términos de tamaño de hoja aumenta con el abonado (Colland *et al.*, 1977; Ceulemans *et al.*, 1983).

Con respecto a la influencia de la iluminación, las plantas de *Ficus benjamina* producidas bajo una sombra del 40-80% eran más grandes y tenían un valor ornamental más alto y un color del follaje más atractivo que las plantas cultivadas bajo el sol, después de 9 meses de crecimiento (Conover y Poole, 1977). En general las plantas de *Ficus benjamina* respondían muy bien a la iluminación suplementaria. De hecho aumentaba el tamaño de la planta, la ramificación y el número de hojas.

Para plantas con un bajo requisito de luz es mejor el uso de poca luz durante muchas horas que no mucha luz en un periodo de tiempo corto (Hendriks y Ludolph, 1988). A temperaturas altas, la intensidad luminosa es un factor limitante pero esto puede evitarse en días cortos adicionando horas de luz artificial. A temperaturas altas, del orden de 30-33°C, las plantas desarrollan hojas muy pequeñas y tienen una mayor relación altura/anchura (Romstad, 1989). La caída de las hojas y la necrosis de las hojas eran significativamente más grandes en plantas situadas en condiciones de baja intensidad luminosa que en plantas situadas en condiciones de alta intensidad luminosa (Mulderij, 1991).

El área superficial de las plantas y de las hojas aumentó al suministrarles luz suplementaria durante los meses de invierno. Una luz de apoyo aplicada durante diciembre y marzo redujo considerablemente (seis semanas) el tiempo de cultivo. Las plantas de *Ficus benjamina* se benefician de la luz suplementaria aplicada en cualquier momento del día o de la noche. Así, las plantas sometidas a intensidades luminosas relativamente altas no mostraron síntomas de clorosis o necrosis durante el verano siguiente, haciendo innecesario el acostumbrado sombreado de las plantas durante el verano a no ser que el valor de la luz natural fuera superior a 50 klux (Hell *et al.*, 1992).

Min y Lee (1992) cultivaron plantas de *Ficus benjamina* "Wg-1" bajo cuatro intensidades de luz, reduciendo la luz solar mediante sombreado del 0, 30, 60 y 90%. Las plantas cultivadas bajo luz natural fueron más altas, tuvieron un mayor número de hojas y una mayor densidad de hojas que las plantas cultivadas bajo sombra. Las hojas fueron más pequeñas y estrechas y de un color verde más claro en condiciones de luz natural. El crecimiento global de las plantas fue mejor con un sombreado del 60%. Las plantas se aclimataron mejor a las intensidades de luz más bajas (60-90% de sombreado) que a las más altas (0-30%).

En otro ensayo independiente, las plantas de *Ficus benjamina* cultivadas en condiciones de un 92% de sombra contenían más clorofila total y más clorofila a y b que las plantas cultivadas a pleno sol (Sarracino *et al.*, 1992).

Conviene tener en cuenta que donde se cultivan plantas de *Ficus benjamina* la iluminación debe ser alta para promover la formación de reservas en la planta, haciendo que pueda vivir más tiempo en la casa del consumidor. La aplicación de nitrógeno es también muy importante y el nivel suministrado durante el último tercio del periodo de cultivo de la planta no debería ser muy alto (Hell *et al.*, 1994).

### Descripción de los cultivares más importantes

Los cultivares de *Ficus benjamina*<sup>11</sup> más importantes son:

***benjamina*** (India, Malasia) “weeping fig”. Es un hermoso árbol de crecimiento muy denso y ramas que caen hacia abajo. Las hojas brillantes y profundamente verdes son ovaladas y largas, con una punta muy fina y una longitud de 10-15 cm. Los frutos pequeños y redondos son, al madurar, de color rojo sangre. Produce raíces aéreas.

***benjamina* “Exótica”** (Java, Bali) “Java fig”, especialmente gracioso. Tiene forma de llorón y finas ramas arqueadas. Sus hojas pendulares, de color verde lustroso, coriáceas y oblicuas añaden un encanto especial debido al trenzado de sus puntas ligeras. Tiene frutos pequeños de color rojo en forma de baya.

***benjamina nuda*** (Filipinas), Es una variedad de hojas pequeñas plantada en Florida del Sur, donde ha crecido hasta constituir grandes árboles, y donde se le ha venido a conocer como “Philippinense”. Las hojas brillantes se inclinan hacia las puntas de las ramas en zig-zag, tienen de 4 a 5 cm de longitud, son más estrechas que las del *Ficus benjamina*, más afiladas en la base y ligeramente puntiagudas, y con un par de venas basales muy claras que transcurren hasta cierta distancia por encima de los márgenes antes de la unión con la parte basal de las venas laterales. Los minúsculos frutos son de color verde amarillento, y tienen brácteas basales que caen prematuramente desnudando los frutos.

### Variabilidad existente

---

<sup>11</sup> Descritos en el Exotica 3: Pictorial encyclopedia of exotic plants. Guide to care of plants indoors. A. Byrd Graf. Century, 1970.

La calidad de los *Ficus* va aumentando: la expectativa de vida, la caída de hojas, y la tolerancia al transporte ha mejorado día a día. Un largo número de variedades ha contribuido a que sólo las plantas con las propiedades más favorables sean las que se cultivan de manera general

En los últimos cuatro años se han desarrollado cerca de 60 nuevas variedades de *Ficus*, de las que sólo 10 han sobrevivido a los procesos de selección para elegir los mejores. Estas nuevas variedades denominadas "crackers" jugarán en un futuro cercano un papel muy importante en el surtido de los *Ficus* en el mercado.

Algunos ejemplos de estas variedades de éxito son el cultivar "Vivian" con hojas verde oscuro, y el cultivar "De Gautel" con hojas de color verde grisáceo. Otra variedad muy importante es la "Danielle". Esta variedad, de crecimiento compacto, presenta un color extremadamente oscuro en el follaje, y además, su expectativa de vida es excelente, incluso si las plantas se colocan en un sitio oscuro.

El *Ficus benjamina* es conocido por la abundancia de genotipos con diferentes caracteres fenotípicos. Hay gran cantidad de literatura en la que se describen los distintos tipos de estrés que influyen en la abscisión de las hojas de estos cultivares pero realmente no se sabe si las diferencias observadas son debidas a los tratamientos experimentales o a las características innatas de los clones específicos usados por los diferentes investigadores (McWilliams, 1991). Así por ejemplo, en un experimento realizado por Ben Jacob *et al.* (1985) se comprobó que una baja intensidad luminosa provocó la abscisión de hojas y que el modelo de respuesta a la intensidad luminosa durante la fase de producción (con vistas a la caída de las hojas a lo largo de esta fase) y su relación con la posterior caída de hojas durante las condiciones de interior mostraron una clara dependencia del genotipo en cuestión.

Algunas de las variedades más importantes de *Ficus benjamina* que se están comercializando en la actualidad se obtuvieron hace poco tiempo. El *Ficus benjamina* variegado, denominado "Golden princess", tan frecuente en nuestras floristerías y centros de jardinería se obtuvo en un programa de mutación llevado a cabo en Bélgica (Loose, 1981). Se obtuvieron otras nuevas variedades después de estrictos procesos de selección. Después de evaluar más de 24 cultivares comerciales de *Ficus* en base a la forma, el poder de ramificación, la textura y el color del follaje, la facilidad de enraizamiento, la tasa de crecimiento y los

requerimientos de poda, se dedujo que los mejores cultivares eran: “Florida spire”, “Jacqueline”, “Hartman’s”, “Nuda”, “Spearment” y “Wintergreen” (Henley y Poole, 1989).

Otras variedades seleccionadas se registran y protegen. Entre ellas cabe resaltar el cultivar “Reginald”, habitualmente cultivado en nuestros viveros, que surgió como un *sport* de la variedad de hojas no variegadas “Exotica”. Esta variedad de *Ficus benjamina* se registró como nuevo cultivar ornamental en Australia. Se tabularon sus características morfológicas con respecto al “Exotica”, “Golden princess”, “Hawai” y “Star light”. Los colores predominantes de las hojas del “Reginald”, que cubren un 80% de la superficie total de la hoja, son verde y amarillo (RHS 144A) (Deroose, 1994). El cultivar “Citation” se remitió al registro de las variedades de plantas de Australia. Los datos morfológicos tomados en plantas cultivadas en invernaderos se compararon con los datos del cultivar “Exotica”. El cultivar “Citation” tiene las hojas curvadas y rizadas, en forma de uve y con una apariencia global de planta muy densa. La longitud de la hoja, la altura de la planta y la longitud del internudo son más pequeñas en el cv. “Citation” que en el “Exotica” (Wood, 1994).

Según la Oficina de Plantas y Flores holandesa<sup>12</sup>, las variedades más importantes que se comercializaron en el año 1998 son:

**Danielle:** Es un *Ficus* de hojas fuertes, de color verde oscuro que se caracteriza por su durabilidad. Crece de forma compacta. En 1995 la subasta de flores de Aalsmer introdujo esta variedad como “Plant Primeur”.

**Midnight Lady:** Esta espléndida cascada de hojas onduladas es una joya dentro de la serie de color verde oscuro del *Ficus*. La planta tiene un crecimiento compacto. En 1996 “Midnight Lady” fue nombrada “Plant Primeur” por la subasta de Flores de Aalsmer.

**Naomy Beauty:** Como indica su nombre esta planta es una belleza. El crecimiento denso de las hojas redondas forman una planta bonita y compacta.

**Danielle Silver:** Es un mutante del cultivar “Danielle”. Se trata de una novedad del año 1998.

**Vivian:** Este *Ficus* difiere de sus antecesores por su lustrosa hoja de color verde oscuro, con unas manchas de color verde claro a lo largo del nervio.

**Exotica:** Este clásico sigue siendo la planta de maceta más popular. Tiene un color verde ligero y crece de forma compacta.

**Jessica:** Las ramas que sobresalen tienen pequeñas hojas enrolladas. Se caracteriza por un crecimiento compacto. “Jessica” es un mutante de “Natasja”.

---

<sup>12</sup> <http://www.flowerweb.nl/>

**Monique:** Es una planta completa que se conserva bien. Una característica notable es la forma escopleada de sus hojas, que le da una presencia especial.

**Samantha:** Las hojas de este *Ficus* se decoloran después de algún tiempo. La tonalidad de las hojas está formada por un corazón verde con un borde amarillo. Se introdujo en el mercado en 1993.

**Judith:** La variedad de colores de este *Ficus* de hoja pequeña le da una presencia fresca. Crece bien y con poca luz y no pierde las hojas fácilmente.

Las variedades de *Ficus benjamina* que se comercializan en la actualidad en Holanda, según el catálogo de plantas de interior de la Oficina Holandesa de Flores y Plantas del año 1997-1998, son:

-Variedades de hoja verde: "Bundy", "Danielle", "Esther", "Exotica", "Monique", "Natasja", "Norman S", "Riane", "Vivian" y "Wiandi".

-Variedades de hoja variegada: "Bushy king", "Curly", "De Gantel", "Golden king", "Reginald" y "Star light".

Según el Cost 90 y 93, las variedades de *Ficus benjamina* que se micropropagaron en distintos laboratorios europeos en 1990 y en años anteriores fueron el "Exotica", el "Mini lusi", el "Golden princess", el "Golden king" y el "Star light"; en el año 1993 fueron el "Exotica", el "Mini lusi", el "Golden princess" y el "Star light". Vemos que durante el intervalo de tiempo comprendido entre 1990 y 1993 no hubo un aumento en el número de variedades de *Ficus benjamina* que se micropropagaron a gran escala. Sin embargo en los últimos años el número de variedades de *Ficus benjamina* que se han comercializado en los grandes mercados de Europa ha aumentado considerablemente debido, sobre todo, a la obtención o selección de nuevas variedades aptas para la producción a gran escala o, al menos, con un gran valor ornamental.

El número de laboratorios que produjeron *Ficus benjamina* por micropropagación en los años 1990 y 1993, se muestran en la tabla 1:

<b>Tabla 1.- Número de laboratorios de cultivo <i>in vitro</i> que multiplican a gran escala plantas de <i>Ficus</i> en Europa</b>		
<b>Países</b>	<b>1990</b>	<b>1993</b>
Bélgica	5	4
República checa	-	1
Dinamarca	3	1
Eslovaquia	-	1
España	2	3
Francia	6	-
Grecia	2	2
Holanda	1	-
Italia	3	1
Finlandia	2	-
Reino Unido	-	1
<b>TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>14</b>
Tomado del Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories. Ediciones 1990 y 1993. Commission of the European Communities.		

Se observa que el número de laboratorios que micropropagaron el *Ficus benjamina* durante el año 1993 disminuyó en gran medida con respecto a los que lo hacían en 1990. Es de destacar que en 1990 había en Francia 6 laboratorios que producían *Ficus benjamina* a gran escala, mientras que en 1993 no había ninguno. Esta disminución tan espectacular puede inducir a pensar que se ha reducido en gran medida la producción mundial o europea del *Ficus benjamina*. Nada más lejos de la realidad puesto que el *Ficus benjamina* es, en la actualidad, la planta de interior más vendida del mundo (Jiménez Megías, 1998).

Curiosamente, en España el número de laboratorios comerciales que micropropagaron plantas de *Ficus benjamina* durante este periodo no sólo no disminuyó, sino que aumentó de dos a tres.

Se han hecho comparaciones entre las plantas micropropagadas y las procedentes de otros métodos clásicos de propagación. Se hicieron esquejes de 10 cm de 10 clones (entre los que se encontraba el cultivar "Cleo"). Algunas plantas provenían del cultivo de tejidos y otras de esquejes convencionales. Las plantas que venían del *stock* de cultivo de tejidos enraizaron más rápidamente y dieron lugar a plantas más largas y con más ramificación y follaje. Hubo alguna variación entre las plantas de los distintos clones, pero el comportamiento de éstos fue mucho más homogéneo en las plantas micropropagadas. El cv. "Cleo" fue uno de los mejores clones.

Se trata de una selección clonal del *Ficus benjamina*, cuya tasa de multiplicación y crecimiento era más rápida cuando se propagó en cultivo *in vitro* que cuando se hizo por vía de esquejes. Se observaron diferencias significativas entre los distintos clones en la tasa de proliferación y el tiempo que tarda en emerger la primera raíz producida *in vitro*. El clon "Cleo", previamente seleccionado por su velocidad de crecimiento como planta de maceta manifiesta también la mayor tasa de proliferación y el tiempo más corto hasta que aparece la primera raíz *in vitro* (Kristiansen, 1988; 1990; 1992).

En general, las plantas de *Ficus benjamina* cv. "Exotica" procedentes de cultivo de tejidos, producen plantas más compactas, con más ramas y de mejor calidad que las procedentes de propagación por esqueje (Kromwijk y Mourik, 1990)

### **Nuevas características deseables**

En las plantas de *Ficus benjamina* que se comercializan el problema principal es la gran pérdida de hojas que normalmente sufren todos los genotipos cultivados tras un periodo de almacenaje, un periodo de transporte o simplemente después de un cambio de situación de las plantas, como por ejemplo un traslado desde el invernadero al punto de venta o desde aquí hasta el hogar de un posible comprador. Es, pues, un objetivo primordial la selección de clones o cultivares que resistan a la caída o necrosis de sus hojas después de un cambio de situación o de un traslado.

En principio cualquier cultivar que se desarrolle bien en condiciones de sombra en los invernaderos podría adaptarse mejor a las condiciones de luminosidad del interior de una casa y, por tanto, no sufriría una caída tan importante de hojas como para perder gran parte de su valor ornamental y, por consiguiente, perder en gran medida su valor económico.

Las plantas que van a ser motivo de una producción intensiva en invernadero con fines de comercialización como plantas ornamentales deben reunir una serie de características: crecimiento rápido, compacto y, al mismo tiempo, uniforme; que desarrollen una buena ramificación; que la elongación de las ramas sea adecuada de forma que no aparezcan ramas delgadas o desgarbadas; que produzca un buen número de hojas con tamaño adecuado para obtener una buena densidad de hojas que aumente la calidad visual de la planta; y, por otra parte, que el tono de sus hojas proporcione un buen color al follaje general de la planta para que la convierta en un producto atractivo para el consumidor.



Aunque existen en el mercado un gran número de tipos con hojas variegadas, otra característica deseable es la obtención de nuevas variedades con distintos patrones de variegación respecto a las ya existentes, que sean productos totalmente nuevos y que puedan alcanzar su propio lugar dentro del mercado de las plantas de interior.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y métodos para el cultivo**

Se establecieron *in vitro* líneas permanentes organogénicas a partir de ápices de *Ficus benjamina*. A los 23 subcultivos apareció una plántula con hojas variegadas en un callo de una de estas líneas permanentes. A esta planta se le denominó *Ficus benjamina* “Mallorca”, y se propagó siguiendo el método, que se describe a continuación, utilizado para el *Ficus benjamina* “Exótica”.

Para el establecimiento de las líneas permanentes organogénicas se tomaron ápices laterales de plantas de *Ficus benjamina* “Exótica”, es decir, yemas terminales que estaban a punto de abrir. Estas yemas se tomaron junto con un segmento de tallo de unos 2 cm de longitud que, tras la desinfección, se redujo, en condiciones asépticas, hasta unos 3-5 mm, que fue el tamaño final del explante antes de su implantación *in vitro*. Para facilitar el desarrollo de las yemas, se eliminaron las brácteas o envoltorios exteriores que la rodean, dejando la yema con dos o tres hojas.

Las yemas se desinfectaron durante 15-20 minutos en una solución de 1,6 g/l de hipoclorito de sodio (lejía comercial) a la que se le adicionaron 2 gotas de Tween 20 cada 100 ml de solución. Los posibles efectos tóxicos de la lejía se eliminaron mediante 3 lavados de 10 minutos cada uno en agua desionizada estéril. Las yemas desinfectadas se inocularon en tubos estériles de 16x100 mm que contenían 5 ml de medio de cultivo de iniciación, adecuado para el establecimiento de los ápices de *Ficus benjamina* “Exótica” *in vitro*. En un principio, las yemas se transfirieron a medio fresco cada 24 horas hasta evitar la presencia de exudados de color pardo alrededor de la base del explante que pueden tener ciertos efectos tóxicos.

El medio de cultivo utilizado en el establecimiento de las yemas apicales de *Ficus benjamina* "Exotica" consistió en los macroelementos y microelementos de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 0,4 mg/l de tiamina-HCl, 100 mg/l de myo-inositol, 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar industrial (Pronadisa) y 1,25 mg/l de BAP, 0,5 mg/l de IAA y 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>. El pH del medio se ajustó a 5,7 mediante la adición de unas gotas de KOH 1N. Los recipientes con el medio de cultivo se esterilizaron al autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Los cultivos se mantuvieron en cámaras de cultivo de ambiente controlado a una temperatura de 23 ± 2°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, proporcionadas por tubos fluorescentes Osram del tipo luz día con una irradiación de 50  $\mu\text{w}/\text{cm}^2$  (1500lux) tanto para las fases de iniciación, como para las de multiplicación y enraizamiento.

Una vez establecidas *in vitro* las yemas de *Ficus benjamina* y después de permanecer en el mismo tubo de ensayo durante unas 3-4 semanas, se subcultivaron en recipientes de cultivo más grandes con medio de cultivo fresco. En la fase de multiplicación se utilizó el mismo medio de cultivo empleado durante la fase de iniciación. En cada frasco de cultivo de 500 ml con cuerpo de vidrio y tapa de plástico semitransparente se introdujeron unos 80 ml del medio de multiplicación, y se sembraron unos 20 explantes procedentes de la fase de iniciación o del subcultivo inmediatamente anterior. Se hacía un subcultivo cada 5 semanas y los inóculos consistían en pequeños grupos de plantas que resultaban de subdividir en 4 o 5 trozos el callo organogénico obtenido después de cada subcultivo. Se eliminó el callo basal y se cortaron las plantas en grupos más o menos grandes según se pretendiera seguir subcultivando las plantas en el medio de multiplicación o, alternativamente, transferirlas al medio de enraizamiento.

El medio de cultivo utilizado durante la fase de enraizamiento consistió en los macroelementos, diluidos a la mitad, y los microelementos de Murashige y Skoog (1962) suplementados con 0,2 mg/l de tiamina-HCl, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 100 mg/l de myo-inositol y 30 g/l de sacarosa. El medio se gelificó con 7 g/l de agar de tipo industrial y el pH se ajustó a 5,7 mediante la adición de unas gotas de KOH 1N. Los tarros con el medio de cultivo se esterilizaron al autoclave, a 121°C durante 30 minutos. En cada frasco de cultivo se sembraron 35-40 inóculos que consistían en pequeños grupos de 2-3 plantitas a las que se les había eliminado gran parte del callo basal. A las 3 o 4 semanas de permanencia en la cámara de cultivo en las condiciones de temperatura y fotoperiodo antes descritas, las plantas habían desarrollado un número de raíces suficientes para pasar a la fase de aclimatación *ex vitro*.

### **Aclimatación del material vegetal**

Se extrajeron cuidadosamente las plantas del frasco para evitar lesiones en sus raíces, se eliminaron los restos de agar que quedaban adheridos y se transplantaron a un sustrato a base de turba enriquecida con sustancias nutritivas en forma de abono de liberación lenta, distribuyéndolas en packs A-60 con celdas cuadradas de 4 cm de lado. Las plantas, sometidas a tratamientos alternos con Captan y Benlate a las dosis recomendadas para evitar las contaminaciones fúngicas, se colocaron en invernadero bajo túnel de plástico con riego por aspersión frecuente para garantizar una humedad relativa elevada alrededor de la planta.

En este invernadero también se controló la temperatura, que fue cercana a la que recibieron las plantas durante su desarrollo, y próxima, a su vez, a aquella bajo la que crecieron posteriormente.

Después de superada la fase de aclimatación, las plantas se trasladaron a otras bancadas de cultivo en las que se eliminó el túnel de plástico, para que continuaran su crecimiento en condiciones estándar. El tipo de invernadero, la calefacción, el rango de temperaturas, la luminosidad, la humedad relativa, el sustrato utilizado, el tipo de maceta o contenedor, el abonado, el riego y su frecuencia y los tratamientos fitosanitarios fueron en estas primeras etapas similares a los descritos para las otras plantas en los apartados correspondientes.

Las plantas se cultivaron en packs de A-60 hasta que se agotó el sustrato y posteriormente se transplantaron a macetas de 9, 11 y 14 cm de diámetro.

Cuando hubo suficiente material vegetal se dispusieron las plantas en pequeños grupos en diferentes invernaderos: N° 1, N° 3, N° 4 y N° 10. La diferencia básica entre los invernaderos es que las plantas estaban sometidas a diferentes intensidades luminosas en su interior, al ser unos más umbríos que otros. Se realizaron medidas de las intensidades luminosas en cada invernadero dos veces al día, a diferente hora, para conocer la luminosidad a la que estaban sometidas las plantas. Por lo demás, todas ellas se cultivaron siguiendo el mismo método, independientemente del invernadero en que estaban situadas.

### **Caracterización fenotípica de los nuevos variantes somaclonales**

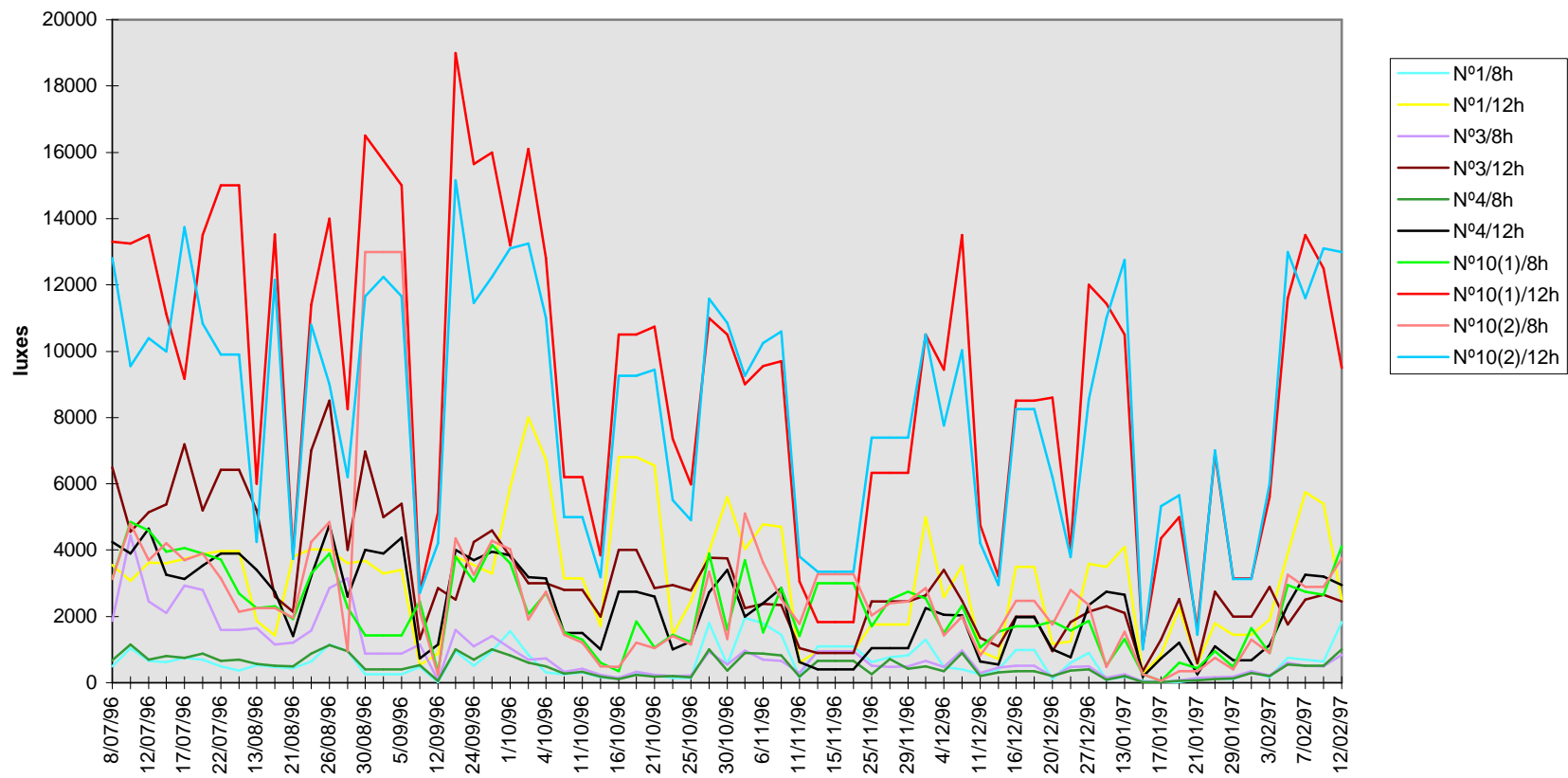
Se estudiaron las características morfológicas del *Ficus benjamina* “Mallorca” y se compararon con las del parental *Ficus benjamina* “Exotica” así como con las de algunos cultivares de hoja variegada de gran importancia económica en el sector de las plantas ornamentales de interior como son el “Star light”, el “Golden princess” y el “Reginald”. Las características estudiadas fueron: longitud y anchura de la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª hoja desarrollada, altura total de la planta, número de entrenudos, longitud internodal, número de ramales, número de hojas y peso de la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª hoja desarrollada. Las medidas se realizaron en plantas de tres edades. La primera se realizó a los 3.5 meses de cultivo después de la fase de aclimatación *in vivo*. Las plantas estaban cultivadas en packs de A-60, completamente enraizadas y dispuestas para ser transplantadas a maceta de tamaño inmediatamente superior. La segunda medida se realizó cuando las plantas tenían 1 año de edad y estaban en macetadas en contenedor de 9 cm de diámetro. La tercera y última se realizó cuando las plantas tenían 2 años de edad y estaban en maceta de 14 cm de diámetro. Las medidas se hicieron en plantas cultivadas bajo las mismas condiciones de luz, es decir en el mismo invernadero, y sometidas al mismo tipo de riegos, fertilización, tratamiento fitosanitario, sustrato, etc.

A lo largo del cultivo de las plantas del *Ficus benjamina* “Mallorca” se observó cómo variaba el área de jaspeado en las hojas y el color verde de las mismas según la época del año en la que nos encontrábamos, es decir, según la intensidad luminosa que recibían las plantas y, también, en función del número de horas de sol de la estación del año correspondiente. Además, con el fin de estudiar la posible relación entre la intensidad luminosa a la que están sometidas las plantas, las características morfológicas de las mismas y el contenido en clorofilas (totales, a y b) en las hojas, se cultivaron grupos de plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” en dos invernaderos con distintas condiciones luminosas. El primero (Nº10) es un invernadero que no se sombrea en las épocas de alta insolación, mientras que el segundo (Nº4), posee malla de sombreo en primavera y verano e incluso en otras épocas del año y, al mismo tiempo, se pinta la superficie de plástico del techo con pintura blanca, lo que hace que la intensidad de luz que reciben las plantas sea menor, sobre todo en las épocas de alta insolación. A lo largo de todo el experimento se tomaron medidas diarias de la intensidad luminosa al nivel de las plantas en ambos invernaderos. Inicialmente se cultivaron todas las plantas en el invernadero 10 y a los 3,5 meses se midió la longitud y anchura de las cuatro primeras hojas desarrolladas, la altura de la planta, el número de entrenudos, el número de ramales, el número

de hojas y el peso de las cuatro primeras hojas desarrolladas. Posteriormente, las plantas se dividieron en dos grupos: el primer grupo se pasó al invernadero N°4 y el otro se mantuvo en el mismo invernadero N°10. A los 13,5 meses y a los 17,5 meses se volvieron a medir las características morfológicas de las plantas y se compararon los resultados.

Debido a las grandes diferencias en las características morfológicas de las plantas en el experimento anterior, se intentó profundizar un poco más en el estudio de la influencia de las condiciones de cultivo. Para ello, partiendo de plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” que provenían del mismo lote, se hicieron cuatro grupos y se cultivaron en otros tantos invernaderos: El N°1 es un invernadero muy umbrío dedicado básicamente a la propagación de plantas por esquejes; los invernaderos N°3 y N°4 son muy similares en cuanto a condiciones de luminosidad ya que en ambos se pone malla de sombreo durante los periodos más luminosos y se pinta el techo con pintura blanca; el invernadero N°10 es muy luminoso y se dedica a producir plantas de *Ficus* de todas las especies, tamaños y formatos. Las plantas tenían 1 año y medio de edad y se cultivaron durante unos cuatro meses más. Al final del experimento se anotaron las características de las plantas cultivadas en estos cuatro invernaderos.

**Figura1.- Intensidad luminosa a lo largo del tiempo en los diferentes invernaderos**



Se realizaron extracciones de clorofila, siguiendo el método descrito anteriormente, en hojas de plantas del *Ficus benjamina* “Mallorca” y su contenido en clorofila se comparó con el de las hojas del parental “Exotica” y de las variedades “Star light”, “Golden princess” y “Reginald”. En experimentos posteriores se realizaron extracciones de clorofilas en diferentes fechas del año en las hojas más desarrolladas (primera o segunda) de las plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” situadas en distintos invernaderos y sometidas, por tanto, a distintas intensidades luminosas. Los resultados se compararon con los del *Descriptor* obtenido al analizar una gama de hojas tipo que calificábamos del 1 al 5, siendo 1 la hoja con menos contenido en clorofila, es decir, la hoja con menos zonas de color verde y 5 la hoja con mayor contenido en clorofila, es decir, la hoja con mayor área de color verde.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Obtención del variante “Mallorca”**

En una línea celular organogénica de *Ficus benjamina* “Exotica”, iniciada en el año 1991 y mantenida por subcultivos repetidos cada 5 semanas durante casi dos años y medio, apareció una plántula con hojas claramente variegadas. Tras su separación de las restantes plantas (verdes) del mismo callo, la plántula variegada se multiplicó clonalmente. Cuando se obtuvo un número suficiente de réplicas clonales se estudiaron las características fenotípicas de las plantas en distintos periodos de crecimiento así como la estabilidad del nuevo carácter a lo largo del tiempo. El hecho de que el fenotipo variegado se haya mantenido estable a lo largo de las sucesivas rondas de propagación indica que el nuevo carácter no se debe a un cambio epigenético inducido por el medio o por cualquier factor externo sino que, en lugar de ello, la causa más probable es una mutación acontecida a lo largo del cultivo *in vitro*. A este nuevo cultivar, aparecido espontáneamente en cultivo *in vitro* sin la adición de mutágenos, se le dió la denominación de *Ficus benjamina* “Mallorca”.

El nuevo cultivar se caracteriza principalmente por la exclusiva y distinta variegación de sus hojas que lo hace diferente de otros cultivares variegados. En el cultivar “Mallorca” las hojas muestran una variegación con sectores verde y blanco-amarillentos, distribuidos irregularmente en toda la superficie de la hoja formando un dibujo de tipo jaspeado.

Es importante destacar que el transplante a suelo del mutante variegado y su posterior aclimatación en invernadero no ha supuesto ningún problema. En el primer experimento de transplante, siguiendo procedimientos similares a los empleados con plantas salvajes de *Ficus benjamina*, se obtuvieron 220 plantas variegadas del "Mallorca", que crecían normalmente en el invernadero, de un total de 225 (97,8%). Los experimentos posteriores ofrecieron resultados similares, indicando que se puede lograr la aclimatación en el 90-100% de las plantas transplantadas. Así, el 08.03.95 se aclimataron con éxito 1260 plantas de un lote de 1280 (98,4%), el 20.07.95 se aclimataron 1590 plantas de un lote de 1596 (99,62%), el 05.10.95 se aclimataron 875 plantas de un total de 883 (99,09%) y el 13.01.96 se aclimataron con éxito 4565 plantas de un total de 4566 (≈100%). En el conjunto de 12 ensayos independientes, realizados a lo largo de diferentes épocas del año, se aclimataron un total de 24.312 plantas de 26.808 plantas enraizadas *in vitro* (90,45%).

### **Características vegetativas del variante "Mallorca" en comparación con las del parental "Exótica" y las de los otros cultivares variegados de *Ficus benjamina***

En la tabla 2 se muestran las características morfológicas de las plantas del nuevo mutante "Mallorca" frente a las del parental "Exótica" y otros cultivares de hojas variegadas ("Star light", "Golden princess" y "Reginald") a los 3,5 meses de edad después de la fase de aclimatación a condiciones *in vivo*.

Se observa que el tamaño (longitud y anchura) de las cuatro primeras hojas desarrolladas, contando a partir del ápice caulinar, es menor en el "Mallorca" que en el parental "Exótica". En los dos genotipos, los valores más altos para ambas características (longitud y anchura) son los correspondientes a la tercera hoja que, en el momento en que se efectuó la medición, es la más desarrollada. En el "Mallorca" la longitud y la altura de la 3ª hoja son  $4,50 \pm 0,06$  cm y  $1,86 \pm 0,02$  cm respectivamente mientras que en el "Exótica" los valores correspondientes son  $5,37 \pm 0,09$  cm y  $2,13 \pm 0,06$  cm respectivamente. Los pesos de las cuatro primeras hojas desarrolladas son mayores en las plantas del parental salvaje que en las del nuevo variante "Mallorca", lo cual es lógico teniendo en cuenta sus tamaños respectivos. Por otro lado, las longitudes de las hojas del "Mallorca" son similares a las de los cultivares variegados "Star light" y "Reginald". Las hojas de menor longitud son las del cultivar "Golden princess". En lo que respecta a la anchura de las hojas, todos los cultivares variegados dan valores similares.



**Tabla 2.-** Características morfológicas de las plantas del *Ficus benjamina* “Mallorca”, del parental “Exotica” y de los cultivares de hoja variegada “Star light”, “Golden princess” y “Reginald” a los 3- 4 meses de cultivo.

	<i>Exotica</i>	<i>Mallorca</i>	<i>Star light</i>	<i>Golden princess</i>	<i>Reginald</i>
Longitud de la 1ª hoja (cm)	4.26 $\pm$ 0.10	3.60 $\pm$ 0.07	4.19 $\pm$ 1.17	2.92 $\pm$ 0.07	3.22 $\pm$ 0.12
Longitud de la 2ª hoja (cm)	5.28 $\pm$ 0.08	4.20 $\pm$ 0.06	4.63 $\pm$ 1.07	3.53 $\pm$ 0.07	4.38 $\pm$ 0.13
Longitud de la 3ª hoja (cm)	5.37 $\pm$ 0.09	4.50 $\pm$ 0.06	4.31 $\pm$ 1.37	3.75 $\pm$ 0.12	4.10 $\pm$ 0.14
Longitud de la 4ª hoja (cm)	4.68 $\pm$ 0.09	3.62 $\pm$ 0.09	3.86 $\pm$ 1.52	2.29 $\pm$ 0.12	3.40 $\pm$ 0.15
Anchura de la 1ª hoja (cm)	1.42 $\pm$ 0.05	1.37 $\pm$ 0.03	1.32 $\pm$ 0.36	1.11 $\pm$ 0.04	1.17 $\pm$ 0.05
Anchura de la 2ª hoja (cm)	1.90 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.02	1.54 $\pm$ 0.28	1.85 $\pm$ 0.02	1.74 $\pm$ 0.04
Anchura de la 3ª hoja (cm)	2.13 $\pm$ 0.06	1.86 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.44	1.69 $\pm$ 0.04	1.55 $\pm$ 0.04
Anchura de la 4ª hoja (cm)	2.05 $\pm$ 0.07	1.84 $\pm$ 0.03	1.40 $\pm$ 0.45	1.07 $\pm$ 0.05	1.74 $\pm$ 0.04
Peso de la 1ª hoja (mg)	57.35 $\pm$ 3.36	44.42 $\pm$ 1.63	55.28 $\pm$ 3.64	29.96 $\pm$ 1.34	32.15 $\pm$ 2.60
Peso de la 2ª hoja (mg)	90.96 $\pm$ 2.95	65.84 $\pm$ 1.61	67.99 $\pm$ 3.37	45.38 $\pm$ 1.64	73.25 $\pm$ 4.35
Peso de la 3ª hoja (mg)	100.51 $\pm$ 3.27	82.48 $\pm$ 1.81	60.42 $\pm$ 4.01	54.58 $\pm$ 2.56	73.71 $\pm$ 4.59
Peso de la 4ª hoja (mg)	81.01 $\pm$ 3.15	55.6 $\pm$ 2.36	49.67 $\pm$ 3.41	24.17 $\pm$ 2.69	56.54 $\pm$ 4.14
Número de hojas	8.86 $\pm$ 0.22	12.20 $\pm$ 0.37	8.74 $\pm$ 0.22	8.26 $\pm$ 0.21	11.04 $\pm$ 0.33
Altura de la planta (cm)	14.53 $\pm$ 0.27	9.72 $\pm$ 0.18	10.74 $\pm$ 1.89	8.03 $\pm$ 0.15	9.29 $\pm$ 0.23
Número de entrenudos	8.10 $\pm$ 0.10	8.98 $\pm$ 0.16	10.10 $\pm$ 1.36	7.40 $\pm$ 0.11	9.54 $\pm$ 0.16
Longitud de entrenudos (cm)	1.80 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.02	1.02 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.02
Número de ramales	0.54 $\pm$ 0.11	1.80 $\pm$ 0.15	0.30 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.13

Es en la altura de la planta donde se empiezan a notar diferencias significativas. A los 3-4 meses de cultivo, las plantas del parental *Ficus benjamina* “Exotica” alcanzaron una altura de 14,53 $\pm$ 0,27 cm mientras que las del “Mallorca” sólo llegaban a una altura de 9,72 $\pm$ 0,18 cm. La altura de las plantas de los cultivares “Star light” y “Reginald” era parecida a la del “Mallorca” mientras que la del “Golden princess” era ligeramente inferior.

El número de entrenudos estaba dentro del mismo orden en los cinco cultivares. Oscilaba entre 7,40 $\pm$ 0,11 en el “Golden princess” y 10,10 $\pm$ 1,89 en el “Star light”, siendo el

número de entrenudos en las plantas del "Mallorca" de  $8,98 \pm 0,16$ . La longitud de los entrenudos era, sin embargo, mayor en las plantas del *Ficus benjamina* "Exotica" que en las de los mutantes de hojas variegadas.

Se observaron diferencias importantes en el número de ramales y en el número total de hojas de las plantas del "Mallorca" con respecto a los del parental *Ficus benjamina* "Exotica" y los otros cultivares de hoja variegada. El número de ramales en el nuevo variante "Mallorca" fue de  $1,80 \pm 0,15$ , seguido por los  $0,86 \pm 0,13$  del "Reginald",  $0,54 \pm 0,11$  del parental "Exotica" y, por último,  $0,30 \pm 0,07$  y  $0,32 \pm 0,09$  ramales en el "Star light" y "Golden princess" respectivamente.

Había diferencias considerables en el número total de hojas: las plantas del "Mallorca" y "Reginald" tenían un mayor número de hojas ( $12,20 \pm 0,37$  y  $11,04 \pm 0,33$ , respectivamente) que las de los cultivares "Exotica", "Star light" y "Golden princess" (que tenían alrededor de 8 hojas cada uno).

Conviene resaltar que la combinación de menor altura, mayor número de ramales y mayor número de hojas hacen del *Ficus benjamina* "Mallorca" una planta de aspecto más compacto que su parental "Exotica". Además posee un tipo de variegación muy diferente al de los restantes cultivares de hojas variegadas.

A los 12 meses de cultivo, se volvieron a medir las características vegetativas de las plantas de los cinco cultivares de *Ficus benjamina* (tabla 3).

Los valores relativos al tamaño de las hojas del cv. "Mallorca" (longitud y anchura de la hoja) fueron ligeramente inferiores a los del cv. "Exotica", mientras que los de éste fueron del mismo orden que los correspondientes al cv. "Reginald" y las hojas de los cultivares "Star light" y "Golden princess" fueron las más pequeñas.

El peso de las hojas guarda relación con los tamaños respectivos en los cuatro cultivares. La altura de las plantas del *Ficus benjamina* "Exotica" ( $24,60 \pm 0,30$  cm) era mayor que la de los cultivares variegados pero, durante este periodo, las plantas del variante "Mallorca" habían experimentado un gran crecimiento, alcanzando una altura de  $20,31 \pm 0,50$  cm, apenas 4 cm menos que en el parental. Esta altura fue muy parecida a la de las plantas del cv. "Reginald". Los cultivares de hoja menos verde tenían menos vigor y una altura claramente

inferior. Así las plantas del “Golden princess” y “Star light” sólo alcanzaron alturas de 15,27 $\pm$ 0,26 cm y 9,89 $\pm$ 0,32 cm respectivamente.

**Tabla 3.-** Características morfológicas de las plantas del *Ficus benjamina* “Mallorca”, del parental “Exotica” y de los cultivares de hoja variegada “Star light”, “Golden princess” y “Reginald” a los 12 meses de cultivo.

	<i>Exotica</i>	<i>Mallorca</i>	<i>Star light</i>	<i>Golden princess</i>	<i>Reginald</i>
Longitud de la 1ª hoja (cm)	5.29 $\pm$ 0.14	5.01 $\pm$ 0.99	3.97 $\pm$ 0.07	3.72 $\pm$ 0.07	5.48 $\pm$ 0.12
Longitud de la 2ª hoja (cm)	6.13 $\pm$ 0.14	5.82 $\pm$ 1.00	4.90 $\pm$ 1.15	3.25 $\pm$ 0.07	6.33 $\pm$ 0.09
Longitud de la 3ª hoja (cm)	6.78 $\pm$ 1.28	5.59 $\pm$ 0.14	4.68 $\pm$ 1.46	4.52 $\pm$ 0.06	6.46 $\pm$ 0.11
Longitud de la 4ª hoja (cm)	6.56 $\pm$ 1.69	5.01 $\pm$ 0.14	4.33 $\pm$ 1.99	4.69 $\pm$ 0.10	6.23 $\pm$ 0.16
Anchura de la 1ª hoja (cm)	1.69 $\pm$ 0.05	1.58 $\pm$ 0.33	1.30 $\pm$ 0.46	1.62 $\pm$ 0.16	1.83 $\pm$ 0.05
Anchura de la 2ª hoja (cm)	2.11 $\pm$ 0.04	1.95 $\pm$ 0.28	1.63 $\pm$ 0.33	1.74 $\pm$ 0.03	2.23 $\pm$ 0.03
Anchura de la 3ª hoja (cm)	2.15 $\pm$ 0.04	2.05 $\pm$ 0.33	1.65 $\pm$ 0.39	1.86 $\pm$ 0.03	2.40 $\pm$ 0.04
Anchura de la 4ª hoja (cm)	2.21 $\pm$ 0.04	2.02 $\pm$ 0.42	1.53 $\pm$ 0.62	2.07 $\pm$ 0.03	2.42 $\pm$ 0.06
Peso de la 1ª hoja (mg)	80.71 $\pm$ 4.22	79.87 $\pm$ 3.40	54.41 $\pm$ 3.59	59.03 $\pm$ 2.55	97.73 $\pm$ 4.60
Peso de la 2ª hoja (mg)	115.19 $\pm$ 5.91	112.77 $\pm$ 4.22	82.23 $\pm$ 4.22	81.18 $\pm$ 2.77	139.35 $\pm$ 4.15
Peso de la 3ª hoja (mg)	143.24 $\pm$ 5.64	102.67 $\pm$ 5.04	79.38 $\pm$ 4.70	93.83 $\pm$ 2.82	156.95 $\pm$ 5.02
Peso de la 4ª hoja (mg)	142.06 $\pm$ 6.84	106.37 $\pm$ 4.58	71.63 $\pm$ 5.96	106.15 $\pm$ 3.57	156.04 $\pm$ 7.07
Número de hojas	11.10 $\pm$ 0.45	13.72 $\pm$ 0.50	8.85 $\pm$ 0.23	11.78 $\pm$ 0.51	13.70 $\pm$ 0.52
Altura de la planta (cm)	24.60 $\pm$ 0.43	20.31 $\pm$ 0.50	9.89 $\pm$ 0.32	15.27 $\pm$ 0.26	20.49 $\pm$ 0.41
Número de entrenudos	10.71 $\pm$ 0.14	14.62 $\pm$ 0.22	8.26 $\pm$ 0.19	9.38 $\pm$ 0.18	12.66 $\pm$ 0.25
Longitud de entrenudos (cm)	2.32 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.03	1.20 $\pm$ 0.03	1.64 $\pm$ 0.03	1.66 $\pm$ 0.03
Número de ramales	2.00 $\pm$ 0.24	2.24 $\pm$ 0.23	0.17 $\pm$ 0.06	2.54 $\pm$ 0.23	2.26 $\pm$ 0.25

El número de entrenudos fue mayor en las plantas del *Ficus benjamina* “Mallorca” (14,62 $\pm$ 0,22) que en los otros cultivares. La longitud de los entrenudos era similar (alrededor de 1,65 cm) en los cultivares “Mallorca”, “Golden princess” y “Reginald”. El parental “Exotica” tenía la mayor longitud de entrenudos (2,32 $\pm$ 0,03 cm) y el cv. “Star light” (1,20 $\pm$ 0,2cm) la menor.

El número de ramales fue similar en todas las variedades con excepción del “Star light”, en el que la mayoría de las plantas no desarrollaron ningún ramal. Los otros cultivares desarrollaron entre 2 y 3 ramales.

El número de hojas totales en plantas de 1 año aumentó ligeramente con respecto a las plantas de 3-4 meses de edad. Hay que tener en cuenta que no se contabilizaron las hojas que sufrieron abscisión durante este periodo de crecimiento. Las plantas del *Ficus benjamina* “Mallorca” y las del cv. “Reginald” tenían un número total de hojas mayor que los otros cultivares ( $13,72 \pm 0,50$  y  $13,70 \pm 0,50$  respectivamente).

En la tabla 4 se muestran las características vegetativas de plantas de *Ficus benjamina* “Exotica”, “Mallorca”, “Star light”, “Golden princess” y “Reginald” de dos años de edad. Las plantas se cultivaron en macetas de 14 cm de diámetro.

Las hojas de mayor tamaño son las del cv. “Exotica” de *Ficus benjamina*. El tamaño de las cuatro primeras hojas desarrolladas es bastante parecido entre sí, siendo mayor la segunda hoja desarrollada que tiene una longitud de  $8,40 \pm 0,20$  cm y una anchura de  $3,12 \pm 0,10$  cm. Los valores correspondientes del tamaño de hoja son casi iguales para el resto de los cultivares. La longitud de la hoja más grande del cv. “Mallorca” (3ª hoja desarrollada) fue de  $6,78 \pm 4,03$  cm y la anchura de  $2,36 \pm 1,14$  cm.

El peso de las hojas del *Ficus benjamina* “Exotica” osciló entre los  $338,95 \pm 30,99$  mg de la cuarta hoja desarrollada y los  $263,34 \pm 26,45$  mg de la primera hoja desarrollada, valores muy superiores a los del cv. “Mallorca”. Aunque el tamaño de las hojas del cv. “Mallorca” es similar al de los otros cultivares de hoja variegada, el peso es significativamente menor, a causa probablemente de que sus hojas son más finas y no tienen un espesor tan grande como el de las hojas de los otros cultivares variegados.

En las plantas de 2 años la diferencia entre las alturas de las plantas del parental *Ficus benjamina* “Exotica” con respecto a las del nuevo variante “Mallorca” aumentaron significativamente ( $53,13 \pm 1,44$  cm y  $33,80 \pm 0,99$  cm). Las plantas de menor altura fueron las del cultivar “Star light” ( $31,60 \pm 1,14$  cm). Las variedades “Golden princess” y “Reginald” se desarrollaron más, aunque no en la medida en que lo hicieron las del *Ficus benjamina* “Exotica” ( $41,91 \pm 1,35$  cm y  $39,44 \pm 1,20$  cm respectivamente).

**Tabla 4.-** Características morfológicas de las plantas del *Ficus benjamina* "Mallorca", del parental "Exotica" y de los cultivares de hoja variegada "Star light", "Golden princess" y "Reginald" a los 24 meses de cultivo.

	<i>Exotica</i>	<i>Mallorca</i>	<i>Star light</i>	<i>Golden princess</i>	<i>Reginald</i>
<i>Longitud de la 1ª hoja (cm)</i>	7.54 $\pm$ 0.36	6.30 $\pm$ 3.73	6.61 $\pm$ 4.04	6.22 $\pm$ 0.23	6.45 $\pm$ 0.23
<i>Longitud de la 2ª hoja (cm)</i>	8.40 $\pm$ 0.20	6.53 $\pm$ 3.22	6.87 $\pm$ 3.45	6.75 $\pm$ 0.33	6.60 $\pm$ 0.31
<i>Longitud de la 3ª hoja (cm)</i>	8.02 $\pm$ 0.21	6.78 $\pm$ 4.03	6.62 $\pm$ 3.27	7.03 $\pm$ 0.34	7.13 $\pm$ 0.26
<i>Longitud de la 4ª hoja (cm)</i>	8.15 $\pm$ 0.28	5.94 $\pm$ 3.97	7.12 $\pm$ 2.44	6.94 $\pm$ 0.29	6.65 $\pm$ 0.23
<i>Anchura de la 1ª hoja (cm)</i>	2.91 $\pm$ 0.13	2.13 $\pm$ 1.28	2.38 $\pm$ 1.67	3.10 $\pm$ 0.18	2.47 $\pm$ 0.12
<i>Anchura de la 2ª hoja (cm)</i>	3.12 $\pm$ 0.10	2.29 $\pm$ 0.92	2.59 $\pm$ 0.76	3.21 $\pm$ 0.20	2.65 $\pm$ 0.13
<i>Anchura de la 3ª hoja (cm)</i>	3.13 $\pm$ 0.06	2.36 $\pm$ 1.14	2.56 $\pm$ 1.27	3.31 $\pm$ 0.17	2.90 $\pm$ 0.18
<i>Anchura de la 4ª hoja (cm)</i>	3.27 $\pm$ 0.13	2.18 $\pm$ 1.45	2.71 $\pm$ 0.99	3.25 $\pm$ 0.15	2.61 $\pm$ 0.11
<i>Peso de la 1ª hoja (mg)</i>	263.34 $\pm$ 26.45	141.60 $\pm$ 15.17	192.40 $\pm$ 25.39	241.82 $\pm$ 23.75	215.83 $\pm$ 20.34
<i>Peso de la 2ª hoja (mg)</i>	327.70 $\pm$ 21.25	157.70 $\pm$ 11.50	232.00 $\pm$ 18.97	299.43 $\pm$ 32.33	255.25 $\pm$ 22.15
<i>Peso de la 3ª hoja (mg)</i>	306.36 $\pm$ 24.32	172.10 $\pm$ 15.95	205.60 $\pm$ 16.68	329.06 $\pm$ 35.77	285.46 $\pm$ 31.75
<i>Peso de la 4ª hoja (mg)</i>	338.95 $\pm$ 30.99	135.90 $\pm$ 15.69	250.00 $\pm$ 21.38	322.48 $\pm$ 30.09	214.85 $\pm$ 15.90
<i>Número de hojas</i>	41.40 $\pm$ 2.50	46.30 $\pm$ 4.14	46.6 $\pm$ 7.15	39.80 $\pm$ 1.96	41.90 $\pm$ 4.42
<i>Altura de la planta (cm)</i>	53.13 $\pm$ 1.44	33.80 $\pm$ 0.99	31.60 $\pm$ 1.14	41.91 $\pm$ 1.35	39.44 $\pm$ 1.20
<i>Número de entrenudos</i>	21.10 $\pm$ 0.57	15.50 $\pm$ 0.73	21.40 $\pm$ 0.70	24.70 $\pm$ 0.71	25.40 $\pm$ 0.78
<i>Longitud de entrenudos (cm)</i>	2.53 $\pm$ 0.08	2.22 $\pm$ 0.11	1.48 $\pm$ 0.06	1.71 $\pm$ 0.06	1.56 $\pm$ 0.04
<i>Número de ramales</i>	7.50 $\pm$ 0.43	12.50 $\pm$ 1.06	9.20 $\pm$ 1.48	13.20 $\pm$ 0.56	12.70 $\pm$ 1.23

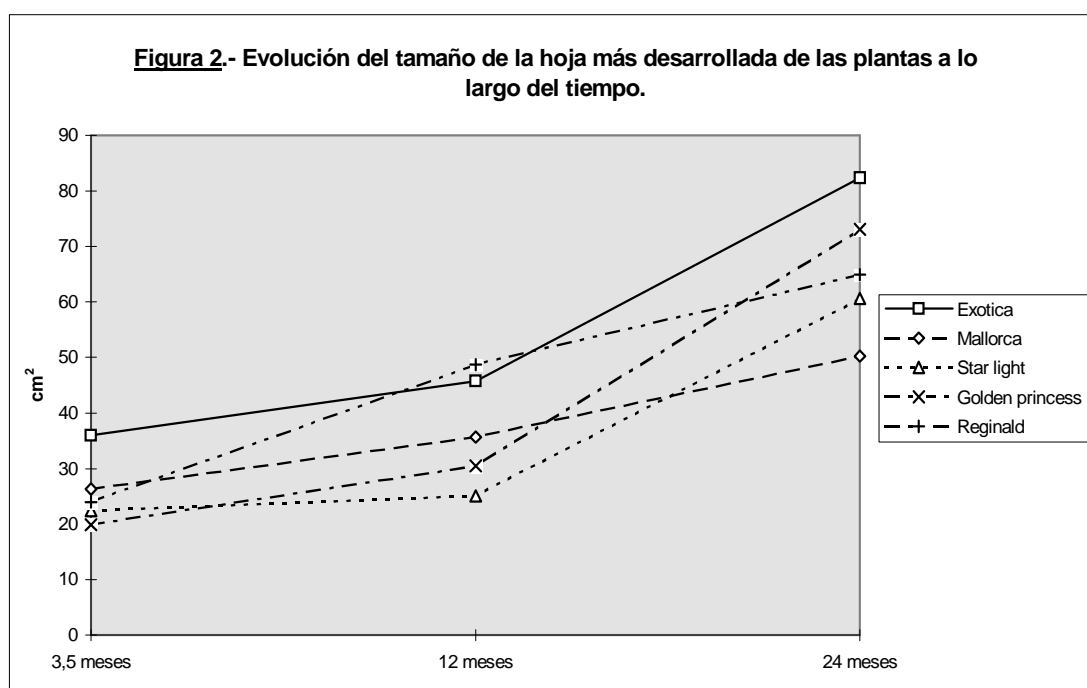
El número de entrenudos en las plantas de los cultivares "Exotica", "Star light", "Golden princess" y "Reginald" fue del mismo orden (21,10 $\pm$ 0,57; 21,40 $\pm$ 0,70; 24,70 $\pm$ 0,71 y 25,40 $\pm$ 0,78 respectivamente) y mayor en todos los casos que en el "Mallorca" (15,50 $\pm$ 0,73). Los entrenudos de mayor tamaño eran los del "Exotica" y "Mallorca" (2,53 $\pm$ 0,08 cm y 2,22 $\pm$ 0,11 cm respectivamente).

El número de ramales fue casi idéntico en los cultivares "Mallorca", "Golden princess" y "Reginald" (alrededor de 12). Esta característica vegetativa influye mucho a la hora de proporcionar compacidad a la planta. En comparación, el parental salvaje ("Exotica") y el

cultivar "Star light" tenían un menor número de ramales ( $7,50 \pm 1,06$  y  $9,20 \pm 1,48$  respectivamente).

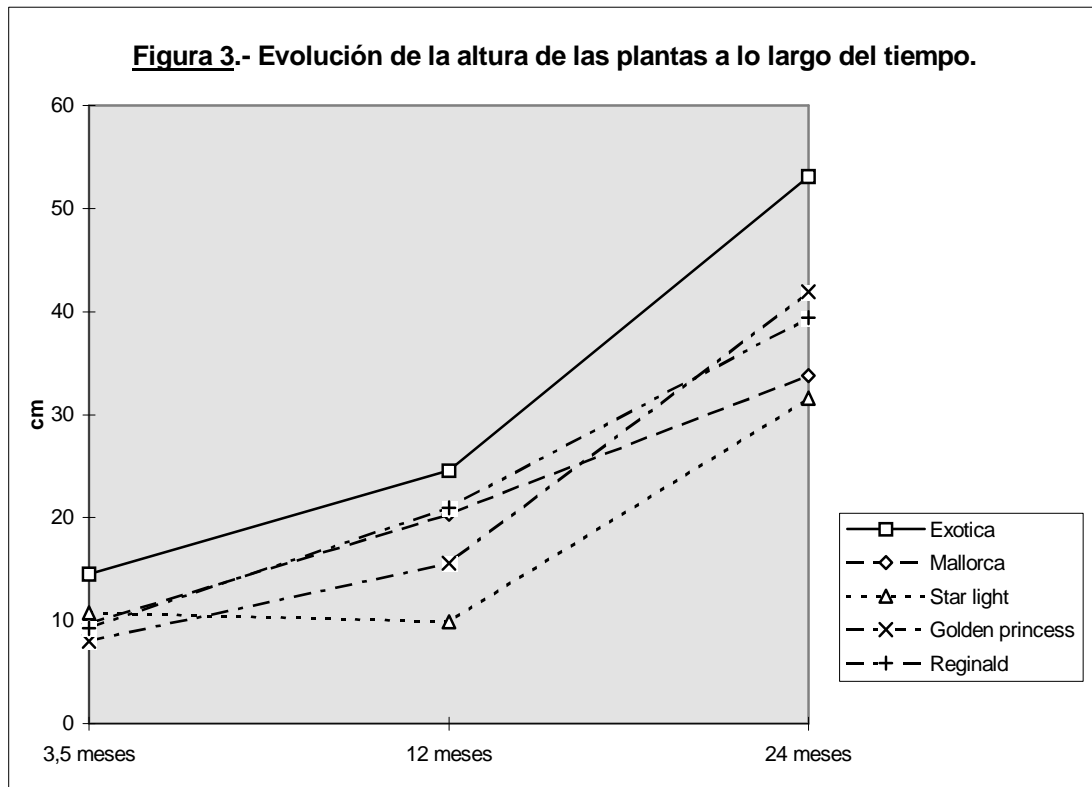
Otro factor que puede afectar mucho a la compacidad de las plantas es el número de hojas. Se observó que en el nuevo cultivar "Mallorca" el número de hojas era muy elevado ( $46,30 \pm 0,43$ ) aunque no se apreciaron diferencias significativas con el resto de los cultivares.

En la figura 2 se muestra la variación del tamaño de la hoja más desarrollada de los cultivares "Exotica", "Mallorca", "Star light", "Golden princess" y "Reginald" a los 3,5, 12 y 24 meses de cultivo. El tamaño se estima considerando la hoja como una elipse cuya área viene determinada por el producto entre la longitud, la anchura y el número pi.

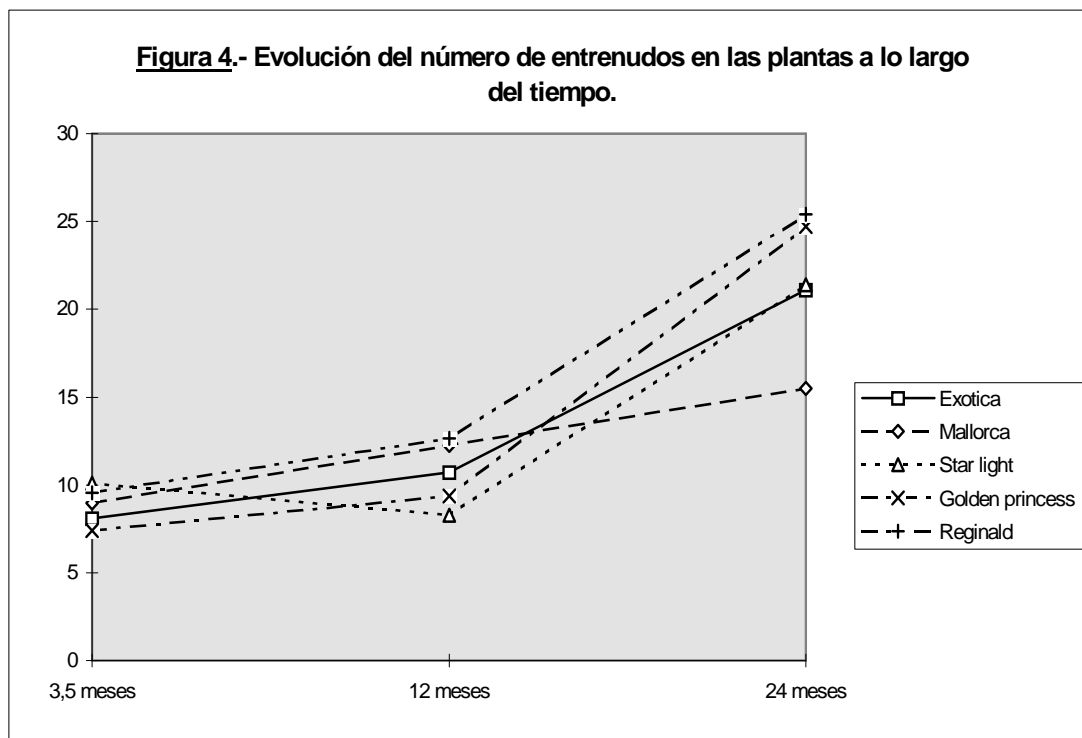


El tamaño de las hojas más desarrolladas del parental "Exotica" se mantiene casi siempre por encima del de los otros cultivares, alcanzando un valor máximo a los 2 años de cultivo ( $82,33 \text{ cm}^2$ ). Las hojas más desarrolladas del nuevo cultivar "Mallorca" son ligeramente menores a las hojas del resto de cultivares a los 2 años de cultivo ( $50,27 \text{ cm}^2$ ). El tamaño de la hoja más desarrollada aumenta con el tiempo en todos los cultivares.

Las plantas del *Ficus benjamina* “Exotica” fueron más altas que las plantas de los otros cultivares (figura 3). Las plantas menos desarrolladas eran las del “Star light” que sólo alcanzaron los 31,60 cm de altura después de dos años de cultivo.

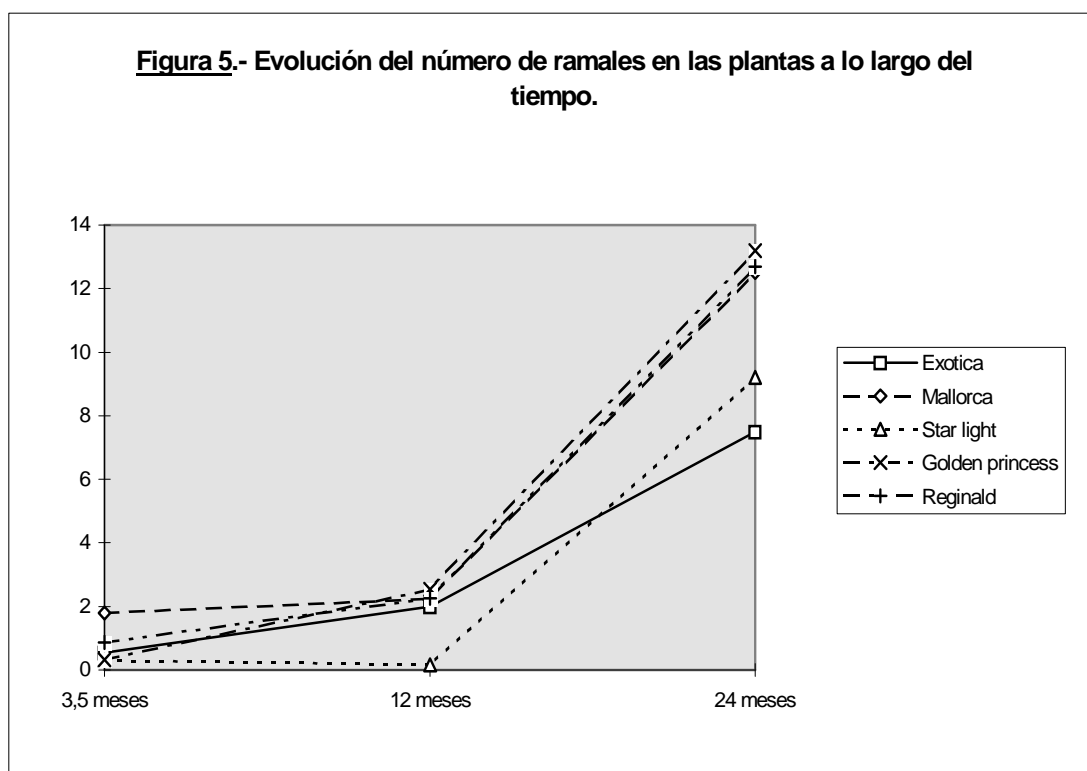


En la figura 4, se representa la evolución del número de entrenudos en las plantas de los cinco cultivares. El número de entrenudos aumentó con el tiempo en todos los casos. Sin embargo, el aumento es más gradual y menos relevante en las plantas del “Mallorca”. A los dos años, las plantas del *Ficus benjamina* “Mallorca” tenían un menor número de entrenudos que las de los cultivares “Exotica”, “Star light”, “Golden princess” y “Reginald”.



El número de ramales que tienen las plantas del nuevo variante somaclonal "Mallorca" (figura 5) es, en comparación con el parental "Exotica", bastante mayor. Este mayor número de ramas hace que las plantas del "Mallorca" posean una apariencia más compacta y, al mismo tiempo, más atractiva que las del parental "Exotica". Considerando el grado de compacidad en base a esta característica (número de ramales) las plantas con una apariencia más compacta son las del "Mallorca", "Golden Princess" y "Reginald".

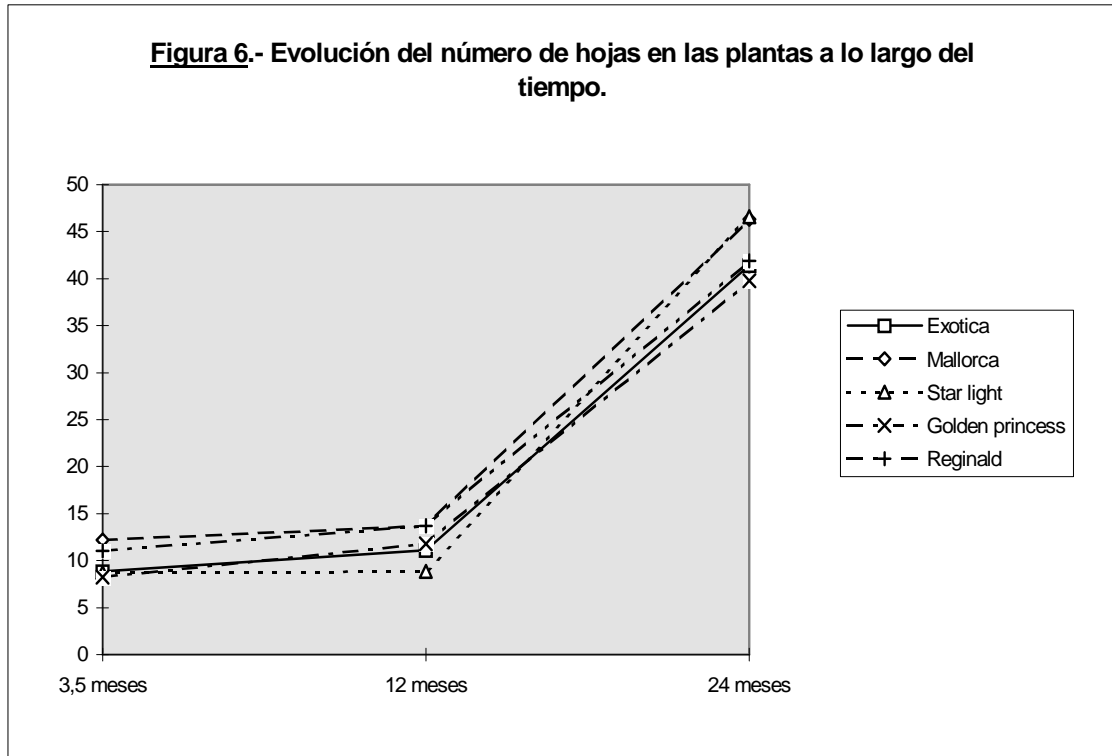




En la figura 6 se representa la evolución del número de hojas en las plantas de los cinco cultivares. El número de hojas creció en el tiempo de forma muy parecida en todos los genotipos.

Lo que nos da una idea de la compacidad de una planta es el conjunto de una serie de características: número de hojas, número de ramales, altura de la planta y tamaño de las hojas. En las plantas de 2 años del nuevo variante “Mallorca”, la altura de la planta es de 33,80 cm, el número de ramales 12,50; el tamaño de la hoja más desarrollada 50,27 cm<sup>2</sup> y el número de hojas totales de 46,30. En comparación, tras el mismo periodo de cultivo, en el *Ficus benjamina* “Exotica” la altura de la planta es 53,13 cm; el número de ramales 7,50; el tamaño de la hoja más desarrollada 82,33 cm<sup>2</sup> y el número de hojas totales 41,40. Al comparar los valores respectivos queda claro el por qué, a simple vista, las plantas del cv. “Mallorca” lucen más compactas y aparentan tener una mayor densidad foliar que las del parental “Exotica”.

**Figura 6.-** Evolución del número de hojas en las plantas a lo largo del tiempo.



### Características vegetativas del variante “Mallorca” en diferentes condiciones ambientales

En la tabla 5 se muestran las características vegetativas de plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” de 3,5 meses, cultivadas en el invernadero número 10. Este lote de plantitas cultivadas en packs de A-60 se enmacetaron en pequeños contenedores de 9 cm de diámetro hasta formar 2 grupos de 10 plantas cada uno que se dispusieron en dos puntos diferentes en los invernaderos 4 y 10.

**Tabla 5.-** Características vegetativas de plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” de 3,5 meses de edad, cultivadas en el invernadero número 10.

<i>Longitud de la 1ª hoja (cm)</i>	3.60±0.07
<i>Longitud de la 2ª hoja (cm)</i>	4.20±0.06
<i>Longitud de la 3ª hoja (cm)</i>	4.50±0.06
<i>Longitud de la 4ª hoja (cm)</i>	3.62±0.09
<i>Anchura de la 1ª hoja (cm)</i>	1.37±0.03
<i>Anchura de la 2ª hoja (cm)</i>	1.67±0.02
<i>Anchura de la 3ª hoja (cm)</i>	1.86±0.02
<i>Anchura de la 4ª hoja (cm)</i>	1.84±0.03
<i>Peso de la 1ª hoja (mg)</i>	44.42±1.63
<i>Peso de la 2ª hoja (mg)</i>	65.84±1.61
<i>Peso de la 3ª hoja (mg)</i>	82.48±1.81
<i>Peso de la 4ª hoja (mg)</i>	55.60±2.36
<i>Número de hojas</i>	12.20±0.37
<i>Altura de la planta (cm)</i>	9.72±0.18
<i>Número de entrenudos</i>	8.98±0.16
<i>Longitud de entrenudos (cm)</i>	1.08±0.02
<i>Número de ramales</i>	1.80±0.15

A los 14 meses de cultivo, se tomaron medidas de las características vegetativas y los resultados se compararon entre sí (tabla 6). Las plantas cultivadas en condiciones más bajas de

iluminación, es decir las plantas cultivadas en el invernadero número 4, eran ligeramente más altas (30,25 $\pm$ 1,24 cm) que las cultivadas en el invernadero número 10 (27,67 $\pm$ 1,21 cm) donde las condiciones de iluminación fueron mayores. La longitud internodal fue también algo mayor en el invernadero 4 (1,39 $\pm$ 0,7) que en el 10 (0,99 $\pm$ 0,55).

**Tabla 6.**- Características vegetativas de plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" a los 14 meses de cultivo en los invernaderos número 4 y número 10 respectivamente.

	INVERNADERO	
	4	10
<i>Longitud de la 1ª hoja (cm)</i>	6.22 $\pm$ 0.25	4.44 $\pm$ 0.19
<i>Longitud de la 2ª hoja (cm)</i>	5.98 $\pm$ 0.27	4.87 $\pm$ 0.31
<i>Longitud de la 3ª hoja (cm)</i>	5.31 $\pm$ 0.30	4.57 $\pm$ 0.22
<i>Longitud de la 4ª hoja (cm)</i>	5.27 $\pm$ 0.21	4.50 $\pm$ 0.16
<i>Anchura de la 1ª hoja (cm)</i>	2.21 $\pm$ 0.10	1.68 $\pm$ 0.10
<i>Anchura de la 2ª hoja (cm)</i>	2.25 $\pm$ 0.11	1.94 $\pm$ 0.11
<i>Anchura de la 3ª hoja (cm)</i>	2.05 $\pm$ 0.09	1.81 $\pm$ 0.10
<i>Anchura de la 4ª hoja (cm)</i>	2.08 $\pm$ 0.08	1.85 $\pm$ 0.07
<i>Peso de la 1ª hoja (mg)</i>	118.89 $\pm$ 10.97	78.39 $\pm$ 6.34
<i>Peso de la 2ª hoja (mg)</i>	120.67 $\pm$ 9.12	103.92 $\pm$ 9.89
<i>Peso de la 3ª hoja (mg)</i>	99.03 $\pm$ 8.58	92.72 $\pm$ 10.26
<i>Peso de la 4ª hoja (mg)</i>	105.29 $\pm$ 9.45	94.28 $\pm$ 6.49
<i>Número de hojas</i>	52.50 $\pm$ 4.76	88.20 $\pm$ 10.10
<i>Altura de la planta (cm)</i>	30.25 $\pm$ 1.24	27.67 $\pm$ 1.21
<i>Número de entrenudos</i>	21.90 $\pm$ 0.81	28.20 $\pm$ 1.11
<i>Longitud de entrenudos (cm)</i>	1.39 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.05
<i>Número de ramales</i>	10.50 $\pm$ 0.62	13.00 $\pm$ 1.01

En cambio, el número de ramales era menor en las plantas cultivadas en el invernadero número 4 (10,50±0,62 cm) que en las cultivadas en el invernadero, más luminoso, número 10 (13,00±1,01 cm).

El número de entrenudos fue también mayor en las plantas cultivadas en el invernadero más luminoso (28,20±0,11) que en las cultivadas en el invernadero con una malla de sombreo (21,90±0,81). El número de hojas desarrolladas era también mucho mayor en las plantas situadas en el invernadero 10 (88,20±10,10) que en las situadas en el invernadero 4 (52,50±4,76). Por contra, el tamaño de la hoja fue mucho mayor en plantas cultivadas en condiciones más umbrías (43,18 cm<sup>2</sup>) que en las que crecieron en condiciones ambientales más luminosas (29,68 cm<sup>2</sup>).

En la tabla 7, se muestran las características morfológicas de las plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" de 18 meses de edad, es decir cuatro meses más tarde. La altura de la planta, la longitud de los entrenudos y el tamaño de las hojas de las plantas cultivados en el invernadero más umbrío, el número 4, fueron mayores (32,43±0,89 cm; 1,39±0,04 cm y 45,74 cm<sup>2</sup>) que los de las plantas del mismo lote cultivadas en el invernadero número 10 (29,29±0,65 cm; 1,13±0,05 cm y 30,17 cm<sup>2</sup>). Sin embargo el número de ramales y el número total de hojas fue mayor en las plantas cultivadas en el invernadero más luminoso (11,38±0,63 y 95,63±1,97) que en el invernadero con malla de sombreo (9,43±0,78 y 70,43±0,78 respectivamente).

**Tabla 7.-** Características vegetativas de plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" de 18 meses de edad cultivadas en invernaderos número 4 y número de 10.

	INVERNADERO	
	4	10
<i>Longitud de la 1ª hoja (cm)</i>	6.08±0.23	4.90±0.21
<i>Longitud de la 2ª hoja (cm)</i>	6.50±0.24	4.54±0.18
<i>Longitud de la 3ª hoja (cm)</i>	6.32±0.17	4.54±0.19
<i>Longitud de la 4ª hoja (cm)</i>	5.72±0.29	3.78±0.16
<i>Anchura de la 1ª hoja (cm)</i>	2.12±0.10	1.96±0.08
<i>Anchura de la 2ª hoja (cm)</i>	2.24±0.08	1.92±0.08
<i>Anchura de la 3ª hoja (cm)</i>	2.24±0.08	1.91±0.08
<i>Anchura de la 4ª hoja (cm)</i>	2.27±0.09	1.68±0.10
<i>Peso de la 1ª hoja (mg)</i>	134.12±11.91	111.88±7.14
<i>Peso de la 2ª hoja (mg)</i>	146,54±10.52	107.66±9.04
<i>Peso de la 3ª hoja (mg)</i>	133.51±9.76	109.43±9.08
<i>Peso de la 4ª hoja (mg)</i>	123.97±11.36	86.00±9.12
<i>Número de hojas</i>	70.43±5.32	95.63±1.97
<i>Altura de la planta (cm)</i>	32.43±0.89	29,29±0,65
<i>Número de entrenudos</i>	23.43±0.75	30,40±0,71
<i>Longitud de entrenudos (cm)</i>	1.39±0.04	0,96±0,05
<i>Número de ramales</i>	9.43±0.78	11.38±0.63

De la observación de estos resultados se deduce que las plantas cultivadas en el invernadero más luminoso tienen un aspecto más compacto que las cultivadas bajo malla de sombreo, ya que en aquellas la altura total de las plantas y la longitud de los entrenudos son menores y, al mismo tiempo, el número total de hojas y el número de ramales son mayores. Estos aspectos cuantitativos se reflejan en la morfología de las plantas haciéndolas más homogéneas y con una densidad foliar más alta. Estas características son muy importantes y, a su vez, muy apreciadas en el sector de las ornamentales porque facilita el cultivo de las plantas y, al mismo tiempo, las hace más atractivas para el potencial comprador.

En la tabla 8, se observa que en los 10 primeros meses de cultivo en ambos invernaderos, se produjo un aumento espectacular en la altura total de la planta, en el número de entrenudos, en el número de ramales, en el número total de hojas y en el peso de la hoja más desarrollada. Sin embargo, durante los 15 meses siguientes de cultivo estos incrementos fueron, en proporción, mucho más pequeños.

**Tabla 8.-** Incrementos en algunas características vegetativas en plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” cultivadas en 2 invernaderos de luminosidad diferentes (número 4 y 10) durante 25 meses.

	Plantas en invernadero n° 10 desde t=0 hasta t=10,5 meses	Plantas en invernadero n° 10 desde t=10,5 meses hasta t=25 meses	Plantas en invernadero n° 10 desde t=0 hasta t=25 meses
Longitud hoja (cm) <sup>(1)</sup>	0.67	0.50	1.17
Anchura de la hoja (cm) <sup>(1)</sup>	0.27	0.28	0.55
Altura de la planta (cm)	17.95	1.62	19.57
Número de entrenudos	19.22	2.20	21.42
Longitud de entrenudos	-0.09	-0.03	-0.12
Número de ramales	11.20	-1.62	9.58
Número de hojas	76	7.43	83.43
Peso de la hoja (mg) <sup>(1)</sup>	38.08	16.71	54.79
	Plantas en invernadero n°4 desde t=0 hasta t=10,5 meses	Plantas en invernadero n° 4 desde t=10,5 meses hasta t=25 meses	Plantas en invernadero n° 4 desde t=0 hasta t=25 meses
Longitud hoja (cm) <sup>(1)</sup>	1.78	1.01	2.79
Anchura de la hoja (cm) <sup>(1)</sup>	0.58	0.19	0.77
Altura de la planta (cm)	20.53	2.18	22.71
Número de entrenudos	12.92	1.53	14.45
Longitud de entrenudos	0.31	0.00	0.31
Número de ramales	8.70	-1.07	7.63
Número de hojas	40.30	17.93	58.23
Peso de la hoja (mg) <sup>(1)</sup>	54.83	25.87	80.10

(1) la hoja más desarrollada

El aumento total de algunas características durante los 25 meses de cultivo osciló según el tipo de invernadero donde se cultivaron las plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca”. Todas las condiciones de cultivo incluidas la fertilización, la frecuencia de riego, el tipo de sustrato y de maceta utilizada y los tratamientos fitosanitarios fueron los mismos para todas las plantas con la excepción de las condiciones luminosas. El invernadero 10, mucho más luminoso, no disponía de la habitual malla de sombreo que se utiliza frecuentemente para sombrear las plantas, mientras que el invernadero número 4 tenía instalada una malla de color negro, que proporcionaba un nivel de sombreo de cerca del 40%.

Se comprobó que la variación en los valores del tamaño de la hoja, la altura total de la planta y la longitud de los entrenudos fue mayor en las plantas cultivadas en el invernadero sombreado. En contraposición, los valores de los incrementos del número de entrenudos, número de ramales y número de hojas fue mayor en las plantas que se desarrollaron en el invernadero más luminoso.

Con el fin de profundizar aún más en el conocimiento de las diferencias que se producen en las características vegetativas de las plantas de *F. benjamina* "Mallorca" en función de las condiciones de iluminación, se tomaron 5 grupos de 12 plantas (cultivadas durante 6 meses en packs de A-60 en el invernadero 3 con una iluminación estándar y se trasladaron a distintos invernaderos con diferentes condiciones de luminosidad. El invernadero con mayor luminosidad era el número 10, seguido por el número 3, el número 4 y el número 1 que era el más sombreado. En el invernadero número 4 había 2 zonas claramente diferenciadas en cuanto a la luminosidad se refiere y, por tanto, se colocaron 2 grupos de plantas, uno en cada una de las zonas que en adelante llamaremos invernadero 4 para referirnos a la parte más luminosa e invernadero 4S para referirnos a la parte más umbría.



En la tabla 9 se muestran las características vegetativas de las plantas de partida, cultivadas durante 14 meses en contenedor de 9 cm de diámetro y situadas en el invernadero número 3. Estas medidas se compararon posteriormente con las anotadas cuatro meses más tarde en las plantas situadas en los otros invernaderos.

**Tabla 9.-** Características vegetativas de plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" de 14 meses de edad cultivadas en el invernadero número 3.

	<b>Invernadero 3</b>
<i>Longitud de la 1ª hoja (cm)</i>	4.89 $\pm$ 0.17
<i>Longitud de la 2ª hoja (cm)</i>	5.17 $\pm$ 0.17
<i>Longitud de la 3ª hoja (cm)</i>	4.80 $\pm$ 0.18
<i>Longitud de la 4ª hoja (cm)</i>	4.57 $\pm$ 0.17
<i>Anchura de la 1ª hoja (cm)</i>	1.77 $\pm$ 0.06
<i>Anchura de la 2ª hoja (cm)</i>	1.97 $\pm$ 0.06
<i>Anchura de la 3ª hoja (cm)</i>	1.85 $\pm$ 0.05
<i>Anchura de la 4ª hoja (cm)</i>	1.85 $\pm$ 0.04
<i>Peso de la 1ª hoja (mg)</i>	80.32 $\pm$ 5.97
<i>Peso de la 2ª hoja (mg)</i>	92.08 $\pm$ 5.25
<i>Peso de la 3ª hoja (mg)</i>	84.84 $\pm$ 5.53
<i>Peso de la 4ª hoja (mg)</i>	84.55 $\pm$ 4.82
<i>Número de hojas</i>	34.90 $\pm$ 1.52
<i>Altura de la planta (cm)</i>	18.43 $\pm$ 0.99
<i>Número de entrenudos</i>	21.00 $\pm$ 0.64
<i>Longitud de entrenudos (cm)</i>	0.87 $\pm$ 0.03
<i>Número de ramales</i>	7.50 $\pm$ 0.34

Como puede verse en la tabla 10, no habían diferencias importantes en las características morfológicas de las plantas situados en los invernaderos 1, 3 y 4 que tenían una luminosidad más o menos similar (ver tabla 1). Sin embargo sí que habían diferencias

apreciables en algunas características de las plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" cultivadas en los invernaderos 10 y 4S. El tamaño de las hojas, la altura de las plantas, la longitud de los entrenudos y el peso de las hojas fueron más grandes en las plantas cultivadas en el invernadero 4S (el más umbrío) que en las plantas cultivadas en el invernadero 10 (el más luminoso). Por otro lado, el número total de hojas y el número de ramales fue mayor en las plantas que se cultivaron en el invernadero 10 que en las plantas que se cultivaron en el invernadero 4S.

**Tabla 10.-** Características vegetativas de *Ficus benjamina* "Mallorca" de 18 meses de edad cultivados en los invernaderos número 1, 3, 4 y 10.

	<b>INVERNADERO</b>				
	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4S</b>	<b>10</b>
<i>Longitud de la 1ª hoja (cm)</i>	5.90±0.28	5.58±0.56	4.23±0.41	5.23±0.15	4.77±0.09
<i>Longitud de la 2ª hoja (cm)</i>	5.62±0.12	5.08±0.37	5.08±0.44	6.90±0.37	4.73±0.18
<i>Longitud de la 3ª hoja (cm)</i>	5.50±0.36	5.38±0.21	5.09±0.66	7.75±0.12	4.05±0.08
<i>Longitud de la 4ª hoja (cm)</i>	5.25±0.68	4.96±0.11	5.05±0.92	7.15±0.32	4.98±0.23
<i>Anchura de la 1ª hoja (cm)</i>	1.93±0.13	1.76±0.16	1.49±0.21	1.65±0.05	1.68±0.08
<i>Anchura de la 2ª hoja (cm)</i>	2.05±0.05	2.00±0.27	1.75±0.14	2.35±0.11	1.75±0.03
<i>Anchura de la 3ª hoja (cm)</i>	1.80±0.15	2.04±0.09	1.88±0.12	2.39±0.08	1.70±0.06
<i>Anchura de la 4ª hoja (cm)</i>	2.00±0.10	1.96±0.06	1.64±0.24	2.58±0.06	1.82±0.10
<i>Peso de la 1ª hoja (mg)</i>	120.73±12.57	98.10±16.52	75.50±15.15	86.48±5.62	87.47±8.03
<i>Peso de la 2ª hoja (mg)</i>	123.23±7.31	99.50±15.19	97.85±12.82	170.20±14.77	83.00±9.39
<i>Peso de la 3ª hoja (mg)</i>	106.20±13.52	117.23±10.75	100.68±21.31	206.88±9.28	83.00±9.39
<i>Peso de la 4ª hoja (mg)</i>	101.97±19.39	104.40±5.59	93.33±22.56	175.73±9.50	103.67±14.27
<i>Número de hojas</i>	51.33±4.98	53.00±2.08	67.67±2.67	63.00±10.82	76.33±10.93
<i>Altura de la planta (cm)</i>	22.27±1.65	21.43±1.30	22.50±0.85	24.33±0.94	18.37±1.04
<i>Número de entrenudos</i>	22.33±2.19	22.00±2.52	24.33±1.76	22.67±1.76	23.67±1.20
<i>Longitud de entrenudos (cm)</i>	1.00±0.06	1.00±0.14	0.93±0.06	1.09±0.11	0.77±0.01
<i>Número de ramales</i>	10.00±3.21	7.33±0.33	9.00±1.00	8.33±1.20	11.00±0.58

En la tabla 11 se muestran los incrementos en las características vegetativas que se produjeron en plantas de *F. benjamina* “Mallorca” cultivadas en el invernadero número 3 (durante 6 meses), y que posteriormente se trasladaron a los invernaderos 1, 3, 4 y 10, donde permanecieron otros 4 meses. El mayor aumento en el tamaño de las hojas se produjo en las plantas situadas en el invernadero 4S. En estas plantas hubo un incremento muy grande en la anchura de las hojas y, sobre todo, en la longitud de las mismas. El tamaño de las hojas de las plantas cultivadas en el invernadero más luminoso, el número 10, era menor. Por otro lado, el incremento total en la altura de las plantas fue mayor en los invernaderos 4S (5,90 cm) y 4 (4,07 cm) y casi no existió o fue nulo en el invernadero 10 (-0,06). Sin embargo, el incremento en el número de ramales fue mayor en el invernadero 10 (3,50) mientras que en el invernadero 4S fue muy bajo (0,83). El incremento en el número de hojas fue mayor en las plantas situadas en el invernadero 10 (41,43) mientras que el incremento en el peso de la hoja más desarrollada fue más grande en las plantas cultivadas en el invernadero 4S.

**Tabla 11.-** Incrementos en algunas características vegetativas de plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” cultivadas durante 4 meses bajo diferentes intensidades luminosas en distintos invernaderos

	Invernadero n° 1	Invernadero n° 3	Invernadero n° 4	Invernadero n° 4S	Invernadero n° 10
Longitud hoja (cm) <sup>(1)</sup>	0.73	0.58	0.29	2.95	-0.44
Anchura de la hoja (cm) <sup>(1)</sup>	0.08	0.03	-0.22	0.38	-0.22
Altura de la planta (cm)	3.84	3.00	4.07	5.90	-0.06
Número de entrenudos	1.33	1.00	3.33	1.67	2.67
Longitud de entrenudos	0.13	0.13	0.06	0.22	-0.10
Número de ramales	2.5	-0.17	1.50	0.83	3.50
Número de hojas	16.43	18.10	32.77	28.10	41.43
Peso de la hoja (mg) <sup>(1)</sup>	31.15	32.39	15.84	122.04	-1.84

En otro experimento independiente (tabla 12) se midieron los incrementos producidos en la altura total, la longitud internodal, el número de nudos y el número de hojas en el ramal principal de plantas de *Ficus benjamina* “Mallorca” cultivadas en los invernaderos 1, 3, 4 y 10, durante la etapa comprendida entre los meses de septiembre de 1996 y febrero de 1997. Durante este periodo, la longitud del día era muy corta y las temperaturas muy bajas. Como consecuencia no hubo un gran desarrollo ni un gran crecimiento, pero sí que se produjeron diferencias significativas en los invernaderos 10 y 4, sobre todo en lo que se refiere a la altura total de las plantas. Hay que destacar el hecho de que se detectó un mayor incremento en el número de hojas de las plantas situadas en el invernadero 4 que en las del invernadero 10. Esto contradice los resultados obtenidos hasta ahora en los que se observaba que el número total de

hojas de las plantas cultivadas en invernaderos más luminosos, era bastante mayor que el de las plantas cultivadas en invernaderos mucho más umbríos. Una posible explicación a este hecho es que, aunque en realidad se producen más hojas en la parte apical de las ramas de las plantas que crecen en invernaderos con una menor intensidad luminosa, es probable que, al mismo tiempo se produzca una mayor caída de hojas al tratarse de plantas más sensibles a los cambios ambientales. Por tanto, aunque desarrollen más hojas, el número total de hojas es menor porque pierden más hojas que las que aparecen de *novo*.

**Tabla 12.-** Incrementos en las características vegetativas producidas en plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" de 16 meses de edad cultivadas en los invernaderos 1, 3, 4 y 10 durante el periodo de tiempo comprendido entre septiembre de 1996 y febrero de 1997.

	INVERNADERO			
	1	3	4	10
<i>Incremento altura (cm)</i>	3.07 $\pm$ 0.22	2.88 $\pm$ 0.37	4.40 $\pm$ 0.51	1.99 $\pm$ 0.21
<i>Incremento long. internodal (cm)</i>	1.17 $\pm$ 0.08	1.32 $\pm$ 0.25	1.15 $\pm$ 0.11	2.02 $\pm$ 0.02
<i>Incremento del nº de hojas</i>	2.67 $\pm$ 0.21	3.00 $\pm$ 0.71	4.60 $\pm$ 0.40	2.67 $\pm$ 1.15
<i>Incremento del nº de nudos</i>	2.67 $\pm$ 0.21	2.60 $\pm$ 0.60	3.40 $\pm$ 0.24	2.67 $\pm$ 0.33

#### Contenido en clorofilas en hojas de *Ficus benjamina*

Se realizaron diversas extracciones de clorofila en las hojas más desarrolladas de plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca", del parental "Exotica" y de los otros cultivares de hojas variegadas: "Star light", "Golden princess" y "Reginald" (tabla 13). Las extracciones se llevaron a cabo en distintas épocas del año (febrero y octubre) y en plantas cultivadas en invernaderos con diferentes condiciones de luminosidad (ver fig. 1).

El contenido en clorofilas en plantas de nueve meses de *Ficus benjamina* "Mallorca" cultivadas en el invernadero número 3 fue bastante alto si lo comparamos con el de los otros cultivares de hoja variegada. En algún tipo de hoja, se acercó bastante a los contenidos de clorofila de las hojas del parental "Exotica". Estos resultados fueron totalmente diferentes cuando las plantas de los cinco genotipos se cultivaban en el invernadero de alta intensidad luminosa (número 10). En este caso el contenido en clorofilas disminuyó en todos los genotipos, pero fueron particularmente bajos en el *Ficus benjamina* "Mallorca" (0,34 mg de clorofila total/g de peso fresco en las hojas del "Mallorca" frente 1,31 mg de clorofila total/g de

peso fresco en las hojas del parental "Exotica"). En efecto, en estas condiciones las hojas del *Ficus benjamina* "Mallorca" presentaban áreas blancas muy extensas y, por consiguiente, era de esperar que el contenido en clorofila total por unidad de superficie de hoja fuera tan bajo. Por tanto, se puede afirmar que intensidades luminosas altas afectan mucho más al contenido en clorofilas en las hojas del *Ficus benjamina* "Mallorca" que al de los otros cultivares de hojas variegadas: "Golden princess" y "Star light".

**Tabla 13.-** Contenido de clorofilas en *Ficus benjamina*:

- 1.- *Ficus benjamina* "Exotica"
- 2.- *Ficus benjamina* "Mallorca"
- 3.- *Ficus benjamina* "Star light"
- 4.- *Ficus benjamina* "Golden princess"
- 5.- *Ficus benjamina* "Reginald"

a)

Fecha: 14/02/96

Invernadero n° 3

Maceta de 9 cm de diámetro

Edad: 9 meses

GENOTIPO(1)	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
<i>Exotica 1</i>	1,90	1,36	0,54
<i>Exotica 2</i>	1,93	1,37	0,56
<i>Mallorca 1</i>	1,28	0,90	0,38
<i>Mallorca 2</i>	1,72	1,21	0,51
<i>Star light 1</i>	1,15	0,80	0,35
<i>Star light 2</i>	1,32	0,93	0,39
<i>Golden princess 1</i>	1,82	1,28	0,54
<i>Golden princess 2</i>	1,52	1,08	0,44
<i>Reginald 1</i>	0,95	0,71	0,20
<i>Reginald 2</i>	0,88	0,67	0,21

(1) Se realizaron dos tandas diferentes de extracciones de clorofila, la 1 y la 2. Los números que aparecen junto al nombre del cultivar indican la tanda.

Tabla anterior (MEDIA)

GENOTIPO	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
<i>Exotica</i>	1,91	1,36	0,55
<i>Mallorca</i>	1,50	1,05	0,44
<i>Star light</i>	1,23	0,86	0,37
<i>Golden princess</i>	1,67	1,18	0,49
<i>Reginald</i>	0,89	0,69	0,20

b)

Fecha: 11/10/96

Invernadero nº 10

Maceta de 9 cm de diámetro

Edad: 1 año y medio

GENOTIPO	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
<i>Exotica</i>	1,31	0,82	0,49
<i>Mallorca</i>	0,34	0,18	0,16
<i>Star light</i>	0,66	0,39	0,27
<i>Golden princess</i>	1,25	0,83	0,42
<i>Reginald</i>	0,56	0,37	0,19

En otro experimento independiente se tomaron grupos de plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" de un año, cultivadas en el invernadero 3, y se midió el contenido en clorofilas en sus hojas. A continuación las plantas se separaron en distintos grupos y se situaron en los invernaderos 1, 3, 4, 4S y 10. Aquí se cultivaron durante 4 meses antes de proceder a la extracción y estudiar la influencia de las condiciones de luminosidad en la concentración de clorofilas en las hojas del "Mallorca".

**Tabla 14.-** Contenido en clorofilas en hojas más desarrolladas (primera o segunda) de plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" situadas en distintos invernaderos y sometidas, por tanto, a diferentes intensidades luminosas.

a)

ENSAYO 1

Fecha: 11/05/96

Maceta de 9 cm de diámetro

Edad: 1 año

Invernadero nº	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
3	1,13	0,74	0,39
3("Exotica")	1,31	0,82	0,49

b)

ENSAYO 2

Fecha: 17/09/96

Maceta de 9 cm de diámetro

Edad: 1 año y cuatro meses

Invernadero nº	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
1	2,00	1,38	0,62
3	0,98	0,70	0,28
4	1,92	1,36	0,56
10	0,46	0,33	0,14
3("Exotica")	1,77	1,19	0,58

c)

## ENSAYO 3

Fecha: 21/02/96

Maceta de 9 cm de diámetro

Edad: 1 año y nueve meses

Invernadero nº	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
1	0,71	0,50	0,21
3	1,27	0,89	0,38
4S	2,62	1,81	0,81
4	1,50	1,05	0,45
10	0,33	0,23	0,10

En la tabla 14 se vió que a los cuatro meses de cultivo, el contenido en clorofilas en las hojas de las plantas de "Mallorca" cultivadas en invernaderos con una baja intensidad luminosa eran mayores (2,00 mg de clorofila total/g de peso fresco en hojas de plantas cultivadas en el invernadero 1 y 1,92 mg de clorofila total/g de peso fresco en las hojas de las plantas situadas en el invernadero 4) y que el contenido en clorofilas en las hojas de las plantas cultivadas en el invernadero 10 (el más luminoso) era extremadamente bajo (0,46 mg de clorofila total/g de peso fresco).

Tanto en la tabla 13 como en la 14, se observa que el contenido en clorofilas en hojas de *Ficus benjamina* "Mallorca" situadas en el mismo invernadero varió según la época del año en que se llevaron a cabo las extracciones. Esto puede ser debido a que la longitud del día y la intensidad luminosa (parámetros que influyen mucho en el contenido en clorofilas en las hojas de las plantas) que afecta a las plantas no son iguales en cada estación

En la tabla 15 se muestran los contenidos en clorofila en distintas fechas del año de las hojas más desarrolladas de plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca" de más de dos años de edad cultivadas en los invernaderos 4 y 10. Los resultados indican que los contenidos en clorofila en las hojas de plantas de la misma edad son diferentes cuando se cultivan con distintas condiciones de luminosidad. Los valores de estos contenidos oscilaron entre 0,46 mg de clorofila total/g de peso fresco de hojas de *Ficus benjamina* "Mallorca" cultivadas en el invernadero 10 y 1,96 mg de clorofila total/g de peso fresco en hojas de *Ficus benjamina* "Mallorca" cultivadas en el invernadero 4. Estos valores (obtenidos en septiembre de 1996) aumentaron en las muestras de las hojas tomadas en mayo de 1996 (2,29 mg de clorofila total/g de peso fresco en las plantas del 4 y 0,34 mg de clorofila total/g de peso fresco en las plantas del 10). Hay que destacar que, en todos los casos estudiados, el contenido en clorofila total en las hojas de plantas de *Ficus benjamina* "Exótica" cultivadas en el invernadero 10, a veces, fueron incluso menores que los correspondientes a las plantas del *Ficus benjamina* "Mallorca" situada en el invernadero 4.

**Tabla 15.-** Contenido en clorofilas en las hojas más desarrolladas (primera o segunda) de plantas de **Ficus benjamina** "Mallorca" situadas en distintos invernaderos y sometidas, por tanto, a diferentes condiciones de intensidad luminosa.

a)

ENSAYO 1

Fecha: 11/05/96

Maceta de 12 cm de diámetro

Edad: 2 años

Invernadero nº	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
4	2,29	1,55	0,74
10	0,34	0,18	0,16
10("Exótica")	1,31	0,82	0,42

b)

ENSAYO 2

Fecha: 17/09/96

Maceta de 12 cm de diámetro

Edad: 2 años y cuatro meses

Invernadero nº	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
4	1,92	1,36	0,56
10	0,46	0,33	0,14
10("Exótica"))	1,77	1,19	0,58

c)

ENSAYO 3

Fecha: 20/12/96

Maceta de 12 cm de diámetro

Edad: 2 años y siete meses

Invernadero nº	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
4	1,84	1,30	0,54
10	0,16	0,12	0,04
10("Exótica")	1,70	1,16	0,54

b)

ENSAYO 4

Fecha: 21/02/97

Maceta de 12 cm de diámetro

Edad: 2 años y nueve meses

Invernadero nº	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
4	2,05	1,42	0,63
10	0,33	0,23	0,10
interior <sup>(1)</sup>	3,24	2,20	1,04

(1) Cultivada en condiciones similares a las que se pueden encontrar en una habitación

Con el fin de definir una hoja tipo o representativa del *Ficus benjamina* "Mallorca" se tomaron cinco hojas diferentes que formaban una gama de jaspeado que iba desde el casi blanco o verde más claro hasta el verde más intenso y se realizó una extracción de clorofilas en cada una de ellas (tabla 16). Las hojas 2, 3 y 4 son las más representativas de la planta porque



presentan el típico jaspeado de color verde sobre un fondo amarillento característico de las plantas de *Ficus benjamina* "Mallorca". Es deseable cultivar plantas con el mayor número de hojas de este tipo, porque las plantas obtenidas serán, con toda probabilidad, más vistosas y homogéneas, con el dibujo de las hojas más uniforme y con un gran valor ornamental. En nuestro caso las hojas de las plantas cultivadas en los invernaderos números 3 y número 4 son los que tienen un contenido en clorofilas más parecido al deseado. Por tanto, se deberían fijar las condiciones de longitud del fotoperiodo y las de la intensidad luminosas para que todas las hojas producidas a lo largo del año, independientemente de la estación en que nos encontremos, fueran lo más parecidas posibles a la hoja número 3.

**Tabla 16.-** Contenido en clorofilas en 5 hojas de *Ficus benjamina* "Mallorca", que forman una gama que va desde el casi blanco o verde más claro hasta el verde más intenso y que incluye el *descriptor*

a)

Medida 1

Fecha: 14/02/97

Invernadero nº 4

Maceta de 12 cm de diámetro

Edad: 2 años

HOJA TIPO	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
1	0,45	0,32	0,13
2	1,38	0,98	0,40
3	1,61	1,14	0,47
4	2,22	1,55	0,67
5	3,37	2,32	1,05

b)

Medida 2

Fecha: 15/06/97

Condiciones de interior

Maceta de 12 cm de diámetro

Edad: 2 años y cuatro meses

HOJA TIPO	Clorofila total mg/g de peso fresco	Clorofila a mg/g de peso fresco	Clorofila b mg/g de peso fresco
1	0,32	0,23	0,09
2	0,95	0,68	0,27
3	1,66	1,18	0,48
4	2,31	1,62	0,69
5	2,49	1,76	0,73
tipo wild	3,24	2,20	1,04

## Resumen

La ausencia de problemas para la propagación a gran escala, la facilidad de aclimatación en el invernadero, el aceptable vigor de las plantas, su crecimiento uniforme, elevada densidad foliar y, sobre todo, la novedad que supone su atractiva variegación jaspeada

(de momento único) hacen del variante somaclonal scFb1-"Mallorca" una línea con posible interés para el mercado de especies ornamentales.

El *Ficus benjamina* "Mallorca" es, por tanto, un nuevo y distinto cultivar ornamental de *Ficus benjamina*. El cv. "Mallorca" se ha obtenido en un programa de selección somaclonal a partir de una mutación del parental *Ficus benjamina* "Exótica". El nuevo cultivar se caracteriza principalmente por la exclusiva y distinta variegación de sus hojas que lo hacen diferente de los otros cultivares variegados. En el cultivar "Mallorca" las hojas muestran una una variegación con sectores verdes y blanco-amarillentos, distribuidos irregularmente en toda la superficie de la hoja formando un dibujo de tipo jaspeado. Este dibujo jaspeado es el que lo distingue perfectamente de los cultivares variegados preexistentes. Otras características notables son: su intensa ramificación, su gran densidad de hojas, el menor tamaño de las mismas y la mayor resistencia a la caída de las hojas en bajas temperaturas. Todas estas características, y especialmente el patrón de variegación jaspeado de las hojas, distinguen al "Mallorca" como un cultivar nuevo y diferente de los conocidos de *Ficus benjamina*.

Las características generales del cultivar "Mallorca" anotadas hasta este momento son:

- Forma:** Erecta. Ornamental leñosa con múltiples ramificaciones. Compacta.
- Crecimiento:** Menos vigorosa que el parental *Ficus benjamina* "Exótica"(ver tablas 2-6).
- Altura:** Desde varios centímetros hasta 1 m (en la última fecha de lectura) pero se prevé que pueda alcanzar hasta los 3-4 m.
- Ramificación:** Uniforme.

**Follaje (hojas):**

- 1.- **Tamaño:** entre 3-12 cm de longitud y 1-4 cm de anchura (hasta la última lectura).
- 2.- **Cantidad:** Más numerosa que el parental *Ficus benjamina* "Exótica".
- 3.- **Color:** Variegado verde-blanco de tipo jaspeado, tanto por el haz como por el envés. Los sectores verdes y blanco-amarillento se distribuyen irregularmente por toda la superficie de la hoja a diferencia de otras mutantes variegados como el "Star light" y "Golden princess". La hoja del "Mallorca" tiene un jaspeado irregular de fondo amarillo con múltiple moteado verde.

La proporción de sectores verdes y blanco-amarillentos en el "Mallorca" es variable dentro de cada planta individual. La variegación ocupa toda la hoja pero la superficie total de color verde puede variar desde el 95% (hojas casi verde) hasta sólo un 5% (hojas casi blancas).

Asimismo varía en función de la época del año, de la longitud del periodo solar y de la intensidad luminosa que llega a las plantas. En invierno (con día corto) domina el área coloreada de amarillo sobre la de color verde. Por el contrario, en primavera-verano (con día largo) el color verde domina sobre el amarillo.

Como es lógico, las hojas con mayor proporción de sectores verdes respecto a sectores blancos muestran un crecimiento más activo y son más grandes y desarrolladas que aquellas en las que predominan los sectores blanco-amarillos sobre los verdes.

4.- **Forma:** Ovalada.

5.- **Textura:** Algo rugosa. Las hojas están más engrosadas (hay un pequeño relieve que se nota al tacto) en las áreas de color verde que en las zonas de color verde-amarillento.

6.- **Pecíolo:** 1,5 a 2 cm de longitud.

7.- **Forma:** Poco ondulada. Casi lisa.

8.- **Margen:** Liso.

9.- **Nerviación:** Un nervio central marcado suavemente.

**Parte leñosa** (tronco y nuevos brotes).-

1.- Nuevos brotes: de color marrón verdoso.

2.- Tronco principal y ramas adultas de color marrón.



Plantas del variante "Mallorca" de *Ficus benjamina*: (A) Enraizamiento *in vitro*. (B) Tras la fase de aclimatación. (C) Aspecto general de una planta en maceta de 11 cm de Ø. (D) Detalle de las hojas. (E) Grupo de plantas cultivadas en maceta de 11 cm de Ø. Hojas del variante "Mallorca" de *Ficus benjamina*: (F) Hoja característica. (G) "Mallorca"(1) y parental (2). (H) Gama de hojas del variante. (I) "Star light"(1), "Golden princess"(2) y "Mallorca"(3)



## **VI.- Variación somaclonal en *Spathiphyllum***



## **Introducción**

El *Spathiphyllum* pertenece a la familia de las ARACEAE y vive en los trópicos de los hemisferios oriental y occidental. A veces se pueden confundir con los *Anthuriums*, con los que están emparentados muy de cerca. El nombre *spathiphyllum* viene del griego *spathe*: una espata, y *phyllon*: una hoja, y se refiere a la apariencia de las espatas.

Los *Spathiphyllum*<sup>13</sup> son plantas de tipo herbáceo y perenne. Forman densas matas de hojas de color verde oscuro que nacen de unos rizomas horizontales con raíces. Las hojas (que nunca tienen forma de lóbulo ni de corazón en su base) se insertan en largos pedúnculos que se ensanchan hasta formar alas o vainas en, al menos, el primer tercio inferior de su longitud total y son curvadas en su parte superior.

Las zonas superiores de las hojas (que pueden ser lanceoladas, oblongas, elípticas u ovoidales) se desparraman, generalmente, hacia afuera. Al igual que en los otros miembros de la misma familia, las partes que usualmente se llaman flores son, en realidad, inflorescencias. Se trata de agregaciones de flores verdaderas y de sus partes constitutivas. Cada inflorescencia consiste en un espádice coronado con muchas flores, las masculinas en el extremo superior y las femeninas en la base, y una bráctea que sale desde la base de los espádices. Sus espatas, blancas o verdosas, son planas o casi planas. En general, las espatas de los *Spathiphyllum* son más estrechas que las de los *Anthurium*. En algunos casos, la parte inferior de la espata está unida al pedúnculo hasta cierta distancia por debajo del espádice, por lo que éste parece surgir de la vena central de la espata a algunos centímetros de su base. Los espádices de los *Spathiphyllums* son tersos y ásperos. Los estigmas de las minúsculas flores tienen tres o cuatro lóbulos y los frutos tienen forma de granos.

Las especies de *Spathiphyllum* con este tipo de espatas descritas son: el *S. blandum*, el *S. cochlearispathum*, el *S. phryniiifolium*, el *S. kochii*, y *S. clevelandii*. El *S. blandum* tiene sus hojas con las bases cónicas y afiladas. Es nativo de Centro América y puede medir de 30 a 60 cm de longitud. Tiene las hojas elípticas que se estrechan, paulatinamente y de forma simétrica, en ambos extremos. La relación entre la longitud y la anchura de la hoja es de 3 a 1 y los peciolos son alados en casi toda su longitud. Las espatas (de 25 cm de longitud) son blancas y tienen forma de hoja pero son más cortas.

---

<sup>13</sup> Tomado de Thomas H. Everett. 1982. The New York Botanic Garden Illustrated. Encyclopediae of Horticulture.



Las láminas de la hoja de *S. cochlearispathum* (que puede alcanzar una altura de un metro y medio o más en los especímenes más grandes) son oblongas y profundamente onduladas a lo largo de sus márgenes. Tiene los pedúnculos estrechos y alados y con pequeñas motitas de color blanco. Las inflorescencias (de 30 cm de longitud) tienen forma lanceolada o elíptica y poseen una espata erecta (en forma de anzuelo) y un áspero espádice casi sin pedúnculo. Es nativo del Sur de Méjico.

Nativo de Colombia y Venezuela, el *S. wallisii* es una especie robusta con hojas lustrosas y lanceoladas. Sus espatas son blancas y se vuelven verdes con la edad. El *S. phryniifolium*, de Panamá y Costa Rica, se confunde a veces con el *S. friedrichsthalii*. Ambas especies no se cultivan en gran escala. El *S. phryniifolium* se distingue por sus espádices (que tienen los peciolos más cortos que el *S. friedrichsthalii*) y por las largas y afiladas bases de sus hojas. También se puede diferenciar fácilmente del *S. kochii*, porque sus espádices son mucho más largos (pueden alcanzar los 45 cm de longitud). La especie de este grupo que se cultiva más frecuentemente es el *S. clevelandii*.

El otro grupo de especies con las espatas separadas de sus espádices incluye el *S. floribundum* originario de Colombia, que puede alcanzar hasta 30 cm de altura. Tiene las hojas estrechas de color verde oscuro, en forma elíptica y/o lanceolada. Estas hojas son tres veces más largas que estrechas y exhibe unas venas centrales más pálidas. Sus inflorescencias tienen espatas con espádices de color blanco. Otra especie de este grupo es el *S. patinii*. Es conocida como planta de cultivo y puede alcanzar hasta 45 cm de altura. Sus hojas son muy parecidas al *S. clevelandii*, y más estrechas que las del *S. floribundum*. Sus hojas son cuatro veces más largas que anchas y tersas, aunque no tienen una apariencia tan aterciopelada como en otros cultivares.

Otras especies que pertenecen a este grupo son *S. canaefolium*, *S. commutatum* y *S. cuspidatum*. El *S. canaefolium*, oriundo de la parte norte de Sudamérica y Trinidad mide cerca de 75 cm de altura. Posee hojas lanceoladas de 18 a 30 cm de longitud. Sus fragantes inflorescencias tienen espatas elípticas, lanceoladas, puntiagudas y rectas de entre 7,5 y 12,5 cm de longitud. Son de color blanco en la zona superior y más verdosa en la inferior. Los espádices son totalmente blancos al madurar. El *S. commutatum*, originario de las Islas Filipinas y de las Islas Molucas, se parece mucho al *S. cannaefolium*. La diferencia más destacada radica en la forma de sus hojas que son más elípticas que las de este último. Nativo de la zona norte de Sudamérica, el *S. cuspidatum* mide de 30 cm a 1 m de altura. Tiene largas hojas lanceoladas o elípticas de 15 a 30 cm de longitud o incluso superiores. Las inflorescencias tienen espádices de

---

color crema de 2,5 a 10 cm de longitud y una espata (de 12,5 a 20 cm de longitud) con una línea central de color verde en la zona dorsal. La espata cambia a amarillo verdoso con la edad.

Algunos *Spathiphyllums* se cultivan para ser comercializados como planta ornamental. El más importante es el *S. clevelandii*, a menudo denominado por error *S. kochii* (una especie que no se cultiva). Este híbrido tiene hojas delgadas, tersas y lanceoladas de color verde con márgenes ondulados y finos peciolos. Posee pedúnculos florales de tipo junco y espatas de color blanco con una línea verde en su dorso. Estas espatas se vuelven verdes con el tiempo. Los espádices son blancos y tersos y sus pedúnculos se insertan en la parte inferior de la espata. Esta planta, aunque en proporción más grande, es similar al *S. wallisii*. El híbrido “Marion Wagner” (que tiene como parentales *el S. cochlearispathum* y *el S. wallisii*) tiene las hojas tersas y satinadas y unas fragantes inflorescencias con espatas de color blanco verdosas que se vuelven totalmente verdes con la edad. Los espádices están unidos a las espatas por su parte más inferior. Otra variedad muy elegante y muy cultivada, con espatas de 12,5 a 20 cm, es el “Mauna Loa” que es, probablemente, un híbrido entre la variedad “McCoy” y *el S. floribundum*. Se trata de una cultivar vigoroso, compacto y con un follaje verde terso. Las inflorescencias tienen brácteas blancas y son ligeramente cóncavas en su parte superior. El híbrido “McCoy”, obtenido en Hawaii a partir de *S. cochlearispathum* y *S. clevelandii*, es excepcionalmente vigoroso y puede llegar a alcanzar una altura de un metro y medio. Sus espatas, de 20 a 45 cm de longitud, son de color blanco o blanco cremoso y cambia a verde según la edad. El pedúnculo del áspero espádice está unido a la espata en más de 2,5 cm de longitud de la junta.

En regiones tropicales y subtropicales, donde no se producen heladas, los *Spathiphyllum* tienen un comportamiento excelente en áreas sombreadas o parcialmente sombreadas donde pueden obtener suelos ricos y húmedos. Se desarrollan bien, cultivados en maceta, en invernaderos que reproducen ambientes cálidos, húmedos y poco luminosos. En sus zonas de origen son excelentes como plantas situadas bajo los árboles y son correctas como plantas de bordes de caminos y senderos. En nuestras latitudes, los *Spathiphyllum* son plantas de interior adecuadas y la mayoría de sus variedades funcionan muy bien como tales. Esto es especialmente cierto para el *Spathiphyllum clevelandii* cuyos ejemplares, aunque florecen poco, se mantienen atractivos durante extensos periodos de tiempo, incluso en lugares escasamente iluminados. En general, la producción de inflorescencias parece estar influenciada por las condiciones de humedad.

Los *Spathiphyllum* son plantas tropicales que se adaptan fácilmente a una gran diversidad de condiciones ambientales: tipos de sustrato, intensidad de luz y humedad relativa. Necesitan calefacción y se recomienda una temperatura mínima de cultivo de 15-20°C, con una atmósfera razonablemente húmeda. La temperatura máxima de cultivo puede ascender hasta 32°C. Los mejores resultados se obtienen en condiciones de humedad elevada y con buenas condiciones de luz, pero nunca bajo la luz solar directa. Para conseguir un buen crecimiento se requiere un sustrato rico en nutrientes, bien drenado y constantemente húmedo. Los especímenes que han desarrollado un gran sistema radicular, que ocupa una buena parte del espacio en la maceta, se benefician en gran medida de las aplicaciones regulares con fertilizante líquido diluido durante la primavera, el verano y el otoño.

Las plantas enmacetadas necesitan ser transferidas a contenedores mayores periódicamente (cada tres o cuatro años). La propagación convencional se realiza fácilmente por división de mata a finales de invierno o primavera. Se pueden usar también las semillas frescas, sembrándolas en un sustrato a base de arena y turba a una temperatura de 25°C.

Las variedades más conocidas e importantes<sup>14</sup> de *Spathiphyllum* son:

**blandum (gardneri)**; de las Indias del Este, Jamaica y Surinam. Es una planta robusta con grandes hojas coriáceas, lanceoladas, profundamente verdes y con venas muy marcadas. La espata, en forma de cuchara y puntiaguda, es de color verde pálido. El espádice contiene un gran número de botones o prominencias.

**"candidum"** (hort.); muy parecido al floribundum pero más grande. Su hojas son oblongas y puntiagudas de color verde mate satinado y con bandas centrales pálidas. Los peciolos tienen amplias alas abiertas. La espata es pequeña y blanca y el espádice puede ser de color verde oscuro y/o blanco. Se puede considerar como una forma más grande de *S. floribundum*.

**cannaefolium (dechardii)**; originario de Venezuela y B. Guiana. Es una planta coriácea con hojas (arrugadas, espesas y opacas) de color verde oscuro y de forma cónica en la base. Los peciolos son nervados con una espata externa de color verde y un espádice interno blanco y cremoso.

**"clevelandii"** (kochii); es una planta muy comercial, ramificada y que produce muchas flores. Es muy parecida al *wallisii* pero proporcionalmente más grande. Las hojas son delgadas, coriáceas, verdes y lanceoladas con un margen ondulado. Las inflorescencias están situadas sobre un tallo de tipo junco, en una espata ovalada, puntiaguda y blanca (que se vuelve de color

---

<sup>14</sup> Tomado de Exotica 3: Pictorial encyclopedia of exotic plants. Guide to care of plants indoors. Graf, A.B. Century, 1970.

verde manzana con la edad) que tiene una línea verdosa en la parte dorsal y un espádice blanco de tipo laberinto.

**cochlearispathum** ( México y Guatemala); se trata de plantas grandes de hasta 180 cm de longitud, con hojas enormes, largas y pesadas. Estas hojas son opacas, ligeramente verdes y con el margen ondulado. Las inflorescencias (situadas sobre un terso y tieso pedúnculo) tienen grandes espatas, son bastante coriáceas, de color amarillo verdoso y exhiben un espádice de color blanco.

**commutatum** (Indonesia y Filipinas); planta elegante de crecimiento vigoroso con hojas anchas y arrugadas, de color verde fresco y de forma elipsoidal que se sostienen sobre tersos peciolos. El espádice, corto y espeso, es blanco y se vuelve verde con la edad. Está sostenido por una amplia y coriácea espata de color blanco cremoso, con un eje de color verde, y que se vuelve cada vez más verde al madurar.

**cuspidatum** (Surinam y B. Guayana); es una planta sutil de hojas brillantes, largas y elípticas, dispuestas sobre peciolos alados en la base. La inflorescencia tiene forma de laberinto y está compuesta de un un espádice fino, verde blancuzco y estrecho, y de una espata con una línea verde en su dorso.

**floribundum** (multiflorum) (Colombia); planta compacta y enana con hojas coriáceas, verdes, satinadas, en forma de huevo o elípticas, con una banda central pálida. Los peciolos son erectos y alados. La espata es pequeña y blanca y el espádice es corto y de color blanco verdoso.

**friedrichsthali** (Costa caribeña, bosques de Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Norte de Colombia); Es una planta robusta con brillantes hojas de color verde profundo, lanceoladas y coriáceas; la lámina foliar puede alcanzar los 28 cm de longitud. La espata es blanca, abarquillada, lanceolada y elíptica y puede llegar a alcanzar los 12,5 cm de longitud. El espádice tiene entre 3 y 8 cm de longitud. En contraste al *phryniifolium* la base de las hojas son obtusas y los estilos de los ovarios son cónicos.

**"Marion Wagner"** (*cochlearispathumxwallisii*); es un híbrido grande y decorativo creado por Wagner-Hollywood en 1946. Con hojas satinadas que nacen intermitentemente desde abril a julio y con grandes espatas de casi 40 cm de longitud y un espádice de color blanco verdoso. Posee una dulce fragancia.

**"Mauna loa"**; es un híbrido diploide desarrollado por Griffith-L.A. que procede de un plántula de *S. floribundum* y de un híbrido hawaiano, probablemente el *S. "McCoy"*. Es una planta robusta de hábito compacto y que tiende a dividirse por la base. Las hojas tienen un color verde oscuro. Es una planta muy floribunda que produce espatas de color blanco de 10 a 12,5 cm de longitud, aunque pueden ser más largas en plantas adultas cultivadas en grandes macetas. Tiene tendencia a parecerse al *clevelandii*.

**"McCoy"** (Takahashi); probablemente un híbrido de *cochlearispathumxclevelandii*. Es una planta vigorosa de gran desarrollo con hojas grandes y largas. Las espatas, blancas y cremosas,

cambian a verde claro con el paso del tiempo. El espádice está integrado a la espata a partir de unos 2,5 cm por encima de su propia base y posee unos gránulos más o menos puntiagudos.

**patinii** (Colombia); graciosa planta con estrechas hojas lanceoladas, con peciolos de venas marcadas. Las inflorescencias se disponen sobre largos tallos y están formados por espatas blancas y espádices blancos y verdes.

**phryniifolium** (Costa Rica, Panamá), es una planta robusta con grandes hojas arrugadas de color verde, y que tienen un larga base. Las inflorescencias tienen unas amplias espatas de color verde amarillento pálido y espádices de color blanco.

**quindinense** (Tolima, Colombia); del grupo del *S. lechlerianum*. Es una planta coriácea de hojas estrechas, largas y elípticas. Las inflorescencias están situadas sobre un terso pedúnculo con una espata puntiaguda de color blanco en la parte interna y verde oscura en la parte externa.

**wallisii** (Colombia y Venezuela); planta vigorosa con hojas lanceoladas. Las inflorescencias están dispuestas sobre tallos en forma de junco. La espata es oval y de color blanco y, con el tiempo, se vuelve verde. El espádice es de color blanco. Se trata de un cultivar muy cercano al *S. clevelandii* (kochii) aunque más pequeño.

En la actualidad, sólo sale al mercado el *Spathiphyllum* de calidad contrastada ya que en los grandes centros productores se realizan pruebas en las que se comparan el hábito de crecimiento de las variedades ya existentes con el de las nuevas. Durante el crecimiento y la floración, los suministradores y cultivadores controlan los cultivares seleccionados constantemente. Se fijan en la estructura de la planta, la formación y el número de brotes, el color de la hoja y el desarrollo de la flor. A la hora de la elección definitiva de una variedad concreta, los cultivadores no están interesados en cultivar aquellas que dieron malos resultados durante las pruebas. Por tanto, este tipo de estudios previos, en los que se comparan los comportamientos de las distintas variedades, hacen que la calidad de los *Spathiphyllum* elegidos vaya mejorando estructuralmente a lo largo del tiempo.

Tanto para el comercio como para el consumidor, el tamaño de la planta es, muchas veces, decisivo. En los mercados la planta se ofrece en diversos formatos, con todos los tamaños intermedios, en maceta de 9 a 27 cm.

Los *Spathiphyllum* se han desarrollado hasta formar un grupo muy grande de productos con excelente reputación. Son aptos para terrazas y patios, pero no soportan la luz directa del sol durante todo el día. Esto causa el amarilleo de las hojas. También se desarrollan bien en sitios con poca luz, por lo que en los países del área mediterránea pueden situarse sin problemas

dentro y fuera de casa<sup>15</sup>. Sólo el riego es un aspecto que requiere una atención especial, ya que no soporta la sequedad.

El número total de *Spathiphyllum* que se produjeron en laboratorios comerciales en Holanda<sup>16</sup> durante los años comprendidos entre 1982 y 1990 fueron los siguientes:

<u>AÑO</u>	<u>Nº DE UNIDADES</u>
1982	45,000
1983	13,200
1984	10,300
1985	35,450
1986	512,700
1988 <sup>17</sup>	1,618,287

El número total de plantas de *Spathiphyllum* producidas por micropropagación en Europa durante el año 1990 fue de 9,827,000 plantas. Estos datos indican que el *Spathiphyllum* es la 4ª planta que más se ha reproducido por cultivo de tejidos, y ocupa el 2º lugar si sólo tenemos en cuenta las plantas de interior (Ríodáin, 1992).

Las plantas de interior de hoja verde son, después de las orquídeas, el segundo grupo de plantas que más se producen en gran escala mediante el cultivo de tejidos en Norteamérica. Su producción total en 1985 se estimó en 32,5 millones de plantas. Cerca de la mitad de esta producción son plantas de *Syngonium*, cuyo cultivar "White Butterfly" es el líder. Una de las plantas de interior de hojas verdes más importante es el *Spathiphyllum*, con unos 6 millones de plantas producidas al año por cultivo de tejidos, lo que da idea de la importancia industrial y comercial de esta planta.

<sup>15</sup> Fuente Oficina holandesa de flores. PLANTFLOR. Cultivo&Comercio. Año 9-Nº2-pág 48. 1996.

<sup>16</sup> Pierik, R.L.M. 1987. In vitro culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff publishers. Dordrech. p.306.

<sup>17</sup> Pierik, R.L.M. 1991. Commercial propagation in Western Europe and Israel. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman(eds.) Micropropagation, 155-165.

<b>Tabla 1.- Número de laboratorios de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales que multiplican a gran escala plantas de <i>Spathiphyllum</i> en Europa</b>		
<b>Países</b>	<b>1990</b>	<b>1993</b>
Austria	-	1
Bélgica	7	5
Bulgaria	-	1
Suiza	4	3
República checa	-	1
Alemania	5	3
Dinamarca	1	3
España	3	5
Francia	5	1
Grecia	4	5
Italia	11	10
Irlanda	1	1
Noruega	1	-
Holanda	7	5
Suecia	1	1
Hungría	-	2
Eslovaquia	-	2
Finlandia	-	1
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

Tomado del Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories. Ediciones 1990 y 1993. Commission of the European Communities.

El número de laboratorios comerciales que produjeron esta planta durante 1990 y 1993 fue, en ambos casos, de 50. Pero, si sólo tenemos en cuenta los laboratorios de los países que formaban la antigua Europa occidental, en realidad se produjo un descenso de 7 centros de producción en este corto intervalo de tiempo. Hay que tener presente que en el año 1990 no se disponía de las cifras correspondientes a los países del Este. Este descenso en el número total de laboratorios que multiplican *Spathiphyllum* en Europa occidental supone un 14% del total y puede indicar que ha comenzado a saturarse el mercado con este tipo de producto.

### **Cultivares más importantes**

Durante los últimos 20 años el *Spathiphyllum* ha ganado gran popularidad dentro de la industria de la planta de follaje tropical<sup>18</sup>. En ello incide el hecho de que este género produce flores grandes, vistosas y de buena conservación y también la relativa facilidad de su cultivo a nivel industrial, la disponibilidad en una extensa gama de tamaños de maceta entre 7 y 44 cm de

<sup>18</sup> OGLESBY PLANT LABORATORIES. Atlanta, Florida, EEUU.

Plantas exóticas. *Spathiphyllum*, un cultivo en alza. Un puente entre plantas de follaje y plantas de flor en maceta. HORTICULTURA INTERNACIONAL 14. Diciembre 1996. Año 4, nº 14 pp.118-121.

diámetro, así como el hecho de tratarse de plantas que resultan fáciles de cultivar por el consumidor y de larga duración.

El *Spathiphyllum* constituye un puente entre las plantas de follaje y las plantas de flor de maceta debido a que es productora de flores y, al mismo tiempo, tiene un follaje atractivo y persistente. Su cultivo comercial se lleva a cabo en diversas zonas productoras del mundo. Existen algunos cultivares muy populares que se pueden cultivar tanto en las casas umbrías del sur de Florida como en los invernaderos de Europa. Sin embargo, a medida que el mercado se vuelve más sofisticado, los cultivadores utilizan cada vez más, variedades mejoradas y seleccionadas para cada zona específica.

En la tabla 2 se muestra una relación de algunos de los cultivares más comunes, los tamaños de maceta predominantes, la forma de propagación y la zona de producción. Debe tenerse en cuenta que esta lista de variedades de *Spathiphyllum* más populares puede cambiar año a año, a medida que los cultivares ganan o pierden el favor del público.

**Tabla 2.**-Variedades de *Spathiphyllum* que se comercializan más frecuentemente.

<b><u>CULTIVAR</u></b>	<b><u>MACETA(CM)</u></b>	<b><u>FUENTE</u></b>	<b><u>ZONA DE PRODUCCIÓN</u></b>
<b>Cupido</b>	7,5-15	Semilla	Europa
<b>Quatro</b>	15	Semilla	Europa
<b>Petite</b>	7,5-20	Cultivo de tejidos	Todo el Mundo
<b>Star light<sup>®</sup></b>	10-25	Cultivo de tejidos	Estados Unidos
<b>Symphony<sup>TM</sup> pat#8849</b>	15-20	Cultivo de tejidos	Estados Unidos
<b>Viscount</b>	15-25	Cultivo de tejidos	Todo el Mundo
<b>Gigant</b>	15-25	Cultivo de tejidos	Europa
<b>Lynise<sup>®</sup> pat#6145</b>	15-25	Cultivo de tejidos	Estados Unidos
<b>Supreme<sup>®</sup></b>	15-35	Cultivo de tejidos	Estados Unidos
<b>Sensation<sup>®</sup> pat#6964</b>	20-44	Cultivo de tejidos	Todo el Mundo

El número de variedades que se comercializan en Europa ha aumentado espectacularmente en pocos años. En la tabla 2 se indican los cultivares que se producen por cultivo de tejidos en los últimos años.

**Tabla 3.**- Variedades de *Spathiphyllum* que se propagan *in vitro* en los laboratorios europeos.



<u>1990</u> <sup>19</sup>	<u>1993</u> <sup>20</sup>	<u>1997</u> <sup>21</sup>
Mauna Loa	Bennet	Ancora
Prolific	Blue Major	Candor
Supreme	Brillant	Ceres
Tasson	Euro 92	Claire
	Mauna Loa	Cupido
	Petite	Daniel
	Prolific	Euro gigant
	Supreme	Illusion
	Viscount	Mozart
	Wallisii	Petit Daniel
		Pallas
		Petite
		Quattro
		Sensation
		Wallisii

El gran número de nuevas variedades de *Spathiphyllum* que se registran año tras año en el mundo se debe, en gran medida, a las mutaciones casuales que se producen durante el cultivo de tejidos, aunque algunas de estas variedades se obtienen también por los métodos clásicos de mejora. Así, por ejemplo, la variedad "Gorguisis 1" syn. "Sensation" procede de una polinización controlada del "Fantastica" por el "Supreme" (Anónimo, 1995). Sin embargo, la variedad Sandra deriva de una mutación espontánea de "Lillian", una selección del "Mauna Loa" que se obtuvo en unos viveros de Florida y que se reprodujo por su crecimiento homogéneo, su floración temprana y prolífica y su morfología. Se ha multiplicado *in vitro* durante tres generaciones y las plantas obtenidas son conformes al parental (Donnan y Hickerson, 1994). Por otro lado, la variedad "Sandra" se obtuvo de modo casual a partir de una plántula de semilla de un cultivo proveniente del *Spathiphyllum wallisii* y se distingue por sus hojas y flores más largas (Leverett, 1994).

En general, la propagación en gran escala de los *Spathiphyllum* se puede realizar mediante cultivo de tejidos o a partir de semillas. El cultivo de tejidos ofrece al productor la ventaja de disponer de un material genéticamente homogéneo, más uniformidad en el cultivo y disponibilidad a lo largo de todo el año. En la actualidad sólo en Estados Unidos, son más de 25 los cultivares identificados que se ofrecen en los diferentes catálogos de los laboratorios comerciales. Dado que, tanto en Estados Unidos como en Europa, el cultivo de una planta concreta está respaldado por numerosos programas de propagación cabe esperar que, en un periodo de tiempo relativamente corto, aparecerá un número importante de nuevas variedades en el mercado.

<sup>19</sup> Cost 87. 1991. Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories 1990. Commission of the European Communities.

<sup>20</sup> Cost 87. 1994. Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories 1993. Commission of the European Communities.

<sup>21</sup> Oficina de plantas y flores holandesa. 1997

El *Spathiphyllum* producido por semilla ha perdido importancia en favor del propagado mediante cultivo de tejidos. La producción a partir de semillas, aunque económica, tiende a carecer de la calidad y de la uniformidad que demandan los productores hoy en día, especialmente en los tamaños de maceta mayores. A pesar de ello, en los últimos tiempos se ha vuelto popular en Holanda, y también en España, el cultivo en gran escala de plantas de semilla en macetas pequeñas (7,5 a 10 cm), debido a la producción controlada de semillas respaldada por excelentes sistemas de producción y comercialización.

Es importante tener en cuenta que las condiciones de cultivo pueden influir en algunas características morfológicas de las plantas, lo que, dada la gran similitud existente, dificulta en gran medida la diferenciación de los cultivares entre sí. Esto se nota especialmente en las variedades de *Spathiphyllum* ya que, la mayor parte de ellas, no son muy diferentes entre sí. En lo que se refiere al sustrato de cultivo, el *Spathiphyllum* requiere una mezcla de sustratos con buen drenaje y capacidad de retención de agua. La mezcla 1:1:1 de turba, perlita y corteza para macetas es muy utilizada en el sur de Estados Unidos, mientras que en Europa suele utilizarse musgo de turba. El pH debe mantenerse entre 5,8 y 6,5. Generalmente, la calidad de las plantas es mayor cuando se cultivan en un sustrato a base de turba y otras mezclas de compost que con turba o con otro material sólo. Se ha comprobado que para la mayoría de las especies, entre las que se encuentran los *Spathiphyllum*, la proporción de turba en las mezclas puede ser reducida hasta una tercera parte para dar un medio de cultivo de características físicas óptimas, con una porosidad total > 85%, una capacidad del aire >30%, y una disponibilidad de agua entre pF1 y pF2 del 10% en invierno y el 20% en verano (Lamanna *et al.*, 1991).

En cuanto a la nutrición, los métodos basados en la aplicación de un fertilizante de liberación lenta (con una relación NPK 3:1:2), o una fertilización líquida continua o combinaciones de ambos tipos de fertilización son igualmente efectivos a la hora de aplicar los nutrientes. Muchos productores incorporan un fertilizante de liberación lenta en la mezcla de sus sustratos, suplementándolos posteriormente con aplicaciones líquidas y sólidas. Se pueden obtener plantas de *Spathiphyllum* de calidad óptima si las cultivamos en macetas de 15 cm de diámetro en un sustrato a base de turba, vermiculita y perlita en una relación 2:1:1, y las fertilizamos cada 3 meses con 10 g de abono de liberación lenta Osmocote 19N-2,6P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-10K<sub>2</sub>O (Poole y Conover, 1990). También son muy convenientes las aplicaciones foliares suaves de 450 g de urea+450 g de nitrato de potasio+550 g de nitrato de magnesio en 450 l de agua. A esta mezcla se le puede agregar una fuente soluble de microelementos. Al fertilizar plantas cultivadas en maceta de *Spathiphyllum wallisii* con mezclas de fertilizantes NPK de tipo inorgánico y fertilizante NPK de tipo orgánico se obtuvieron plantas con un crecimiento más vigoroso que si se trataban exclusivamente con abono mineral y, además, se redujo el número

de fertirrigaciones por ciclo de cultivo (Magnani y Malorgio, 1995). En otros experimentos independientes, se comprobó que fertilizaciones líquidas sobre el cultivar "Petite" con 250 mg N/l de un abono soluble (de 24N:3,4P:13,3K) proporcionaron el máximo crecimiento y, al mismo tiempo, se comprobó que un aumento excesivo en el nivel de salinidad supone una disminución en la altura de la planta, el área de la hoja y el peso seco de la hoja (Campos y Reed, 1994), y, por tanto, una disminución en la calidad visual de la planta (Martin y Borgardt, 1994).

En los *Spathiphyllum* es conveniente prestar especial atención a las deficiencias nutricionales que se puedan dar en los siguientes elementos nutritivos:

- **Magnesio.** Su carencia es un problema para algunos cultivares. Los síntomas son la aparición de márgenes de color amarillo-oro en las hojas inferiores. La prevención de la deficiencia de magnesio es mucho más eficiente que tratar de revertir una deficiencia ya establecida.
- **Hierro y manganeso.** La deficiencia de estos elementos se traduce en una tasa de crecimiento reducida y hojas cloróticas. Es común durante los meses invernales cuando la temperatura del suelo está por debajo de 18,3 °C.
- **Azufre.** La deficiencia de este elemento se evidencia como una clorosis generalizada del follaje. Se observa a veces al utilizar fertilizantes altamente refinados con un contenido muy bajo en este elemento.
- **Boro.** Su deficiencia puede causar un acostillamiento longitudinal de las hojas, más evidente en el follaje nuevo.
- **Potasio.** Su escasez origina pequeñas manchas amarillas o "flecós" en las hojas inferiores.

La frecuencia de riego debe estar diseñada para mantener el sustrato húmedo durante todas las fases del cultivo. El *Spathiphyllum* tolera el riego foliar y se comporta excepcionalmente bien en sistemas de riego por goteo o de reflujó por inundación. Estas plantas no toleran los suelos saturados durante periodos prolongados. Existen varias enfermedades que pueden afectar fácilmente a los cultivos regados en exceso causando colapso o marchitamiento de las hojas, necrosis a lo largo de los márgenes foliares y daños importantes en el sistema radicular.

Normalmente, en el cultivo industrial de los *Spathiphyllum*, se utilizan dos reguladores de crecimiento, la BAP y el GA<sub>3</sub>. La BAP es muy efectiva para aumentar la ramificación y compacidad de la planta y se usa, en general, en el estadio de planta joven. Además de los tratamientos durante esta etapa, algunos productores también aplican BAP inmediatamente después de que las plantas jóvenes se hayan transplantando a una maceta más grande. La

mejora de la ramificación y compacidad son especialmente importantes para el cultivo en macetas pequeñas debido a que, en condiciones naturales, el menor tiempo de producción limita la ramificación natural. La BAP puede aplicarse mediante pulverización o ducha, a una concentración de 250-1000 ppm. Los tratamientos con esta hormona pueden inhibir el desarrollo radicular si se aplican antes de que las raíces estén bien establecidas. El efecto general de la aplicación de BAP depende del cultivar, la concentración, la etapa en que se encuentra el cultivo, el método de aplicación y la estación del año. Así, cuando se cultivan *in vitro* durante un largo periodo de tiempo plantas de *Spathiphyllum floribundum* en un medio con las sales minerales de Murashige y Skoog suplementado con 1-2 mg/l de BAP, las plantas que se obtienen tienen las hojas más estrechas, la relación entre el peciolo y la lámina de las hojas aumenta y, al mismo tiempo, la incidencia de callos que pierden su potencial organogénico es mayor. Esto puede evitarse eliminando la presencia de BAP en el medio de cultivo o reduciéndolo mediante la adición de carbón activo durante el ciclo de cultivo (antes o después de que las anomalías comienzan a desarrollarse) (Wand *et al.*, 1995).

El efecto de algunos reguladores de crecimiento puede verse potenciado mediante la adición de otros productos. Así, la adición del fungicida Imazalil al medio de cultivo aumenta drásticamente la formación de nuevos brotes en callos de plantas de *Spathiphyllum floribundum* cv. "Petite" y favorece la acción del BAP. Si aumentamos la concentración de Imazalil aumenta el número de brotes y puede llegar a reducir el tamaño de los mismos hasta niveles de meristemo. Si combinamos 2,5 mg/l de BAP con 16 mg/l de Imazalil obtenemos 127 brotes por explante. El Imazalil no modifica el efecto de inhibición radicular del BAP. Cuando se aplica Imazalil sin BAP, el número de raíces por planta y su longitud se reduce pero no se desarrollan nuevos brotes (Werbrouck y Debergh, 1995).

El ácido giberélico se utiliza ampliamente en el *Spathiphyllum* para forzar la floración temprana o para que las plantas produzcan flores durante todo el año. Las plantas de este género florecen de forma natural en la madurez, de forma abundante en la primavera, y esporádicamente durante el resto del año. Dado que el mercado demanda plantas con flores, los productores utilizan GA<sub>3</sub> para disponer de plantas en floración durante el año completo y, al mismo tiempo, programar la oferta para días especiales o en función de los pedidos. Con tratamientos de ácido giberélico se puede forzar, también, una floración temprana que posibilite la comercialización de plantas en tamaños de maceta más pequeños.

Uno de los tratamientos más usuales consiste en una aplicación foliar de GA<sub>3</sub> a 150-250 ppm cuando faltan 8-15 semanas para la venta. La concentración de la solución y el tiempo que transcurre entre el tratamiento y la floración dependen del cultivar y la época del año. Algunos

de los cultivares producen flores de buena calidad después del tratamiento mientras que otros no. Se ha comprobado que aplicaciones foliares de GA<sub>3</sub> en un rango comprendido entre 100 y 1000 ppm a plantas de *Spathiphyllum* cv. “Mauna Loa”, aumentaron la producción de flores. La dosis más adecuada era de 500 ppm. El tratamiento también indujo la floración en plantas jóvenes. El fotoperiodo no tuvo efectos en la floración o en la capacidad del GA<sub>3</sub> para inducir la floración. La temperatura nocturna más adecuada para el crecimiento, la floración y la inducción de yemas florales es de 20°C. A pesar de que en los *Spathiphyllum* la floración está inhibida a temperaturas mayores o menores de 20°C, los tratamientos con ácido giberélico pueden favorecer la producción de flores incluso a estas temperaturas. En condiciones naturales, el número de flores producidas era mayor con un sombreado del 30% que al utilizar un sombreado del 0%, 60% y 90%. Sin embargo, la inducción de flores por el GA<sub>3</sub> era igual de efectiva en todos los niveles de sombra (Shibata y Endo, 1990).

En otro experimento, al tratar plántulas procedentes de semillas de *Spathiphyllum* cv. “Mauna Loa” con 25-100 ppm de ácido giberélico se produjo un incremento en la altura de la planta, el área de la hoja, la longitud del peciolo, el área de la espata, la longitud del pedúnculo floral y del espádice, y el porcentaje de la floración. El número de flores por planta no varió significativamente debido al tratamiento, pero la floración sufrió un retraso de 23 días en la primera estación y de 28 en la segunda (Eltorky, 1993).

Por otra parte, en otro experimento se comprobó que a los 6 meses de un tratamiento (foliar o local) con 500-1000 ppm de ácido giberélico en plántulas del cultivar “Merry” del *Spathiphyllum patinii*, se indujo la floración de las plantas. Se observó que las plántulas no tratadas no florecieron. También se comprobó que cortes de trozos de tallo tratados con 100-1000 ppm de GA<sub>3</sub> produjeron plantas miniatura con flor. Estos resultados indicaron que ni la edad ni el tamaño de la planta ni tampoco la época del año influyen en la inducción de flores por el ácido giberélico (Ogawa *et al.*, 1994).

Las plantas tratadas pueden mostrar enanismo de las hojas nuevas, alargamiento de los peciolos y flores malformadas. Cada productor debe ensayar el ácido giberélico en sus instalaciones y con sus propios cultivares. Los productores también deben determinar la tolerancia de su mercado a algunos de los efectos negativos de estas aplicaciones.

Antes de cualquier tratamiento con hormonas de crecimiento a escala comercial, los productores deben hacer pruebas con unas pocas plantas de cada cultivar para conocer su respuesta y ver si existe algún tipo de fitotoxicidad.

Todos los reguladores de crecimiento deben aplicarse cuidadosa y uniformemente en todo el cultivo para asegurar resultados consistentes. Nunca debe aplicarse este tipo de sustancias cuando las plantas están bajo condiciones de estrés.

Otro de los factores ambientales que pueden influir en la morfología de la planta es el calor, bien sea por aplicación directa a la zona de las raíces o bien mediante el calentamiento del aire del entorno de las plantas. Así, si se aplica calor a las raíces de las plantas de *Spathiphyllum* en maceta mediante el sistema de lecho o cama caliente (hasta unos 30 °C) y, al mismo tiempo, se aumenta la temperatura ambiente en los invernaderos, se comprueba que la temperatura óptima del aire para la floración de *Spathiphyllum* es de 22°C, y la temperatura en la zona radicular puede estar comprendida entre 20°C y 26°C sin que se produzca ningún efecto negativo en la floración. El crecimiento, el desarrollo, la altura y el tamaño de las hojas de las plantas de *Spathiphyllum* se ven favorecidas con temperaturas del aire de hasta 23°C. Temperaturas altas en las zonas de las raíces aumentan la relación entre el número de brotes y el número de raíces y disminuyen el número de brotes laterales, aunque, por otro lado, aumentan su peso seco. Estos resultados indican que la forma general de las plantas de *Spathiphyllum* puede estar afectada en gran medida por la acción ambiental del calor, aplicado a las zonas aéreas y/o a las más cercanas a las raíces (Vogelezang, 1992).

La mayoría de los productores empiezan sus cultivos con plantas de 10 a 14 semanas de edad y las transplanta a macetas de mayor tamaño. En general, las plantas jóvenes provenientes del cultivo de tejidos (microestaquillas) o de semillas se cultivan y se envían al productor que “terminará” la planta en bandejas de alvéolos de diferentes tamaños. El tamaño más común de bandeja en Florida es de 72 celdas por bandeja. En Europa una de las más utilizadas es la de 60 celdas por bandeja. Los productores de planta joven de *Spathiphyllum* especifican cómo han sido reproducidas estas plantas utilizando términos tales como “producidas por raíces” o “plantas por células”. El término “por raíces” hace referencia al racimo de plantitas obtenido por cultivo de tejidos y proveniente de un mismo callo, mientras que “plantas por célula” se refiere a las microestaquillas o plántulas sembradas por alvéolo. Generalmente las matas de raíces obtenidas en cultivo de tejidos producen plantas muy compactas pero puede faltarle uniformidad al producto acabado. Son muy útiles para macetas pequeñas (menores de 15 cm), en las que los tiempos de producción y la inducción química de la floración no permiten una ramificación o floración natural. Las plantas jóvenes obtenidas a partir de microestaquillas individuales tienen tendencia a una mayor uniformidad y, con el tiempo, la mayoría de los cultivares producirán plantas compactas. La elección del productor de planta acabada respecto

al tamaño del alvéolo para la planta joven, así como la determinación del tipo de material, es decir, el *cluster* o número de plantas por celda, está determinada básicamente por las necesidades del productor y/o los requerimientos del mercado.

El tiempo de producción está relacionado directamente con el cultivar, tamaño de la maceta, planta inicial y ambiente de cultivo. Generalmente, una maceta de 7,5 cm a 10 cm requiere de 3 a 5 meses; una de 15 cm, de 7 a 9 meses; las de 20 cm, de 9 a 11 meses; las de 25 cm, de 10 a 12 meses y las de 35 cm, de 16 a 20 meses. Los productores deben estar bien informados por su proveedor de planta joven acerca de los tiempos de producción de un cultivar dado.

Para mejorar las características de los cultivares, los objetivos deben centrarse en algunas consideraciones cualitativas tales como: hábito de ramificación, floración natural durante todo el año, número de flores, color del follaje y resistencia a enfermedades específicas. La capacidad de los *Spathiphyllum* a ramificarse de forma natural es una característica genética que puede mejorarse en poco tiempo. Dos variedades nuevas que ejemplifican esto son “Symphony” y “Patrice”. Ambos se produjeron *in vitro* a partir de una única microestaca y proporcionaron a un producto acabado compacto.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal y métodos para el cultivo *in vitro***

El nuevo *Spathiphyllum* de porte compacto se identificó entre un grupo de plantas provenientes de una línea organogénica obtenida a partir de yemas laterales de *Spathiphyllum* “Prolific”. Las yemas laterales, con una porción adjunta de tejido de tallo subyacente, se establecieron *in vitro* en enero de 1993 y, tras 10 subcultivos de unas 6 semanas, apareció una planta de fenotipo más compacto, que se detectó después de la fase de aclimatación, y que se propagó en cultivo *in vitro* siguiendo procedimientos estándar.

Se eliminaron las hojas y las raíces de las plantas seleccionadas y todo el material vegetal restante, formado por tallo y yemas laterales, se lavó en agua corriente durante 1 hora y en etanol al 70% durante unos pocos segundos y, posteriormente, se desinfectaron durante 15 minutos en una disolución de hipoclorito sódico (lejía comercial de 50 g/l de cloro activo) al 2%, a la que se adicionó un 0,1% de Tween 20. Los explantes se transfirieron a una solución de

hipoclorito sódico al 0,2%, con 0,1% de Tween 20, donde permanecieron hasta su escisión definitiva. Se tomaron pequeñas piezas de segmentos de tallo de 1 cm<sup>2</sup> que contenían una yema lateral y se sumergieron en la disolución desinfectante inmediatamente después de la escisión y justo antes de la transferencia al medio. Los explantes desinfectados se inocularon en tubos de ensayo de 25x150 mm o 16x100 mm indistintamente, con tapones de polipropileno Bellco, que contenían 15 y 5 ml de medio de cultivo, respectivamente.

El medio de cultivo utilizado para las fases de iniciación, multiplicación y propagación del variante seleccionado y del propio parental fue el utilizado por Fonnesebech y Fonnesebech (1979). Consiste en un medio basal con las sales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 0,4 mg/l de tiamina-HCl, 100 mg/l de myo-inositol, 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar industrial (Pronadisa) y 0,2-2 mg/l de BAP como regulador de crecimiento. La concentración de la citokinina usada en el medio de cultivo varía en función de la tasa de multiplicación que se pretende alcanzar. Esta concentración se puede disminuir, hasta niveles muy bajos, con el fin de rebajar el efecto poco beneficioso que puede llegar a tener sobre las plantas cuando se abusa, un subcultivo tras otro, de su presencia a altas dosis y además, con el objeto de evitar el desarrollo de un gran número de plantas, demasiado pequeñas, que no van a poder superar con éxito la fase de aclimatación. El pH del medio se ajustó con KOH 1N antes de la esterilización en autoclave a 121°C durante 20 min.

Los cultivos se mantuvieron en cámaras de cultivo de ambiente controlado, a una temperatura de 23±2°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, proporcionado por tubos fluorescentes Osram de tipo luz día con una irradiación de 50 μw/cm<sup>2</sup> (1500 lux) tanto para las fases de iniciación y multiplicación como para la de enraizamiento.

Los frascos de cultivo (de 400 ml) utilizados para la fase de multiplicación y de enraizamiento tenían el cuerpo de vidrio y la tapa de plástico y de rosca. En cada recipiente se introdujeron de 10 a 15 explantes en el caso de la fase de multiplicación y de 50 a 60 explantes en el caso de la fase de enraizamiento.

Después de unas semanas de permanencia en el medio de iniciación, los explantes iniciales dieron lugar a la formación de numerosos brotes y callos organogénicos. Este callo organogénico se subdividió en trozos de 1,5 cm<sup>2</sup> y se subcultivó en el medio de multiplicación. Al cabo de unas semanas se obtuvo un gran número de brotes que surgían de un callo basal. El conjunto formado por el callo y los brotes se subdividía de nuevo en grupos más pequeños que se repicaban a un medio fresco para continuar la fase de multiplicación. Por otro lado, estos



brotos se podían individualizar o cortar en grupos de brotes más pequeños que se transferían al medio de enraizamiento.

El medio de enraizamiento era similar al medio basal previamente descrito pero con los macroelementos de Murashige y Skoog (1962) diluidos a la mitad, vía ningún regulador de crecimiento y con 2 g/l de carbón activo. Las condiciones de ajuste de pH y de esterilización en autoclave fueron las mismas que las descritas para la fase de multiplicación.

### **Aclimatación del material vegetal**

Después de permanecer unas 3-4 semanas en el medio de enraizamiento, las plántulas, perfectamente enraizadas, se transplantaron a packs A-60 para superar la fase de aclimatación en el invernadero. El sustrato utilizado fue turba y las condiciones ambientales fueron las proporcionadas por un túnel bajo plástico con calor aplicado directamente a las raíces por la técnica del lecho caliente y a la parte aérea de la planta por quemadores de gas natural. Se mantuvo el ambiente húmedo mediante el riego frecuente por aspersión. Al mismo tiempo se realizaron tratamientos fitosanitarios y fertilizaciones de forma periódica para mantener el buen estado sanitario de las plantas.

Tras superar con éxito esta trascendental etapa, las plantas aclimatadas se trasladaron a otras nuevas bancadas de cultivo a las que se les eliminó el túnel de plástico en donde continuaron su crecimiento en condiciones estándar bajo invernadero. El tipo de invernadero, los sistemas de calefacción, el rango de temperaturas, la luminosidad, la humedad relativa, el sustrato utilizado, así como el tamaño de maceta o contenedor, el abonado, el riego y su frecuencia y los tratamientos fitosanitarios a los que se vieron sometidas las plantas de *Spathiphyllum* son los mismos que los descritos para *Syngonium*.

Para el cultivo de plantas adultas de *Spathiphyllum* se ha de tener en cuenta que se trata de una planta compacta y de porte erguido que, a diferencia de los *Syngonium* clásicos, no necesita ser entutorada. Además, al tratarse de una planta de flor, el *Spathiphyllum* requiere unas condiciones de luminosidad diferentes al *Syngonium*. Normalmente las plantas de *Spathiphyllum* necesitarán, para favorecer la formación y la producción de flores, de un menor sombreado y en su caso, requerirán de unos tratamientos con productos específicos para lograr un mayor número de flores y de una mejor calidad.

### **Caracterización fenotípica del nuevo variante somaclonal**

Se compararon, a lo largo del tiempo, algunas características del parental, *Spathiphyllum* "Prolific", con respecto al nuevo cultivar compacto. Los caracteres medidos fueron: el número de brotes totales por inoculo o *cluster* original, el número de hojas, la altura de la planta, la longitud de la hoja a lo largo del nervio central, la anchura de la hoja, la longitud del peciolo y el peso de las cuatro primeras hojas desarrolladas.

Para estudiar la variación de estas características se tomaron las medidas en dos momentos distintos a lo largo del tiempo: i) A los nueve meses de cultivo *in vivo*, cuando las plantas se encontraban en pack de A-60 y las diferencias entre ambos variantes, después de la fase de aclimatación, empezaban a ser evidentes a simple vista; y ii) A los dos años de cultivo bajo invernadero, cuando ya habían sido transplantadas a macetas de 12 cm de diámetro.

No se pudo realizar ninguna medida relacionada con la floración (pedúnculo floral, espádice y espata) en las plantas del variante porque, hasta ese momento, no se había producido ninguna flor en las plantas seleccionadas. Estas medidas, de gran interés, se realizarán en el momento que sea posible ya que nos serán de mucha ayuda para poder definir mejor las características del nuevo variante obtenido con respecto a su parental o a otros cultivares que ya existen en el mercado.

En otro experimento independiente y con el objeto de estudiar con más detalle el número de brotes que se forman a partir del explante inicial inoculado en la fase de enraizamiento *in vitro*, se seleccionó una planta al azar del *Spathiphyllum* "Prolific" y otra del variante compacto y se estudiaron las características de cada uno de los brotes que forman el *cluster* o *clump* de plantas que surgen del mismo callo. Se individualizó cada brote y se midió el peso total, la altura, el número de hojas y la altura, anchura, peso y longitud del peciolo de las cuatro primeras hojas desarrolladas. Se midieron estas características en cada una de las plantas individualizadas y se consideraron como plantas independientes. Este estudio nos dió una idea más clara sobre las diferencias de la compacidad del nuevo variante con respecto a su parental.

## **Resultados y discusión**

### **Obtención del variante compacto de *Spathiphyllum***

El nuevo variante obtenido, que a partir de ahora denominaremos "Núria" es una planta de fenotipo más compacto que el parental *Spathiphyllum* "Prolific". Se originó a partir de una línea organogénica subcultivada 10 veces con una frecuencia de unas 6 semanas. El cultivo se estableció *in vitro* en enero de 1993 y tras un año de sucesivos repicados se pusieron a aclimatar 1080 plantas enraizadas *in vitro*. De entre este lote de plantas se detectó una de aspecto más compacto que las restantes y que presentaba unas características diferentes que se reflejaban sobre todo, en una menor altura total de la planta y en un mayor número de brotes. Estas características conferían al nuevo variante un fenotipo muy homogéneo y compacto de gran interés ornamental. Se aisló y se reintrodujo *in vitro* con el fin de obtener un mayor número de plantas para proceder al estudio de sus características.

Previamente a su establecimiento *in vitro*, la planta seleccionada se cultivó sin problemas en condiciones estándar bajo invernadero y algunas de sus yemas se utilizaron como fuente de material vegetal para su reintroducción *in vitro*. De esta forma, conseguimos una pequeña, pero suficiente, cantidad de plantas para estudiar sus características con respecto al parental.

La ausencia de problemas, tanto durante el trasplante al suelo y aclimatación como durante el posterior crecimiento de las plantas en invernadero, y la facilidad con que puede propagarse a gran escala aumenta su interés industrial como planta ornamental de interior. En un experimento concreto, de un total de 240 plantas aclimatadas *in vivo*, se desarrollaron normalmente 237 (98,75%). Este alto porcentaje de éxito en la fase de aclimatación se mantiene durante todo el año independientemente de la estación en la que se realiza el trasplante de las plantas enraizadas *in vitro* al suelo. Así, el 5/10/95 se aclimataron 1170 plantas de 1221 (95,8%); el 5/1/96 se aclimataron 650 plantas de 653 (99,5%) y el 7/6/96 se desarrollaron 796 plantas de 800 (99,5%).

### **Características vegetativas del variante "Núria" en comparación con las del parental "Prolific"**

En la tabla 4 se reflejan los valores de las características morfológicas del nuevo variante y del parental "Prolific" a los 9 meses de cultivo *in vivo*. A partir de este momento comenzaron a apreciarse diferencias entre el *Spathiphyllum* "Prolific" y el nuevo *Spathiphyllum* compacto "Núria". Durante las etapas de multiplicación, enraizamiento, aclimatación y en las primeras semanas de cultivo en invernadero, las plantas del "Núria" y del parental "Prolific" fueron tan parecidas que era imposible distinguirlas entre sí entre sí. A partir de los 6 meses las diferencias empezaron a ser patentes y quedó claro que se trataba de dos plantas con fenotipos muy diferentes (tabla 4). La altura total de la planta del "Núria" era 18,04±0,36 cm; mientras que la del "Prolific" era de 31,24±0,88 cm. Conviene resaltar que esta medida se refiere a la altura que alcanzó la planta que más se desarrolló entre todas las que formaban el *cluster* o grupo de plantas que surgían del inoculo inicial que se había aclimatado después de la fase de enraizamiento *in vitro*.

En esta fase de desarrollo, el número de brotes totales que forman el grupo o *clump* era de 3 en ambos genotipos y el número de hojas totales en el nuevo variante y en el parental era cercano a 25.

**Tabla 4.**- Características del *Spathiphyllum* "Núria" y "Prolífico" a los 9 meses de cultivo *in vivo* en pack A-60 y después de la fase de aclimatación.

VARIABLES	Núria	Prolífico
Número de brotes totales	3,24 $\pm$ 0,22	3,10 $\pm$ 0,35
Número de hojas totales	24,24 $\pm$ 1,11	25,90 $\pm$ 2,65
Altura total de la planta (cm)	18,04 $\pm$ 0,36	31,24 $\pm$ 0,88
Longitud de la primera hoja desarrollada (cm)	7,64 $\pm$ 0,17	13,31 $\pm$ 0,34
Anchura de la primera hoja desarrollada (cm)	1,61 $\pm$ 0,03	3,60 $\pm$ 0,13
Longitud del peciolo de la primera hoja desarrollada (cm)	6,84 $\pm$ 0,16	11,90 $\pm$ 0,61
Peso de la primera hoja desarrollada (mg)	335,57 $\pm$ 18,46	892,25 $\pm$ 145,62
Longitud de la segunda hoja desarrollada (cm)	7,00 $\pm$ 0,16	13,71 $\pm$ 0,40
Anchura de la segunda hoja desarrollada (cm)	1,77 $\pm$ 0,04	3,53 $\pm$ 0,10
Longitud del peciolo de la segunda hoja desarrollada (cm)	6,20 $\pm$ 0,14	12,28 $\pm$ 0,41
Peso de la segunda hoja desarrollada (mg)	332,16 $\pm$ 14,91	980,50 $\pm$ 105,30
Longitud de la tercera hoja desarrollada (cm)	6,92 $\pm$ 0,10	12,06 $\pm$ 0,41
Anchura de la tercera hoja desarrollada (cm)	2,12 $\pm$ 0,09	3,22 $\pm$ 0,08
Longitud del peciolo de la tercera hoja desarrollada (cm)	5,50 $\pm$ 0,12	9,01 $\pm$ 0,42
Peso de la tercera hoja desarrollada (mg)	282,54 $\pm$ 15,40	790,80 $\pm$ 82,81
Longitud de la cuarta hoja más desarrollada (cm)	6,05 $\pm$ 2,06	11,48 $\pm$ 0,09
Anchura de la cuarta hoja más desarrollada (cm)	2,06 $\pm$ 0,02	3,11 $\pm$ 0,05
Longitud del peciolo de la cuarta hoja más desarrollada (cm)	5,34 $\pm$ 0,15	7,73 $\pm$ 0,04
Peso de la hoja de la cuarta hoja más desarrollada (mg)	234,35 $\pm$ 18,73	589,00 $\pm$ 91,18

Fecha: julio de 1996

La forma de las hojas era idéntica en el "Prolífico" y el variante compacto pero el tamaño de las mismas era muy diferente en ambas plantas. Los valores correspondientes al tamaño de las cuatro primeras hojas desarrolladas del variante compacto eran casi la mitad de las del *Spathiphyllum* "Prolífico".

Estos valores, junto con el correspondiente a la altura de las plantas indican que el nuevo variante es una planta de tamaño mucho menor y hojas más pequeñas pero con el mismo número de hojas que el *Spathiphyllum* "Prolific". Estas características confieren al "Núria" un aspecto muy compacto y homogéneo que resulta muy atractivo y, al mismo tiempo, facilita la manipulación de las plantas a la hora de su cultivo bajo invernadero. Además, estas características facilitan su comercialización en formatos de pequeño tamaño tan de moda en estos últimos años en las redes comerciales españolas, holandesas y de otros países europeos. En general las plantas de pequeño formato facilitan el transporte y por su bajo precio tienen una gran aceptación por el consumidor.

En la tabla 5, se muestran las características vegetativas de los *Spathiphyllum* "Prolific" y del "Núria" después de dos años de crecimiento bajo invernadero. Las medidas se tomaron en noviembre de 1997. Hasta ese momento las plantas no habían producido aún ninguna de las flores tan características de la especie por lo que no se dispone de datos al respecto. De hecho, las características de estas flores (el tamaño y color de las espatas, el tipo de espádice y los pedúnculos florales) serían de gran interés de cara a una descripción más completa del nuevo cultivar. En nuestro caso, lo único que podíamos hacer fue volver a medir las características vegetativas de los dos cultivares y compararlos entre sí. Se observó una gran diferencia, sobre todo en los valores relativos a la altura total de las plantas. En el parental "Prolific" la altura era de 35,85±0,83 cm, mientras que en el variante compacto era de 21,28±0,77 cm. Las diferencias relativas en la altura de los dos genotipos se mantuvieron en el tiempo, ya que a los nueve meses el cultivar compacto era un 43,2% más bajo que el *S.* "Prolific" y a los dos años las plantas del variante compacto seguían siendo un 41% más pequeñas que las plantas del parental.

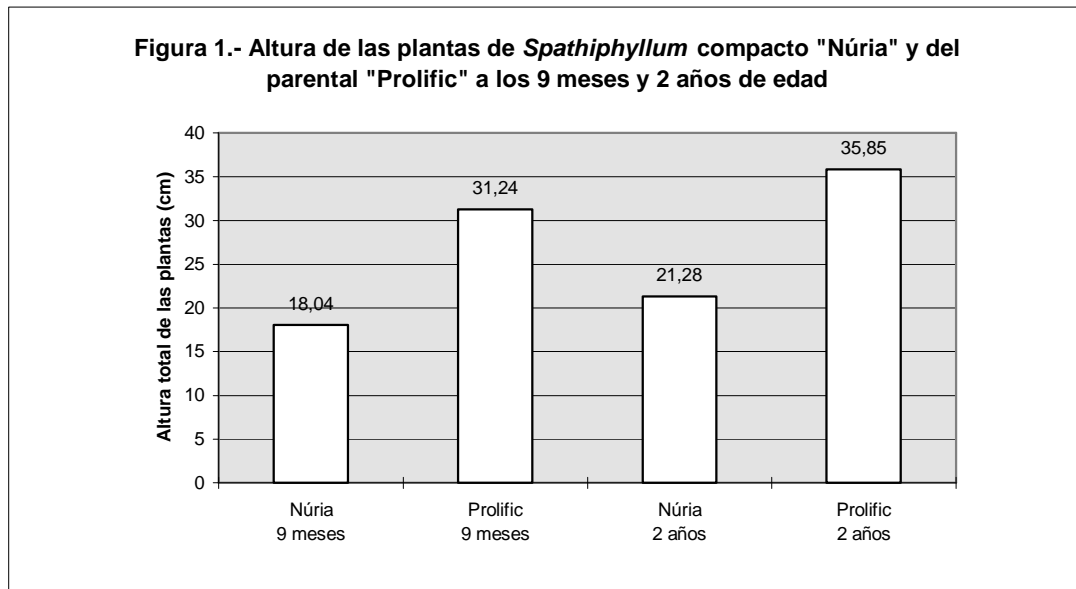
**Tabla 5.-** Características del *Spathiphyllum* "Núria" y "Prolific" a los dos años de cultivo bajo invernadero en maceta de 12 cm de diámetro.

VARIABLES	Núria	Prolific
Número de brotes totales	11,40±0,50	5,70±0,45
Número de hojas totales	92,20±5,62	45,70±2,53
Altura total de la planta (cm)	21,28±0,77	35,85±0,83
Longitud de la primera hoja desarrollada (cm)	10,53±0,44	33,08±1,21
Anchura de la primera hoja desarrollada (cm)	2,04±0,04	3,74±0,18
Longitud del peciolo de la primera hoja desarrollada (cm)	9,46±0,45	18,22±0,95
Peso de la primera hoja desarrollada (mg)	863,24±67,09	1,494±146
Longitud de la segunda hoja desarrollada (cm)	10,53±0,39	31,42±0,96
Anchura de la segunda hoja desarrollada (cm)	2,07±0,06	3,58±0,15
Longitud del peciolo de la segunda hoja desarrollada (cm)	9,25±0,38	17,15±0,68
Peso de la segunda hoja desarrollada (mg)	806,43±71,27	1380,00±91,35
Longitud de la tercera hoja desarrollada (cm)	10,92±0,37	29,04±1,17
Anchura de la tercera hoja desarrollada (cm)	2,13±0,06	3,59±0,15
Longitud del peciolo de la tercera hoja desarrollada (cm)	8,92±0,32	14,74±0,79
Peso de la tercera hoja desarrollada (mg)	813,89±61,28	1190,00±104,56
Longitud de la cuarta hoja más desarrollada (cm)	10,12±0,50	26,42±1,04
Anchura de la cuarta hoja más desarrollada (cm)	2,07±0,07	3,30±0,15
Longitud del peciolo de la cuarta hoja más desarrollada (cm)	8,31±0,21	13,13±0,64
Peso de la hoja de la cuarta hoja más desarrollada (mg)	763,31±71,72	1040±106,41

Noviembre de 1997

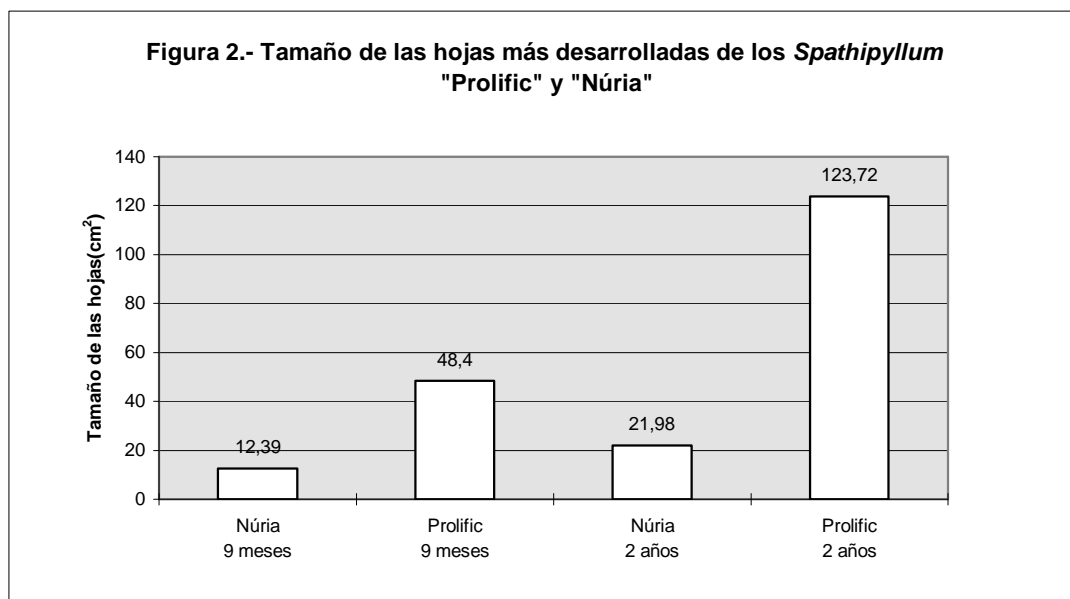
Si observamos los valores correspondientes a la altura total de los dos cultivares a los nueve meses y dos años de cultivo (tabla 4 y tabla 5) se comprueba que ninguno de ellos se desarrolló mucho en altura. En efecto, durante 1 año y tres meses de cultivo (periodo de tiempo comprendido entre ambas mediciones) el variante compacto "Núria" sólo creció 3,24 cm y el parental "Prolific" 4,61 cm.(fig. 1). En realidad, esto es natural ya que los *Spathiphyllum* son plantas de porte erguido en las que sus hojas se desparraman de dentro hacia afuera formando

arcos que caen hacia abajo y, además, los peciolos que soportan las hojas nacen de un tallo corto en el que las distancias internodales son muy pequeñas. Por consiguiente, los *Spathiphyllum* se desarrollan más a lo ancho que a lo alto.

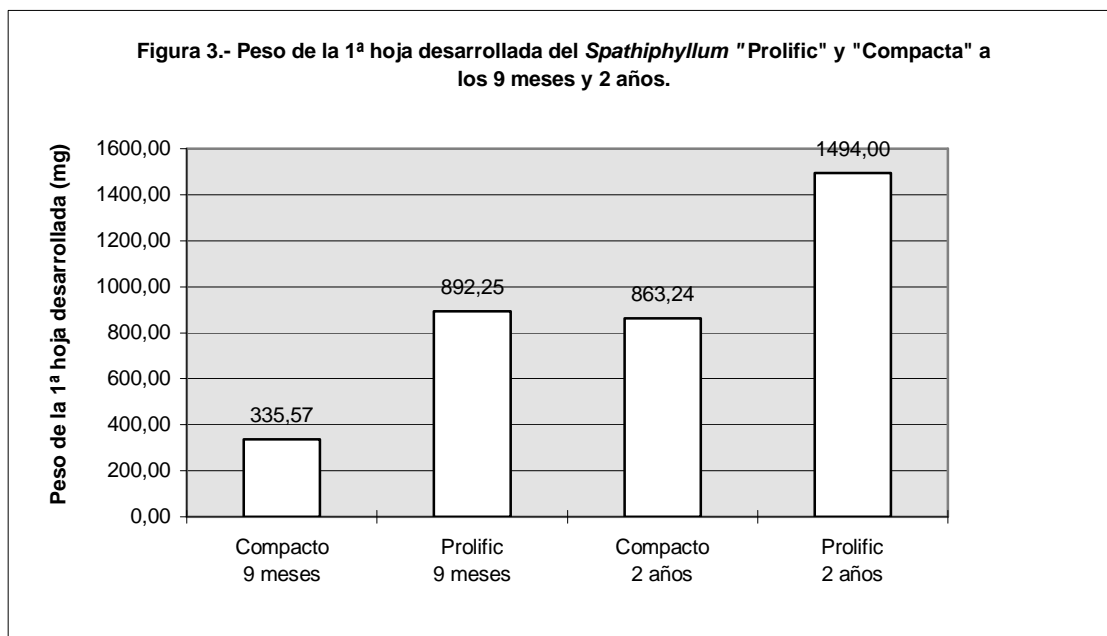


Donde sí observamos grandes diferencias fue en el tamaño de las cuatro primeras hojas desarrolladas: el variante compacto desarrolló hojas de tamaño más pequeño que las del su parental. Si estimamos el área de la hoja multiplicando su longitud por su altura, la hoja más desarrollada del "Prolific" tiene una superficie de 123,72 cm<sup>2</sup> y la del compacto tan solo 21,98 cm<sup>2</sup>. Es decir, las hojas del "Núria" son un 84,64% más pequeñas que las del parental "Prolific" (figura 2).

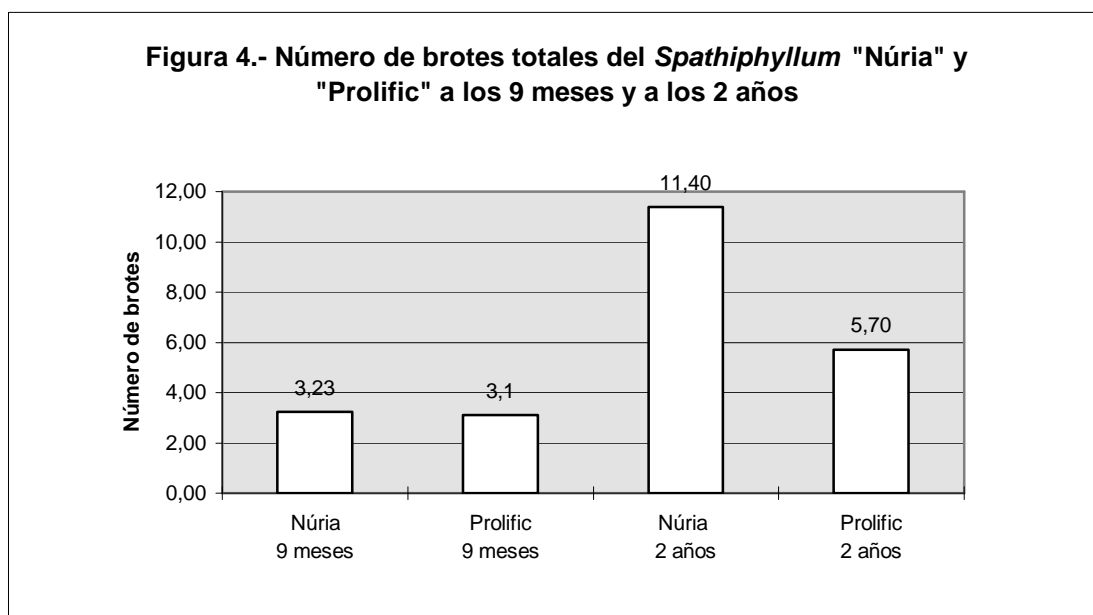




La comparación del peso total de las cuatro primeras hojas desarrolladas de los dos cultivares mostró grandes diferencias entre ambos. La primera hoja desarrollada (que era la más pesada) pesaba 863,24±67,09 mg en el "Núria" y 1.494±146 mg en el "Prolific" (figura 3).



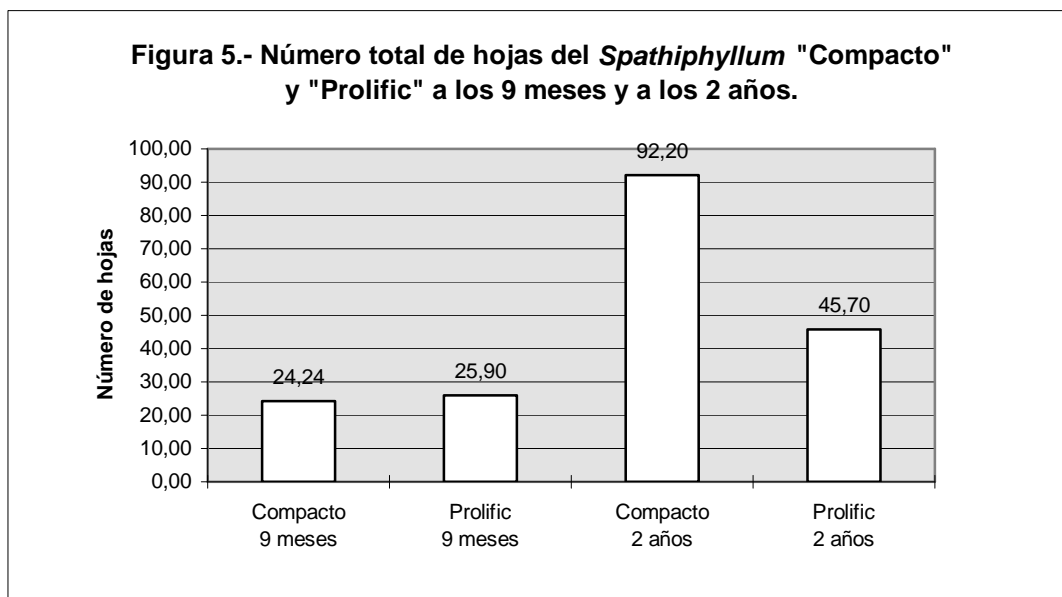
Durante el periodo de tiempo comprendido entre los primeros nueve meses de cultivo y los dos años de permanencia en el invernadero se produjeron muchas diferencias en el número de brotes totales y el número de hojas totales (figuras 4 y 5 respectivamente). El número de brotes por inóculo aumentó mucho en el "Núria" (11,4 brotes) con respecto al "Prolific" (5,7).



Si observamos la evolución de las plantas a lo largo del tiempo vemos que el variante "Núria" pasó de 3,24 brotes totales a los seis meses a 11,40 brotes a los dos años de cultivo. Los valores correspondientes al "Prolific" oscilaron entre 3,10 $\pm$ 0,35 a los 6 meses y 5,70 $\pm$ 0,45 brotes a dos años de cultivo. Esto parece indicar que el callo que se produjo durante la fase de multiplicación del nuevo variante compacto tenía una mayor capacidad organogénica y una mayor facilidad para emitir nuevos brotes que el parental.

El número de brotes es directamente proporcional al número de hojas; así a los 2 años, el nuevo variante compacto tenía 92,20 $\pm$ 5,62 hojas mientras que el "Prolific" sólo tenía 45,70 $\pm$ 2,53.

Si calculamos el cociente entre el número de hojas totales y el número de brotes de los dos cultivares resulta que, en ambos casos, el número de hojas por brote es de aproximadamente 9. Esto parece indicar que el ritmo de crecimiento y de producción de hojas a lo largo del tiempo en cada brote es muy parecido en ambos cultivares, pero en realidad no es así, ya que los datos que se reflejan en las dos tablas siguientes muestran que cada brote (al ser considerado como una planta individual) tiene un número de hojas que puede variar mucho y que aumentará a medida que aumenta la altura de la planta o de cada brote.



Efectivamente, en la tabla 6 se indican las características de cada uno de los brotes del cv. "Prolific" (considerados como una única planta individualizada) que formaban parte y/o surgían del callo inoculado en el momento de la transferencia al medio de enraizamiento. La tabla 7 muestra las mismas características que la tabla anterior, pero para el nuevo variante compacto "Núria" de *Spathiphyllum*.

Vemos que el número de plantas o brotes que forman el nuevo variante es de 11, mientras que el parental "Prolific" está compuesto por tan solo 6 plantas. Hay que resaltar que, en ambos casos, las plantas señaladas con el número 1 eran las que consideramos más representativas y las más desarrolladas (sus medidas se correspondían con las de las tablas 4 y 5, respectivamente).

Los datos de las tablas 6 y 7 indican que hay una variación notable entre los brotes de una misma planta, tanto en lo que respecta a la altura del brote como al tamaño de la hoja. Aun así, cuando se comparan los brotes respectivos de la planta de cada cultivar resulta patente la menor altura y menor tamaño de las hojas del variante "Núria" con respecto al parental "Prolific". Estas características, unidas al mayor número de brotes por planta, le confieren al nuevo variante un aspecto muy compacto.



**Tabla 6.-** Características de los brotes individuales que surgen del mismo callo inoculado originalmente en el medio de cultivo correspondiente a la fase de enraizamiento y que forman una planta seleccionada al azar del *Spathiphyllum* “Prolific”, a los dos años de cultivo bajo invernadero en maceta de 12 cm de diámetro.

				Primera hoja desarrollada				Segunda hoja desarrollada				Tercera hoja desarrollada				Cuarta hoja desarrollada			
	Peso (g)	Altura (cm)	Número de hojas	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)
<b>Brote 1</b>	29,7	36,0	15	32,5	3,8	1,524	19,1	31,6	3,4	1,610	19,4	30,3	3,6	1,510	18,6	28,5	3,3	1,350	13,2
<b>Brote 2</b>	3,7	27,2	7	12,6	2,7	0,659	14,5	11,4	2,5	0,613	13,5	10,8	2,8	0,506	9,2	8,6	2,6	0,339	7,7
<b>Brote 3</b>	3,1	26,1	6	11,2	2,4	0,687	14,6	10,8	2,8	0,605	12,2	8,0	2,4	0,527	7,2	9,2	2,7	0,372	11,0
<b>Brote 4</b>	2,4	23,2	6	10,4	2,5	0,571	13,2	10,5	2,5	0,477	10,3	9,0	2,3	0,395	7,4	7,4	2,1	0,290	5,9
<b>Brote 5</b>	1,3	18,5	5	7,8	1,9	0,339	10,0	6,9	1,8	0,212	7,2	5,9	1,8	0,159	5,6	4,7	1,7	0,121	3,4
<b>Brote 6</b>	0,5	12,6	5	5,1	1,7	0,173	6,1	5,6	1,4	0,092	7,0	4,3	1,9	0,082	4,5	3,9	1,2	0,070	2,9

**Tabla 7.-** Características de los brotes individuales que surgen del mismo callo inoculado originalmente en el medio de cultivo correspondiente a la fase de enraizamiento, y que conforman una planta seleccionada al azar del nuevo variante compacto “Núria” a los dos años de cultivo bajo invernadero en maceta de 12 cm de diámetro.

				Primera hoja desarrollada				Segunda hoja desarrollada				Tercera hoja desarrollada				Cuarta hoja desarrollada			
	Peso (mg)	Altura (cm)	Número de hojas	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)	Altura (cm)	Anchura (cm)	Peso (g)	L. peciolo (cm)
<b>Brote 1</b>	12,0	23,4	13	12,2	3,1	0,863	12,2	11,9	2,1	0,765	12,6	11,9	2,0	0,802	14,2	13,0	1,9	0,750	13,2
<b>Brote 2</b>	9,4	23,6	11	11,4	2,4	0,850	12,0	11,5	2,5	0,665	12,8	12,1	2,1	0,750	12,1	12,2	2,1	0,625	12,2
<b>Brote 3</b>	7,5	21,1	11	9,4	1,8	0,451	10,3	10,7	2,1	0,476	13,5	10,8	1,75	0,516	13,2	10,3	2,2	0,653	12,7
<b>Brote 4</b>	7,0	20,1	12	10,1	1,9	0,352	11,2	10,2	1,75	0,457	11,2	10,1	1,70	0,471	11,5	10,1	1,9	0,456	9,8
<b>Brote 5</b>	5,2	18,3	7	9,4	2,4	0,489	8,7	8,6	2,0	0,382	8,0	9,5	2,3	0,404	9,1	9,1	2,15	0,358	8,5
<b>Brote 6</b>	3,1	16,4	9	7,2	2,0	0,228	8,0	7,5	1,4	0,397	8,3	7,9	1,7	0,403	7,9	6,5	1,6	0,322	5,8
<b>Brote 7</b>	1,1	13,9	8	5,1	1,5	0,168	7,5	5,0	1,2	0,241	7,9	4,1	1,1	0,165	5,1	2,5	0,9	0,102	4,3
<b>Brote 8</b>	1,05	12,3	5	5,1	1,4	0,150	6,6	5,1	1,1	0,189	6,8	4,7	1,2	0,150	5,6	3,2	1,2	0,120	4,5
<b>Brote 9</b>	1,0	12,0	6	5,0	1,3	0,136	4,3	5,2	1,2	0,142	6,5	5,0	1,3	0,134	6,2	4,5	1,65	0,148	5,7
<b>Brote 10</b>	0,256	9,1	4	4,0	1,15	0,082	4,1	3,6	1,35	0,076	3,1	2,5	1,05	0,044	2,3	1,7	0,95	0,025	1,8
<b>Brote 11</b>	0,154	4,4	4	2,0	0,65	0,060	3,1	1,2	0,7	0,043	1,8	1,5	0,4	0,031	1,6	-	-	0,010	-

En la tabla 7 se observa también que en la planta seleccionada al azar del variante compacto había cuatro brotes muy similares en tamaño, que eran las que más se habían desarrollado (brotes 1, 2, 3 y 4); otros cinco brotes más pequeñas pero que no desentonaban con respecto a los primeros, (brotes 5, 6, 7, 8 y 9); y por fin, los brotes 10 y 11, mucho más pequeños pero muy importantes en cuanto a su participación en el aspecto general de la planta, ya que visten la base de la planta y, al mismo tiempo, proporcionan una sensación de compacidad que le falta al *Spathiphyllum* “Prolific”.

## **Resumen**

### **“Núria”**

El variante “Núria” se identificó en un lote de plantas de *Spathiphyllum* “Prolific” después de la fase de aclimatación. No se pudo detectar en ninguna de las etapas previas de cultivo *in vitro* porque durante estas fases no exhibe diferencias apreciables frente al parental. Se trata de un cultivar homogéneo y uniforme; con las hojas más pequeñas que las del parental y con un mayor número de hojas y brotes (que surgen del callo basal) que el parental. Se propaga fácilmente siguiendo métodos de cultivo *in vitro* y no presenta problemas especiales durante la etapa de aclimatación. Así pues, es una planta susceptible de ser multiplicada a gran escala y puede tener cierto interés económico en el sector de la planta ornamental.

Los rasgos que distinguen al “Núria” del parental “Prolific” son:

- 1.- La altura de la planta es bastante menor en el nuevo variante compacto que en el *Spathiphyllum* “Prolific”.
- 2.- El número de brotes y hojas es mucho mayor en el “Núria” que en el parental.
- 3.- El tamaño de la hoja del nuevo variante “Núria” es significativamente más pequeño que el del “Prolific”.

En conjunto, estas características confieren un gran atractivo al nuevo cultivar compacto que puede llamar la atención del consumidor.

### **Descripción del “Núria”**

**Propagación:** Se propaga sin ningún problema en cultivo *in vitro*. De hecho, hablar de *Spathiphyllum* es hablar de cultivo de tejidos ya que la mayoría de los *Spathiphyllum* que se encuentran en el mercado se propagan mediante el cultivo *in vitro*. También se podría realizar la propagación por esquejado aunque el producto obtenido por este método suele ser poco uniforme y homogéneo.

**Planta:** Se trata de una planta de porte erecto cuyas hojas se desparraman de dentro hacia afuera. Los brotes nacen de la parte basal del tallo que es corto y nunca ramifica a pesar de que tiene unas yemas laterales cuyo desarrollo está inhibido por la fuerte dominancia que presenta la yema apical. Son plantas que producen gran número de hojas y que además, también producen unos espectaculares espádices de color blanco.

**Crecimiento:** Uniforme y compacto

### **Hojas:**

- **Forma:** De elipse. La razón entre la longitud y la anchura es de tres
- **Tamaño:** (A los 2 años): 2,5 cm de anchura y 10 cm de longitud
- **Margen:** Ondulado
- **Aspecto:** Suave al tacto, opacas y brillantes
- **Textura:** Lisa
- **Pecíolo:** Rrobusto y terso
- **Venas:** Muy finas. La central más marcada
- **Color:** Verde brillante intenso. El mismo que el “Prolific”





(A) Plantas de *Spathiphyllum* "Prolific" (1) y del variante "Núria" (2) tras la fase de aclimatación. (B) Plantas del parental (1) y del variante "Núria" (2) después de seis meses de cultivo en maceta de 7 cm de diámetro. Brotes obtenidos de una planta de dos años de edad; (C) parental "Prolific" y (D) variante "Núria". (E) De izquierda a derecha, planta del variante "Núria" y del parental "Prolific". (F) Vista frontal del parental "Prolific" (izquierda) y del variante "Núria" (derecha).



**VII.- Variación somaclonal en *Syngonium***



## Introducción.-

El género *Syngonium* pertenece a la familia de las *Aráceas* del orden de las espatifloras. La familia Araceae está integrada por plantas herbáceas vivaces, rizomatosas o tuberosas, a veces arbustivas o arborescentes, o por bejucos, con hojas, las más de las veces grandes. Las especies son monoicas o más raramente dioicas, de frutos por lo común en baya. Las semillas son bitegumentadas, con el tegumento externo carnoso. Comprende alrededor de 1800 especies, en su mayoría intertropicales. Los géneros principales son: *Syngonium*, *Anthurium*, *Acorus*, *Monstera*, *Calla*, *Dracontium*, *Amorphophallus*, *Philodendron*, *Zantedeschia*, *Colocasia*, *Caladium*, *Xanthosoma*, *Arum*, *Dracunculus*, *Pistia*, etc. Esta familia incluye una gran cantidad de plantas verdes tropicales, con tallo carnoso y otras con raíces trepadoras. Las hojas tienen formas variadas y variables. Las plantas se caracterizan por producir inflorescencias compuestas o espádices, densamente floridas, y que se sustentan por una llamativa espata o bráctea, a menudo coloreada. Poseen una fuerte dominancia apical, y contiene un gran número de especies ornamentales que destacan por sus hojas duraderas y su porte elegante.

El *Syngonium* está estrechamente relacionado con los *Philodendron* trepadores y, como ellos, necesita calor, aire húmedo y protección de la luz del sol. La planta adulta produce raíces aéreas, y un soporte excelente para esta atractiva planta trepadora es una columna de musgo como tutor.

Una característica curiosa del *Syngonium* es el espectacular cambio de forma de las hojas al envejecer la planta. Las hojas jóvenes tienen forma de flecha y se sostienen sobre peciolos erectos. Entonces, el jaspeado de las hojas es más acentuado y brillante. Con la edad, los tallos se vuelven trepadores y necesitan soporte; al mismo tiempo las hojas se vuelven lobuladas. La forma juvenil se puede conservar suprimiendo, cuando aparecen, los tallos trepadores (Hessayon, 1982).

Las variedades<sup>22</sup> de *Syngonium* más conocidas son las siguientes:

**Auratum.** (*Philodendron auritum*) (Jamaica) “**Five Fingers**”: trepador con hojas carnosas, suculentas, de color verde mate o terso y con 3-5 lóbulos Pueden llegar a medir hasta 25 cm de longitud y los peciolos tienen forma de vagina.

---

<sup>22</sup> Tomado de: Exotica 3: Pictorial encyclopedia of exotic plants. Guide to care of plants indoors. Graf, A.B. Century, 1970.

**Auratum “Fantasy”** (Jamaica); atractivo cultivar con sus hojas tersas verde oscuro, piel carnosas, hojas compuestas irregularmente variegadas, de color verde plateado que se vuelve blanco en la madurez; el lóbulo central, flanqueado por dos pequeños lóbulos basales puede llegar a medir de 15 a 20 cm; el robusto peciolo en forma de vagina, forma ángulo hacia el ápice, y con rayas de color crema.

**Erythrophyllum** (Panamá); planta enredadera delicada con pequeñas hojas cerosas, en forma de flecha y con dos lóbulos basales en forma de oreja; hoja de color verde cobrizo metálico y recubierta con minúsculos puntos de color rosa plateado; envés rojizo y con las hojas maduras trifoliadas.

**Hoffmannii** (Centro América); planta trepadora muy atractiva, con las hojas jóvenes en forma de flecha, de color pardo verdoso, mate, y con las venas y el área central de las hojas de color plateado.

**Macrophyllum** (México a Panamá); trepadora con grandes hojas carnosas, en forma de corazón, de color verde esmeralda; aterciopeladas y que se dividen en la madurez; las hojas son mucho más grandes que en el *podophyllum*.

**Mauroanum** (Costa Rica); especie robusta con hojas arrugadas en forma de flecha, de color verde metálico que cambian a color verde oscuro en la madurez; variegadas de color plata cremoso a lo largo de la vena central y de las venas laterales.

**Podophyllum** (*Nephtytis libérica*) (México a Costa Rica); en la etapa juvenil es una pequeña planta con las hojas en forma de flecha, de hojas finas y verdes sobre delgados peciolos, más tarde comienza a emitir rastras; en etapas sucesivas las hojas se vuelven lobuladas y luego palmeadas, divididas en 5-9 segmentos.

**Podophyllum albolineatum** (*angustatum*) (México, Nicaragua); conocida comercialmente como *Nephtytis triphylla*; Las hojas juveniles tienen forma de corazón, con tres lóbulos; muy ornamental y con las venas y el área central de las hojas de color plateado; las hojas maduras, palmeadas, son verdes.

**Podophyllum albolineatum “Dot Mae”**; se trata de un cultigen con hojas de carácter juvenil más anchas y con las hojas más atrevidamente marcadas que las otras variedades de la especie.

**Podophyllum albolineatum “Ruth Fraser”**; es una selección hortícola que muestra una mejora distinta en la variegación sobre el tipo salvaje; la variegación también dura más tiempo.

**Podophyllum “Albo-virens”**; un mutante con finas hojas astadas, de color marfil a blanco verdoso, y con el borde de las hojas de color verde.

**Podophyllum “Atrovirens”**; variedad con las hojas juveniles en forma de arpón o lobuladas, y con las áreas cercanas a las venas que van desde el color verde ceniza al crema sobre un fondo verde oscuro.

**Podophyllum “Emerald Gem”**; con las hojas juveniles en forma de flecha, más carnosas, verde oscuro y lustrosas; los peciolos son más cortos, lo que les da una apariencia más compacta y empieza más pronto a trepar.

**Podophyllum “Imperial White”**. Es un mutante del “Green Gold”, más compacto, con las hojas juveniles en forma de flecha, muy brillantes; de un color blanco verdoso y con un estrecho borde verde, que se vuelve muy marcado con el tiempo.

**Podophyllum “Tricolor”** (Costa Rica); mutante con finas hojas y juveniles en forma de arpón y trilobuladas. Las hojas son de color verde claro con una variegación marfil sobre un fondo verde oscuro.

**Podophyllum “Trileaf Wonder”**; es un cultigen con una cantidad variable de color verde ceniza en las hojas, principalmente en la zona de la vena central y en los laterales; las hojas maduras, segmentadas, se producen más rápidamente.

**Podophyllum xanthophyllum** (México); La planta cultivada “Green Gold” pertenece, probablemente, a esta especie; las formas juveniles, en forma de saeta, son jaspeadas con un color verde amarillento y peciolos largos; en los estadios sucesivos las hojas se vuelven más claras y doradas en la zona central, para volverse verdes con las venas blancas en la madurez.

En general, el tallo, más bien corto y nunca ramificado, contiene yemas axilares que se mantienen siempre en estado latente. En condiciones óptimas los tallos se alargan y la disponibilidad de yemas axilares es, entonces, mayor.

**Triphyllum “Lancetilla”** (Honduras, Costa Rica); en la etapa juvenil las hojas, desiguales, son de color verde oscuro, erectas y ovaladas; más tarde desarrollan 3 lóbulos.

**Wendlandii** (Costa Rica); planta trepadora delicada y con hojas tri-lobuladas, profundamente verdes y aterciopeladas en agudo contraste con las venas en las hojas juveniles; en la etapa de división, las hojas son verdes.

Algunos cultivares de *Syngonium podophyllum* se usan ampliamente como plantas ornamentales de interior. Las plantas procedentes de cultivo de tejidos tienen, generalmente, una apariencia más densa y más homogénea que las plantas obtenidas por esqueje. A pesar de que los propágulos procedentes de cultivo de tejidos son fácilmente disponibles, es muy común entre los cultivadores usar esquejes de tallo con un nudo para su propagación. Un problema habitual es la falta de desarrollo de brotes laterales durante las primeras etapas del desarrollo, por tanto hay que poner un gran número de esquejes en cada maceta para tener más brotes, lo que aumenta substancialmente los costos de producción (Wang y Boogher, 1987).

Como puede verse en la tabla siguiente, en Europa hay un gran número de laboratorios comerciales que propagan el *Syngonium* a gran escala mediante el cultivo de tejidos, ya que se trata de una planta muy apreciada por los consumidores. Su consumo es muy elevado y los resultados obtenidos en lo que se refiere al vigor y uniformidad de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* hacen que, en la actualidad, la práctica totalidad de las plantas de *Syngonium* que se comercializan en todo el mundo provengan de la micropropagación.



<b>Tabla 1.- Número de laboratorios de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales que multiplica a gran escala plantas de <i>Syngonium</i> en Europa.</b>		
<b>Países</b>	<b>1990</b>	<b>1993</b>
Bélgica	4	4
Suiza	3	2
República checa	-	1
Alemania	4	1
España	5	6
Francia	5	1
Grecia	3	5
Italia	9	8
Holanda	4	3
Suecia	1	1
Finlandia	2	1
Hungría	-	4
Eslovaquia	-	2
Noruega	1	1
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>39</b>

Tomado del Directory of European Plant Tissue Culture Laboratories. Ediciones 1990 y 1993. Commission of the European Communities.

### **Cultivares más conocidos.-**

Entre los años 1990 y 1993 las variedades comerciales más importantes, eran: *Syngonium auritum*, los cultivares del *Syngonium podophyllum* “Imperial Gold”, “Infra Red”, “Green Gold” y “White Butterfly” y el *Syngonium xanthophyllum* “Green Gold”. De todos ellos el que más se cultiva con fines comerciales es, sin duda, el “White Butterfly”

Durante bastante tiempo la variedad “White Butterfly” ha sido la más ampliamente propagada y decir *Syngonium* era equivalente a decir “White Butterfly”, y a la inversa. Actualmente disponemos de muchas posibilidades, ya que ha aumentado el número de cultivares que se comercializan, porque el mercado demanda nuevos tipos y más variación de productos donde el consumidor pueda elegir. Así pues las variedades que se pueden encontrar con más frecuencia en el mercado actual<sup>23</sup> son:

**“White Butterfly”**: antes era la más popular. Las hojas jóvenes son de color verde pálido con venas blancas y cuando la hoja es madura es de color verde plateado con un reborde verde.

Tiene mucha tendencia a emitir rastras y por ello se emplean sobre todo para tutores ( en éstos las hojas de la parte alta del tutor son, con frecuencia, totalmente verdes). En condiciones de temperatura alta y humedad baja, los entrenudos se alargan mucho, afeando el aspecto de la planta.

**“Patricia”**: atendiendo al color de la hoja es realmente un “White Butterfly”, pero es mucho más compacto, con entrenudos más cortos y con poca tendencia a emitir rastras; es ideal para cultivar en tarrinas y poco apropiado para tutores.

**“Robusta”**: es la variedad que más se está extendiendo para cultivo en tarrinas, debido a lo compacto de su aspecto y al contraste entre el verde esmeralda intenso de la hoja y el blanco marfil de las venas.

**“Silver”**: su nombre refleja el color verde plateado de sus hojas. El verde de las mismas es más intenso que en el caso del “White Butterfly” y el aspecto de la hoja es realmente llamativo. Emite rastras, pero es más compacto y tiene los entrenudos más cortos, por ello puede emplearse tanto para producir tarrinas como tutores.

**“Pixie”**: se trata de una variedad enana para tarrinas de pequeño tamaño. Es muy compacto. Tiene la hoja redondeada y su color recuerda al “Robusta”. Debido a lo compacto de su aspecto, parece que crece más lentamente que las otras variedades, pero da lugar a tarrinas muy espectaculares

Estas variedades de reciente aparición tienen, probablemente, su origen en el cultivo *in vitro* como nuevos variantes somaclonales, aunque no hay referencias bibliográficas que certifiquen este hecho. En el sector de las plantas ornamentales era, hasta hace poco tiempo, muy difícil encontrar publicaciones que se ocuparan en describir estas nuevas variedades obtenidas por variación somaclonal, sobre todo en el campo de las plantas de interior apreciadas por sus hojas y no por sus flores. Sin embargo, si nos fijamos en el gran incremento del número de variedades que se comercializan desde un tiempo a esta parte, es de suponer que en los distintos laboratorios comerciales que producen *Syngonium* ha habido interés en la obtención y selección de nuevas variedades de plantas mediante la selección somaclonal. Como en estos laboratorios privados el objetivo fundamental es producir y vender la planta lo más

---

<sup>23</sup> Tomado de: Planta ornamental. Variedades para micropropagación. 1996. *Horticultura* 116 pp 73-76.

rápidamente posible, y no su publicación en revistas técnicas, en muchos casos nos encontramos con variantes ya disponibles para su comercialización sin ni siquiera saber su origen.

Las nuevas variedades que se pueden encontrar en los principales mercados de plantas ornamentales se pueden clasificar, según sus características, en dos grandes grupos. El primero lo componen aquellos cultivares que emiten rastras muy pronto, al año aproximadamente, y que, por tanto, presentan un formato comercial como planta entutorada con una altura que oscila entre 1 y 2 metros. Entre los cultivares más destacados de este primer grupo se pueden citar el “White Butterfly”, el “Butterfly” y el “Jenny”. El segundo grupo está constituido por las plantas de aspecto más compacto y que no emiten rastras, por lo que su formato, en tarrina, es adecuado como centro de mesa o planta colgante. Las variedades más destacadas son: “Pixie”, “Robusta”, “Silver” y “Arrow”. Las plantas que forman este grupo suelen tener un tamaño de hoja más pequeño. Todas estas variedades pueden distinguirse entre sí por las distintas tonalidades de verde en las hojas o por los diferentes tipos de variegación de las mismas.

En el caso concreto de los *Syngonium*, las variedades de reciente aparición no están, en su mayor parte, protegidas y es fácil para cualquier productor su reproducción, cultivo y comercialización. Este hecho puede deberse a la reticencia, por parte de los obtentores, en patentar las nuevas variedades de plantas de interior de maceta. En la mayoría de los casos, mantener una patente en distintos países y durante años es muy caro y, tal vez, no compensa la protección de una planta si tampoco hay garantías de que el control sobre su propiedad sea fiable y estricto. Por este motivo hasta este momento, en nuestro sector es muy fácil copiar una planta de interés y reproducirla, debido a la falta de vigilancia sobre la cantidad de plantas que se producen, la escasez de medidas de protección sobre las nuevas variedades que se lanzan en los mercados -ya que los puntos de venta al consumidor son también incontrolables (mercados ambulantes, tiendas de todo a cien, etc...)- y a que el origen del material vegetal es muchas veces, desconocido. En resumen, se trata de un mercado al que se podría calificar de poco serio.

#### **Nuevas características deseables.-**

Una de las características que pueden ser de gran interés en el caso del *Syngonium*, así como en otras muchas especies de plantas ornamentales de maceta, es un hábito de crecimiento que proporcione a la planta un aspecto compacto. Es frecuente el uso, por la mayor parte de los viveristas del sector, de algunos reguladores de crecimiento u otros productos enanizantes para

obtener productos más ramificados y compactos y con mayor número de brotes. Su utilidad se basa en la tendencia del consumidor de adquirir este tipo de productos más compactos, con más hojas y, en definitiva, con un mayor valor estético.

El cultivar “White Butterfly” es una de las plantas ornamentales más cultivadas en el mundo y el formato utilizado es, dada su tendencia a emitir rastras, el de planta entutorada. El tutor es una columna de musgo de alrededor de 1,5 metros donde se van atando, a medida que crecen, las rastras que produce y donde, además, se insertan las raíces aéreas que surgen del tallo. Este tipo de cultivo es muy laborioso y requiere una gran cantidad de mano de obra y muchos cuidados específicos. Los tratamientos con enanizantes no son del todo efectivos en estos casos, en los que hay una fuerte dominancia apical, y no suelen hacerse los pinzamientos en la yemas apicales ya que las plantas pierden mucho valor ornamental.

Un patrón de crecimiento más compacto es, pues, de gran interés para el productor y el consumidor, siempre y cuando las hojas sean lo suficientemente atractivas y grandes como para que estas plantas, de forma más redondeada, puedan usarse como centros de mesa o como plantas colgantes.

Ya existen, en el mercado, diversas variedades de *Syngonium* de tipo compacto. Se diferencian entre ellas por el tipo de variegación, las tonalidades de verde en las hojas, el tamaño de las mismas, la altura de la planta, el número de brotes o ramales, o incluso por el tiempo que tarda en comenzar a emitir rastras, y en consecuencia, la susceptibilidad que tienen en convertirse en plantas de tutor.

## **Materiales y métodos.-**

### **Material vegetal y métodos para el cultivo *in vitro*.-**

El *Syngonium* “Selecta” se detectó en un lote de plantas procedentes de líneas organogénicas obtenidas a partir de yemas apicales del *Syngonium podophyllum* “White Butterfly”. Las yemas apicales se implantaron *in vitro* en febrero de 1995 y, tras 13 subcultivos (cada 4-6 semanas), apareció una planta de fenotipo más compacto, que se identificó y

seleccionó en la fase de aclimatación, y que luego se propagó en cultivo *in vitro* siguiendo procedimientos estándar.

Se tomaron puntas terminales de unos 5 cm de longitud que contenían la yema apical y se desinfectaron en una solución de hipoclorito sódico (lejía comercial de 50 g/l de cloro activo) al 1,6 % durante 20 minutos, a la que se añadieron 2 gotas/100 ml de Tween 20. Después de tres lavados en agua destilada estéril (5- 10 min.) cada uno, se eliminaron las hojas preexistentes y se aisló la yema apical, junto con la menor cantidad de tallo posible. Los ápices desinfectados se inocularon en tubos de ensayo de vidrio de 25x150 mm con tapones de polipropileno (Bellco), que contenían 15 ml de medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado, tanto para el establecimiento de las yemas apicales como para su multiplicación y la posterior propagación del nuevo variante, era una modificación de uno de los medios propuestos por Scaramuzzi & Imbo (1984). Consistía en las sales minerales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962); 30 g/l de sacarosa; 7 g/l de agar-agar (agar industrial Pronadisa), 0,3 mg/l de IAA y 3 mg/l de BAP. El pH se ajustó a 5,7 mediante la adición de unas gotas de KOH 1N. Los recipientes con el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 23±2 °C bajo una intensidad luminosa de 1500 lux durante todas las fases, tanto de iniciación, como de multiplicación y enraizamiento (proporcionada por tubos fluorescentes Osram del tipo “luz día”). El fotoperíodo era de 16 horas luz/8 horas oscuridad.

Los frascos de cultivo utilizados para las etapas de multiplicación y enraizamiento eran del modelo B-60 de Vicasa, de 400 ml de volumen, de vidrio y con la tapa de rosca de PVC. Cada frasco contenía unos 80 ml de medio de cultivo. En cada recipiente se introducían 10-12 inóculos en la fase de multiplicación y 40-50 en la fase de enraizamiento.

Los inóculos empleados en la fase de multiplicación se habían desarrollado después de varios subcultivos a partir de los ápices establecidos *in vitro* en la fase de iniciación. El callo organogénico que se había formado se subdividía en varios trozos de 1-2 cm<sup>2</sup>, que se utilizaban como inóculos en sucesivas fases de multiplicación. Después de cada subcultivo de 4-6 semanas, los inóculos originaban una gran cantidad de brotes que se individualizaban o se

cortaban en pequeños grupos para su posterior subcultivo en el medio de enraizamiento *in vitro*, a fin de obtener plantas totalmente enraizadas y aptas para su aclimatación *in vivo*.

El medio de enraizamiento consistía en los macroelementos (diluidos a la mitad) los microelementos (completos) y las vitaminas de Murashige y Skoog, 20 g/l de sacarosa, 2 g/l de carbón activo, 7 g/l de agar industrial y 3mg/l de IAA. El pH del medio y el método de esterilización fueron los mismos que para la fase de multiplicación..

### **Aclimatación del material vegetal.-**

Las plantas enraizadas *in vitro* durante 3- 4 semanas se trasplantaban a packs de 60 celdillas de 4 cm de lado. El sustrato utilizado era una mezcla de turba, perlita y arena en una relación 3:1:1. La aclimatación de las nuevas plantas a condiciones normales de crecimiento tenía lugar en invernadero, bajo túnel de plástico que proporcionaba un nivel de sombra adecuado, con frecuentes aplicaciones de agua en forma micronizada o vaporizada (*mist system*) para mantener un alto nivel de humedad permanente alrededor de la planta, y con calefacción por medio de cama caliente, durante las dos primeras semanas.

Durante los primeros días de la fase de aclimatación, las plantas no recibieron ningún tipo de fertilización aunque sí tuvieron una serie de tratamientos antifúngicos preventivos a base de Benlate (0,8 g/l) y Captán (1-2 g/l), para evitar la proliferación de hongos en las condiciones de cultivo de alta temperatura, alto contenido en humedad y ambiente confinado, lo que puede ocasionar una gran mortandad entre las plantas que se encuentran en la delicada fase de aclimatación.

Una vez superada esta etapa, las plantas se trasladaban a otras bancadas para continuar su crecimiento en las condiciones estándar de cultivo bajo invernadero con refrigeración por apertura cenital. El invernadero en el que se cultivaban las plantas era del tipo prefabricado de placa ondulada y cubierta de PVC, de apertura automática regulada por las oscilaciones térmicas y bajo calefacción en las propias bancadas por el sistema de cama caliente y por quemadores de gas natural en el ambiente. Las temperaturas límite frente a las que se encontraban las plantas oscilaron entre los 35°C, en la época de más calor, y los 15°C, en las noches más frías del invierno. Estos límites de temperaturas entran dentro de los tolerados para el cultivo de todas las especies de *Syngonium*.

La luminosidad que tenían las plantas fluctuó con la época del año, dependiendo de las horas de insolación diarias y de la intensidad. La humedad relativa en el invernadero era elevada (alrededor del 60%), pero lejos de la saturación, lo que es beneficioso para las plantas ya que son muy sensibles a las condiciones de alta humedad, en las que muestra graves problemas por asfixia.

Una vez agotado el sustrato nutritivo y cuando el contenedor de la celdilla se les quedaba pequeño, las plantas se enmacetaban en contenedores de 9 cm de diámetro. El sustrato utilizado, tanto en la fase de aclimatación como en los sucesivos repicados era el mismo que se ha detallado anteriormente, aunque en cada nuevo enmacetado la mezcla se enriquecía con un abonado de fondo del tipo Osmocote 18-9-13 (Sierra Chemical Co). Posteriormente, y cada 15 días, se efectuó un riego con abono soluble del tipo (1:0,7:1), enriquecido con microelementos (Hakaphox azul), a una dosis de 1,5-2,5 g/l. La frecuencia de estos riegos con abono soluble aumentó en verano y disminuyó en invierno.

A lo largo de su vida, las plantas recibieron tratamientos fitosanitarios con insecticidas, tanto sistémicos como de contacto, y fungicidas; se evitó, no obstante, el uso de aminoácidos, reguladores de crecimiento, enanizantes y otros productos que podían influir en el fenotipo de las plantas tratadas. En su desarrollo, las plantas, necesitaron nuevos trasplantes a contenedores de mayor tamaño, (macetas de 12, 14 y 17 cm de diámetro) e incluso contenedores de 25 cm de diámetro para el caso de ejemplares más desarrollados.

### **Caracterización fenotípica de los nuevos variantes somaclonales.-**

#### **Variante somaclonal “Selecta”.-**

Se estudiaron, comparativamente, varias características del *Syngonium* “White Butterfly” y del *Syngonium* “Selecta” a lo largo del tiempo. Las características que se midieron fueron las siguientes: altura de la planta; longitud del nervio central de la hoja más desarrollada; longitud del lóbulo de la hoja más desarrollada; anchura de la hoja más desarrollada; longitud del peciolo; peso de las hojas más desarrolladas; número de brotes por inóculo y número de hojas totales.

Las medidas se tomaron en distintos momentos a lo largo del tiempo, para ver la evolución de las mismas en función del desarrollo y comprobar la variación de los parámetros medidos. Así, se tomaron medidas al final de las fases de: i) multiplicación *in vitro*; ii) enraizamiento *in vitro*; iii) aclimatación *in vivo*; iv) después de 6-9 meses de crecimiento *in vivo* y v) después de dos años de crecimiento *in vivo*; (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6).

Al mismo tiempo, se determinó la anchura de las hojas; la longitud del nervio central de la hoja; longitud del lóbulo de la hoja y la longitud del peciolo de las hojas desarrolladas de algunas plantas seleccionadas al azar del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante “Selecta” durante las fases de: i) multiplicación *in vitro*; ii) enraizamiento *in vitro*; iii) durante las fases de: aclimatación *in vivo*, iv) después de 9 meses de crecimiento *in vivo* y v) después de dos años de crecimiento *in vivo*.

Por otro lado, se midió también la anchura de las hojas, su longitud a lo largo del nervio central, la longitud del lóbulo de la hoja y la longitud del peciolo en todas las hojas desarrolladas de algunas plantas seleccionadas al azar del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante “Selecta” durante las cinco fases anteriormente indicadas. Se eligieron las hojas más desarrolladas y representativas de ambos variantes para delimitar mejor las diferencias existentes entre ellos. Además, para cada planta estudiada, se controló la altura total, el número de brotes por inóculo sembrado y el número de hojas desarrolladas (que coinciden con las hojas empleadas para medir sus características), así como el número total de hojas por planta, que incluía las hojas poco desarrolladas que consideramos como hojas no representativas, por su pequeño tamaño o porque no respondían al modelo de hoja tipo de cada planta.

Se estudió, en ambos cultivares, la evolución del área de las hojas, de la altura total de la planta, del número total de hojas y del número total de brotes a lo largo de las cinco fases de cultivo.



### Nuevos variantes somaclonales.-

En un experimento posterior, de un lote de 3350 plantas aclimatadas del White Butterfly y de otro lote de 2575 plantas aclimatadas de *Syngonium* "Selecta" de la misma edad se seleccionaron, cuatro plantas distintas que mostraban, cada una de ellas, diferencias muy importantes en la compacidad, o en el tipo y modelo de variegación, o en el color o/y en el tamaño de las hojas. Todas las plantas procedían del cultivo de tejidos *in vitro* y se cultivaron siguiendo los mismos procedimientos que se utilizaron en el *Syngonium* "Selecta" y en el "White Butterfly".

Estos nuevos variantes somaclonales se detectaron en el verano de 1996, durante la fase de aclimatación *in vivo* y mientras las plantas se encontraban en packs A-60, y se aislaron para proceder a su estudio. Se cultivaron en invernadero hasta principios de la primavera de 1997, enmacetándolos en contenedores de 14 cm de diámetro. El sustrato utilizado, los tratamientos fitosanitarios, la fertilización, la frecuencia de los riegos, los cuidados de cultivo y las condiciones ambientales fueron las mismas que las antes descritas para el *Syngonium* "Selecta".

Seleccionando plantas representativas de los nuevos variantes, se midió la altura de la planta, la longitud del nervio central de la hoja, la longitud del lóbulo de la hoja, la anchura de la hoja, la longitud del peciolo, la longitud internodal y el número de brotes totales por inóculo sembrado de cada cultivar, tomando como referencia al *Syngonium* "White Butterfly" y al "Selecta".

Los nuevos variantes se denominaron de la siguiente forma: i) scSy-Ver, que tiene un patrón de crecimiento similar al del White Butterfly, es decir, necesitó ser entutorado para su cultivo en invernadero, aunque tiene las hojas de un color verde más intenso que las del parental salvaje, con un vena central o principal muy marcada y sin variegación; ii) scSy-Comver, es una planta compacta que sigue el mismo modelo de crecimiento que el "Selecta" pero con las hojas de color verde oscuro, más pequeñas que las del parental y con un gran número de brotes que se desarrollan desde la base del inóculo; iii) scSy-Comint, es una planta compacta con un tamaño de hoja intermedio entre el del "Selecta" y el del scSy-Comver, aunque el color de las hojas se parece más al de aquel; iv) scSy-Comabe, es compacto, de hojas

muy pequeñas, con un crecimiento lento y anormal y, por tanto, con nulo interés para su producción en gran escala.

Los nuevos variantes scSy-Comint, scSy-Comver, scSy-Comabe proceden, probablemente, de mutaciones espontáneas acontecidas a lo largo del cultivo *in vitro* del *Syngonium* "Selecta". El variante scSy-Ver tiene su origen en un lote de plantas aclimatadas del cultivar "White Butterfly" y por consiguiente, puede ser consecuencia de otra mutación espontánea producida en éste durante el cultivo *in vitro*.

Debido a las distintas tonalidades de color verde que tienen las hojas de algunas de las plantas seleccionadas y a los diferentes tipos de variegación que presentan los variantes, se cuantificó, en dos análisis independientes, el contenido en clorofila a, b y clorofila total en las hojas de cada uno de ellos, siguiendo el método descrito para las hojas del *F. lyrata*.

En el primer análisis se tomaron muestras de hojas de plantas de cerca de un año de edad de los *Syngonium* scSy-ComVer, scSy-Comint y Selecta, cultivados en invernadero en contenedor de 12 cm de diámetro. Las hojas se recolectaron el 14/02/97 y la determinación se realizó inmediatamente después. El objetivo de este estudio era tratar de relacionar las diferentes tonalidades de verde que presentan las hojas más desarrolladas de los posibles variantes con el contenido en clorofila total, a y b.

En el segundo análisis las hojas se recolectaron en junio de 1997. Las plantas estaban enmacetadas en contenedores de 12 cm de diámetro y ya tenían un año y medio de edad. Se cultivaron en invernadero y, en esta ocasión, se determinaron también los contenidos en clorofila de los *Syngonium* "Selecta" y "White Butterfly".

## **Resultados y discusión.-**

### ***Syngonium* "Selecta".-**

El *Syngonium* "Selecta" es una planta de fenotipo más compacto que el parental "White Butterfly". Este variante somaclonal surgió en una línea organogénica en la que se había

realizado 12 subcultivos durante cerca de un año (febrero de 1995 a enero de 1996). En cada subcultivo se pusieron a enraizar *in vitro* unas 1.500-3.000 plantas. Las plantas bien enraizadas se pasaban al invernadero y, entre todas las plantas aclimatadas (33.096) se detectó una que tenía una apariencia más homogénea que el parental, debido al gran número de brotes que se desarrollaban desde la parte basal y, sobre todo, a la menor altura total de la planta.

La planta seleccionada se cultivó en invernadero en condiciones estándar, y se empleó como fuente de material vegetal para su reintroducción *in vitro*. Una vez obtenido un número suficiente de brotes a partir de este nuevo variante, se enraizaron *in vitro*, se aclimataron y se mantuvieron en el invernadero con vistas a estudiar sus características y compararlas con las del parental.

El transplante al suelo y la posterior aclimatación de las plantas del variante "Selecta" se realizaron siguiendo los métodos, descritos en el apartado anterior para las plantas salvajes del cultivar "White Butterfly". Los resultados evidenciaron la ausencia de problemas, tanto en esta fase como a lo largo de todo el desarrollo de las plantas en el invernadero. Así por ejemplo, de una muestra de 300 plantas aclimatadas *in vivo*, se desarrollaron 292 (98%) con toda normalidad. Conviene resaltar que la tasa de aclimatación, es decir el alto porcentaje de plantas que superan la transferencia a condiciones de cultivo en invernadero, se mantuvo siempre por encima del 90% con independencia de la época del año en que se realizaba el transplante al suelo desde la cámara de cultivo *in vitro*. Así, el 21/11/96 se obtuvieron 3385 plantas de las 3720 aclimatadas inicialmente (91%); el 29/05/97 se desarrollaron 3895 plantas de 4100 plantas aclimatadas (95%) y, en una tercera tanda, 2813 plantas de 2870 plantas aclimatadas (98%).

Al comparar las características de las plantas del *Syngonium* "Selecta" con las del parental "White Butterfly" en la fase de multiplicación *in vitro* (tabla 2) cabe resaltar la menor altura total de las plantas del variante somaclonal (4,62±0,12 cm) con respecto a las del genotipo salvaje (6,68±0,28 cm). Además, lo que resulta tanto o más destacable, el número de brotes regenerados a partir de cada inóculo sembrado es mayor en el caso del cultivar "Selecta". La combinación de ambas características en el variante "Selecta" (mayor número de brotes regenerados y, al mismo tiempo, menor altura de la planta) hace que la manipulación de las plantas del variante, en las operaciones de disección y repicado en las cabinas de flujo laminar sea mucho menos engorrosa que en el caso del *Syngonium* "White Butterfly", ya que se evita la pérdida de tiempo que requiere la eliminación de las hojas más desarrolladas. Esto facilita y acorta el proceso de transferencia de las plantas de un frasco de cultivo *in vitro* a otro, lo que

repercute en un menor costo del proceso de producción de plantas *in vitro*. En efecto, al disponer de material vegetal muy homogéneo y uniforme se facilita el trabajo del personal de cabinas y se hace más rentable la propagación *in vitro*. Además, estas características conducen a un aumento de la tasa multiplicación que alcanza un valor cercano a 4, mientras que en el caso del salvaje “White Butterfly” varía entre 2,5 y 3,5.

**Tabla 2.-** Características de las plantas del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante svSy-“Selecta” durante la fase de multiplicación *in vitro*

VARIABLES	White Butterfly	svSy-Selecta
Anchura de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	1.53±0.07	1.13±0.04
Longitud del nervio central de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	1.82±0.08	1.12±0.04
Longitud del lóbulo de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	2.08±0.10	1.26±0.05
Longitud del peciolo <sup>(2)</sup> (cm)	4.07±0.27	2.60±0.10
Altura total de la planta (cm)	6.68±0.28	4.62±0.12
Número total de hojas <sup>(3)</sup>	28.85±2.36	52.15±2.57
Número de brotes <sup>(4)</sup>	9.85±0.93	20.54±1.13
Peso de la hoja <sup>(1)</sup> y peciolo <sup>(2)</sup> (mg)	102.23±10.19	47.77±3.75
Peso total <sup>(5)</sup> (mg)	3578.18±432.76	3799.27±182.73

Notas:

(1): Hoja más desarrollada

(2): Peciolo de la hoja más desarrollada

(3): Número de hojas en las plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado

(4): Número de brotes regenerados a partir de cada inóculo sembrado

(5): Peso fresco de las plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado

Tanto la anchura de la hoja, como las dos variables asociadas a la longitud de la hoja (longitud del nervio central y longitud del lóbulo de hojas), la longitud del peciolo, el peso de la hoja y el peso del peciolo de la hoja más desarrollada son, significativamente menores en el nuevo variante “Selecta”, que en el cultivar “White Butterfly”. Sin embargo, el peso fresco de las plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado es mayor en el caso del cultivar “Selecta”, lo cual se debe a la mayor tasa de multiplicación *in vitro* de este variante somaclonal. Es, también, muy significativo el gran número de hojas en las plantas regeneradas por inóculo sembrado del Selecta, lo que le confiere un aspecto de gran compacidad.

Las características de las plantas enraizadas *in vitro*, es decir de las plantas procedentes de los callos organogénicos mantenidos por subcultivo repetido durante la fase de multiplicación, se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.-** Características de las plantas de *Syngonium* “White Butterfly” y del variante SvSy-“Selecta” durante la fase de enraizamiento *in vitro*.

VARIABLES	White Butterfly	SvSy-Selecta
Anchura de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	1.52±0.07	1.22±0.05
Longitud del nervio central de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	1.90±0.07	1.37±0.06
Longitud del lóbulo de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	1.91±0.08	1.45±0.09
Longitud de peciolo <sup>(2)</sup> (cm)	5.07±0.24	4.33±0.25
Altura total de la planta (cm)	7.87±0.37	5.41±0.20
Número total de hojas <sup>(3)</sup>	4.17±0.32	16.00±0.88
Número de brotes <sup>(4)</sup>	1.33±0.14	4.58±0.26
Peso de la hoja <sup>(1)</sup> y peciolo <sup>(2)</sup> (mg)	184.84±11.02	103.63±6.56
Peso total <sup>(5)</sup> (mg)	1158.50±81.65	1546.17±135.61

Notas:

(1): Hoja más desarrollada

(2): Peciolo de la hoja más desarrollada

(3): Número de hojas en plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado

(4): Número de brotes regenerados a partir de cada inóculo sembrado

(5): Peso fresco de las plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado

Las conclusiones que se pueden obtener de estos datos son similares a las anteriores. No obstante, al tratarse de plantas completamente enraizadas, las diferencias entre ambos genotipos disminuyen, aunque siguen siendo significativas, sobre todo las que se refieren a la altura total de las plantas (menor en el “Selecta”), y en el número total de hojas (cuatro veces menor en el “Selecta” que en el genotipo salvaje). Esto último se debe a que el número de brotes en cada inóculo sembrado (que es el que realmente se aclimata y se transplanta al suelo de forma individual en cada celdilla de los packs A-60) es casi cuatro veces mayor en el variante “Selecta” (4,58±0,26 cm) que en el genotipo salvaje del “White Butterfly” (1,33±0,14 cm).



De los valores anteriores se deduce que el número de hojas por cada brote del inóculo sembrado del Selecta oscila entre 3 y 4. Por otro lado, las hojas de variante “Selecta” son menores que las del cultivar “White Butterfly”. El menor tamaño de hoja puede ser muy importante porque, en principio, las plantas del “Selecta” van a soportar mejor las condiciones de estrés hídrico que se dan en la fase de aclimatación ya que, al ser menor la superficie de la hoja ( $1,67 \text{ cm}^2$  del “Selecta” frente  $2,89 \text{ cm}^2$  de “White Butterfly”), la pérdida de agua será menor y las plantas superarán esta etapa con las hojas menos dañadas y con más posibilidades de sobrevivir de cara a su posterior desarrollo.

Tras la fase de enraizamiento *in vitro*, las plantas se transfirieron a *packs* con 60 celdas de 5 cm de lado y se introdujeron en los túneles de aclimatación en invernadero. Superada esta fase - dos o tres semanas en función de la época del año - las plantas se pasaban desde los citados túneles a otras bancadas del invernadero en donde se cultivaban en condiciones estándar. Después de esta fase de aclimatación se anotaron de nuevo las características de los dos genotipos de *Syngonium* (tabla 4).

Los resultados indican que las diferencias en la anchura de la hoja más desarrollada, ( $2,05 \pm 0,04 \text{ cm}$  en el “Selecta” frente  $2,84 \pm 0,05 \text{ cm}$  en el parental “White Butterfly”), la longitud de la hoja a lo largo del nervio central ( $2,52 \pm 0,05 \text{ cm}$  frente  $3,33 \pm 0,06 \text{ cm}$ ), la longitud del lóbulo de la hoja ( $2,73 \pm 0,05 \text{ cm}$  frente  $3,93 \pm 0,08 \text{ cm}$ ), e incluso la longitud del peciolo ( $2,53 \pm 0,12 \text{ cm}$  frente  $4,07 \pm 0,14 \text{ cm}$ ), se han acentuado durante esta fase. Ahora ya se pueden distinguir los variantes a simple vista debido, sobre todo, a la menor superficie de hoja del “Selecta”.

La altura total de la planta es también algo menor en el “Selecta” que en el parental. En cambio, el número de brotes es ligeramente superior en aquel. Por último, el número de hojas es similar en ambos genotipos.

**Tabla 4.-** Características de las plantas del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante svSy-“Selecta” durante la fase de aclimatación *in vivo*.

VARIABLES	White Butterfly	svSy-Selecta
<b>Anchura de la hoja<sup>(1)</sup> (cm)</b>	2.84±0.05	2.05±0.04
<b>Longitud del nervio central de la hoja<sup>(1)</sup> (cm)</b>	3.33±0.06	2.52±0.05
<b>Longitud del lóbulo de la hoja<sup>(1)</sup> (cm)</b>	3.93±0.08	2.73±0.05
<b>Longitud del peciolo<sup>(2)</sup> (cm)</b>	4.07±0.14	2.53±0.12
<b>Altura total de la planta (cm)</b>	10.58±0.19	8.22±0.17
<b>Número total de hojas<sup>(3)</sup></b>	7.66±0.44 <sup>(a)</sup>	7.77±0.38 <sup>(a)</sup>
<b>Número de brotes<sup>(4)</sup></b>	1.44±0.11 <sup>(b)</sup>	1.87±0.14 <sup>(b)</sup>
<b>Peso de la hoja<sup>(1)</sup> y peciolo<sup>(2)</sup> (mg)</b>	274.97±9.02	123.4±4.78

Notas :

(1): Hoja más desarrollada.

(2): Peciolo de la hoja más desarrollada.

(3): Número de hojas en las plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado.

(4): Número de brotes regenerados a partir de cada inóculo sembrado.

(a) y (b): No se aprecian diferencias en el número total de hojas y el número de brotes totales pero, en realidad, en el variante svSy-“Selecta” hay un gran número de brotes con una o dos hojas, que no se reflejan en la tabla debido a su pequeño tamaño en esta fase. Aún así, como se observa en las tablas siguientes, estos brotes si se desarrollan a lo largo del tiempo, dando lugar a diferencias, importantes en el número de hojas y de brotes.

Conviene hacer notar que el número de brotes y, por consiguiente, el número de hojas en las plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado del *Syngonium* “Selecta” no ha aumentado de la manera que cabría esperar si tenemos en cuenta los resultados de las fases anteriores. En realidad, el número de brotes ha disminuido desde los 4,58±0,26 en la fase de enraizamiento *in vitro* a los 1,87±0,14 durante la fase de aclimatación *in vivo*. Esto se debe a que, durante esta etapa, los brotes más pequeños detienen su crecimiento y la planta crece a lo alto, desarrollando uno o dos brotes principales aunque, eso sí, mantiene un gran número de yemas o brotes minúsculos en la base del tallo de la planta cuyo recuento es prácticamente imposible.

Donde ya se empiezan a apreciar diferencias más grandes es en el peso de la hoja desarrollada junto con su correspondiente peciolo (123,4±4,78 mg en el *Syngonium* “Selecta”, frente a 274,97±9,02 mg en el *Syngonium* “White Butterfly”. Este dato da una clara idea de que



el tamaño de las hojas del “Selecta” va siendo cada vez menor a lo largo del tiempo con respecto al del parental.

Después de unos de 9 meses de cultivo en el invernadero y una vez enmacetadas en contenedores de 12 cm de diámetro, se volvieron a evaluar las mismas características en las plantas de cada genotipo. Los resultados se muestran en la tabla 5. Si tomamos la hoja de *Syngonium* como un rectángulo cuyos lados vienen determinados por la anchura total de la hoja y por la longitud a lo largo del nervio central, la superficie de la hoja del parental salvaje sería de 28,88 cm<sup>2</sup> frente a los 21,04 cm<sup>2</sup> del “Selecta”. Este dato indica que, las diferencias en el tamaño de las hojas de ambos genotipos empiezan a ser evidentes, haciendo fácil la distinción cualitativa entre las plantas de ambos genotipos. Si además nos fijamos en la altura de las plantas vemos también que las diferencias comienzan a ser importantes, y es que es a partir de ahora cuando las plantas del cv. “White Butterfly” empiezan a desarrollar los típicos tallos de tipo sarmentoso tan característicos de esta variedad, para de este modo elongarse muy rápidamente, a base, principalmente, de incrementar la distancia internodal. Por este motivo, es de ahora en adelante cuando se acentúan las diferencias entre ambos cultivares.

En esta fase, los valores correspondientes al número total de hojas, (34,24±1,66 en el “Selecta” frente a 12,64±0,52 en el parental) y el número de plantas o brotes (8,84±0,41 frente a 3,04±0,19) son los que muestran unas diferencias más claras y significativas. Esto es debido a que, durante este período de tiempo, los brotes latentes que había en la base del cuello de las plantas del cv. “Selecta” obtenidas después de la fase de enraizamiento se han desarrollado. Estos brotes crecen ahora de forma homogénea, al mismo tiempo que el resto de plantas, formando un *cluster* o grupo de plantas que surgen del mismo inóculo. Lo que conviene resaltar es que, al contrario de lo que sucede en el cv. “White Butterfly”, ninguno de estos brotes toma el papel de dominante con lo que el variante “Selecta” muestra una espectacular compacidad.

**Tabla 5.-** Características de las plantas del Syngonium “White Butterfly” y del variante svSy-“Selecta” después de 6 meses de crecimiento *in vivo*.

VARIABLES	White Butterfly	svSy-Selecta
<b>Anchura de la hoja<sup>(1)</sup> (cm)</b>	5.48 ± 0.15	4.87 ± 0.08
<b>Longitud del nervio central de la hoja<sup>(1)</sup> (cm)</b>	5.27 ± 0.12	4.32 ± 0.10
<b>Longitud del lóbulo de la hoja<sup>(1)</sup> (cm)</b>	7.83 ± 0.22	7.03 ± 0.15
<b>Longitud del peciolo<sup>(2)</sup> (cm)</b>	7.08 ± 0.22	7.34 ± 0.16
<b>Altura total de la planta (cm)</b>	18.88 ± 0.35	15.57 ± 0.31
<b>Número total de hojas<sup>(3)</sup></b>	12.64 ± 0.52	34.24 ± 1.66
<b>Número de plantas o brotes<sup>(4)</sup></b>	3.04 ± 0.19	8.84 ± 0.41
<b>Peso de la hoja<sup>(1)</sup> y peciolo<sup>(2)</sup> (mg)</b>	923.92 ± 43.49	696.48 ± 28.34

Notas:

(1): Hoja más desarrollada.

(2): Peciolo de la hoja más desarrollada.

(3): Número de hojas en las plantas regeneradas a partir de cada inóculo sembrado.

(4): Número de brotes regenerado a partir de cada inóculo sembrado.

Las diferencias entre ambos genotipos (el parental “White Butterfly” y el variante “Selecta”) van haciéndose más notables según aumenta el tiempo de cultivo en invernadero. A los dos años estas diferencias son realmente espectaculares (ver tabla 6). En esta fase las plantas se han pasado ya a macetas o contenedores de 25 cm de diámetro y se encuentran en el formato definitivo, o sea están listas para la comercialización y venta al consumidor en floristerías u otros puntos de venta. Aunque existen otros formatos en macetas más pequeñas, que también tienen su propio mercado, es sin duda esta presentación la que va a proporcionar más beneficio económico. En efecto, el valor que este tipo de planta de gran formato alcanza en el mercado es el máximo posible, siempre que, eso sí, durante su crecimiento, las plantas hayan disfrutado de los cuidados necesarios, mantengan sus hojas sin defectos y tengan un buen estado fitosanitario para que el cliente potencial aprecie el valor ornamental del producto que va a comprar.

**Tabla 6.-** Características de las plantas del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante scSy-“Selecta” después de 2 años de crecimiento *in vivo*.

VARIABLE	White Butterfly	scSy-Selecta
Anchura de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	12.06 ± 0.21	8.62 ± 0.18
Longitud del nervio central de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	10.51 ± 0.23	6.39 ± 0.17
Longitud del lóbulo de la hoja <sup>(1)</sup> (cm)	19.74 ± 0.64	12.42 ± 0.37
Longitud del peciolo <sup>(2)</sup> (cm)	20.63 ± 0.39	24.35 ± 0.11
Altura total de la planta más desarrollada (cm)	72.82 ± 1.08	40.18 ± 0.52
Número de hojas <sup>(3)</sup>	12.36 ± 0.53	13.82 ± 0.48
Número de hojas totales <sup>(4)</sup>	31.39 ± 1,35	1130.48 ± 39,27
Número de brotes o plantas <sup>(5)</sup>	2.54 ± 0.21	81.82 ± 4.25
Peso de la hoja y peciolo <sup>(1),(2)</sup> (g)	6.05 ± 0.21	3.11 ± 0.12

Notas:

(1): Hoja más desarrollada.

(2): Peciolo de la hoja más desarrollada.

(3): Número de hojas de la planta más desarrollada en la maceta.

(4): Número de hojas totales en las plantas que se desarrollan a partir del inóculo inicialmente sembrado en cada maceta.

(5): Número de brotes o plantas por maceta.

Como puede verse en la tabla 6, las diferencias en el tamaño de la hoja más desarrollada son mucho más apreciables al cabo de dos años de cultivo en invernadero. Si consideramos la hoja de la planta como un rectángulo cuyos lados vienen determinados por la anchura y la longitud del nervio central, la superficie de la hoja más desarrollada del cv. “Selecta” sería de 55,08 cm<sup>2</sup> mientras que en el *Syngonium* “White Butterfly” el área sería de 126,75 cm<sup>2</sup>. La superficie de la hoja más desarrollada es, pues, dos veces más grande en el parental que en el variante. El tamaño de las hojas es una característica que permite distinguir de una manera muy clara entre ambos genotipos porque, sobre todo en las hojas más desarrolladas, las diferencias son muy grandes.

Sin embargo, la longitud del peciolo de la hoja más desarrollada del “Selecta” es ligeramente mayor que la del cultivar “White Butterfly” (24,35±0,11 cm frente 20,63±0,39 cm). Las plantas del “Selecta” producen tallos en los que la distancia internodal es muy corta. Esto

hace que las plantas sean muy compactas y que, por consiguiente, sea muy difícil que la luz pueda acceder a las zonas centrales o interiores de la planta. Como consecuencia, las plantas del nuevo variante compacto, en su afán por conseguir buenas condiciones de iluminación para sus hojas, emiten o producen peciolos más largos.

Otra diferencia notable entre los dos genotipos es la relativa a la altura total de la planta (40,18±0,52 cm en el “Selecta” frente 72,82±1,08 cm en el parental salvaje). La menor altura del “Selecta” permite su comercialización como una planta de centro de mesa, mientras que el “White Butterfly” es más apropiado como planta de rincón.

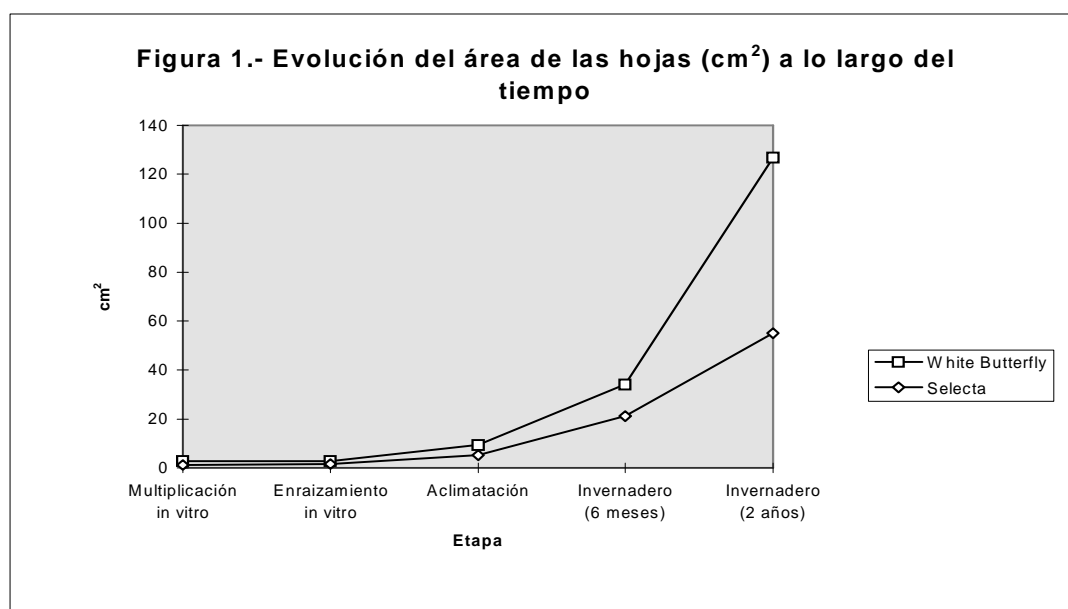
El número total de brotes procedentes de cada inóculo sembrado y aclimatado después de la fase de enraizamiento *in vitro* es de 81,82±4,25 en el “Selecta” y de 2,54±0,21 en el “White Butterfly”. El número de hojas totales es de 1130±39,27 en el nuevo cultivar y de 31,39±1,35 en el parental salvaje. De estos valores se deduce que la relación entre el número de hojas totales y el número de brotes es de alrededor de 13 en ambos genotipos (concretamente 13,8 en el “Selecta” y 12,4 en el “White Butterfly”).

A los dos años de cultivo en invernadero, el variante “Selecta” ha desarrollado una gran cantidad de brotes que surgen desde la base del inóculo inicial, mientras que el “White Butterfly”, por contra, desarrolla tallos sarmentosos mucho más largos y con hojas de gran tamaño. Por el gran número de brotes que se producen en la parte basal del “Selecta” sólo se necesita un inóculo para obtener una planta completa y terminada, es decir, una planta enmacetada en un contenedor de 20 cm de diámetro, que ya está lista para su comercialización a los dos años de cultivo en invernadero. Sin embargo, para obtener el mismo resultado con el cultivar “White Butterfly”, se necesitan cinco plantas colocadas de forma simétrica alrededor del tutor. En efecto, la capacidad de brotación del parental salvaje es mucho menor que la del variante compacto y, por consiguiente, se precisa un mayor número de plantas del “White Butterfly” con respecto al “Selecta” para conseguir el mismo efecto de compacidad y de uniformidad en los productos finales.

En resumen, las diferencias en las características del “Selecta” y el “White Butterfly” indican que estamos ante dos plantas con fenotipos muy diferentes. En realidad, se trata de dos productos totalmente distintos, porque mientras que el parental ha desarrollado unos tallos sarmentosos muy elegantes, susceptibles de ser entutorados en soporte de musgo, el nuevo variante “Selecta” ha desarrollado una enorme cantidad de brotes, que ahora ya son plantas

agrupadas en el mismo contenedor. Conviene resaltar que estos brotes del “Selecta” alcanzan la misma altura, lo que le confiere un aspecto de bola. Por si fuera poco, el hábito de crecimiento del “Selecta” hace innecesario el tutor, y permite dos usos alternativos de este producto: como planta de centro de mesa o como planta colgante. Nos encontramos, pues, ante dos productos comerciales muy distintos y que cumplen diferentes papeles, lo que los hace compatibles a la hora de figurar en un catálogo de plantas ornamentales.

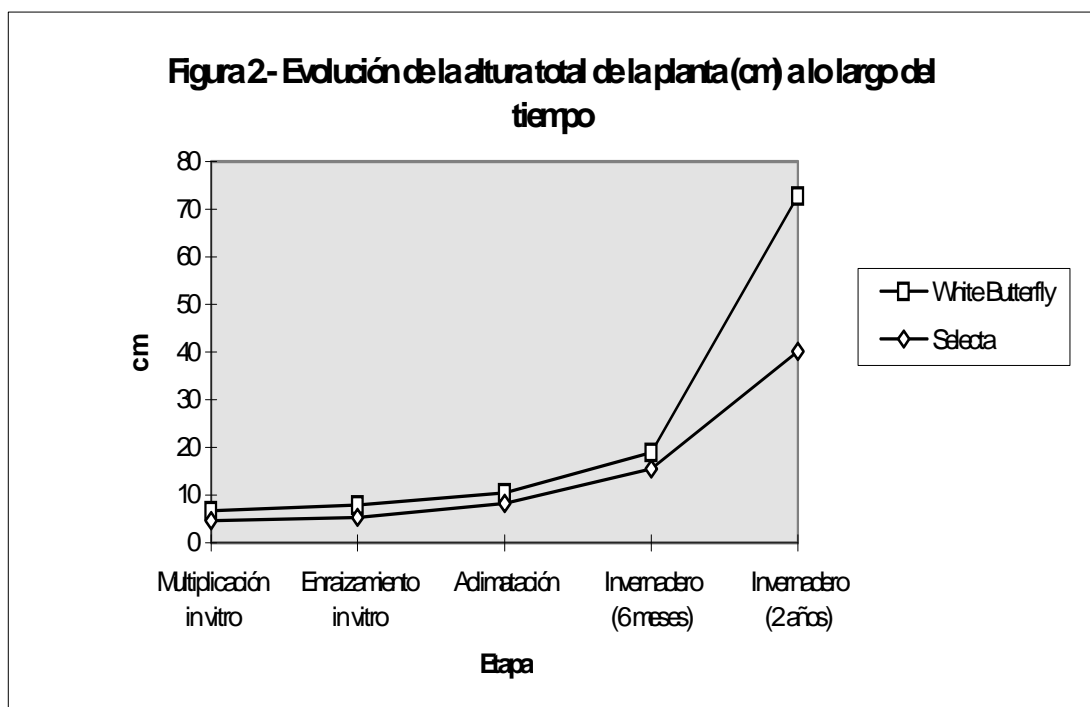
Con el fin de apreciar mejor la evolución de ambos genotipos a lo largo del tiempo, en las figuras 1-5 se muestran los valores correspondientes a las variables que hemos considerado más representativas.



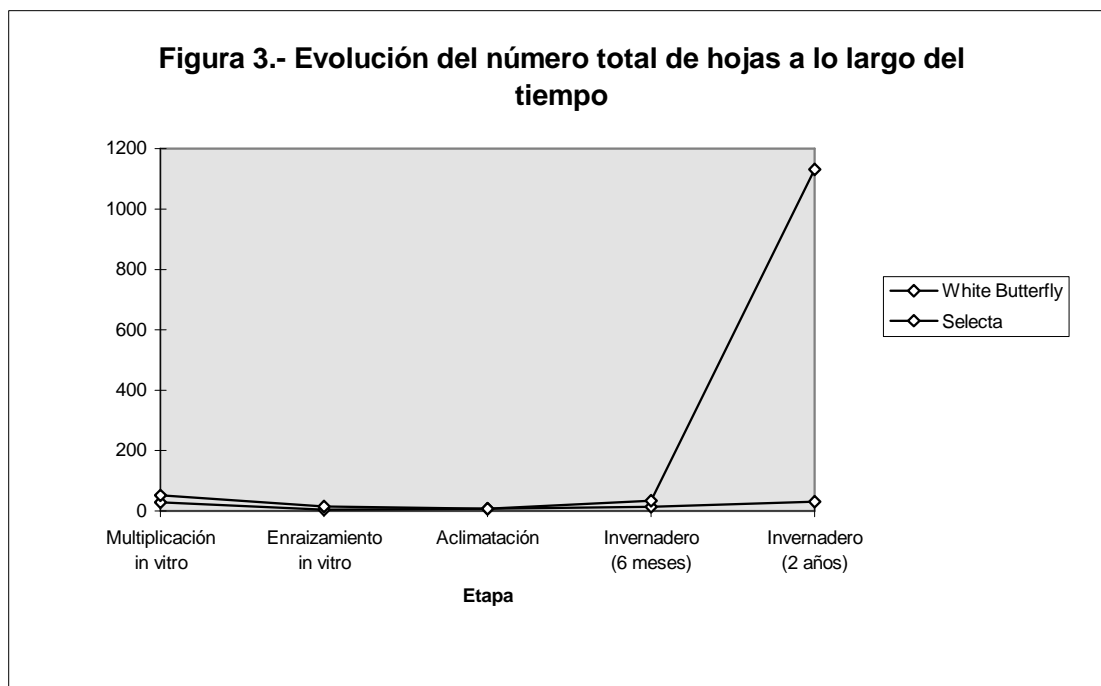
En la figura 1 vemos que la superficie de las hojas evolucionó de forma similar durante las tres primeras fases de cultivo (multiplicación y enraizamiento *in vitro* y en la etapa de aclimatación *in vivo*). En cambio, las diferencias empiezan a ser patentes a partir de los 6 meses de cultivo en invernadero y se hacen más notables a los dos años. En estos momentos, las hojas detienen su crecimiento porque las plantas han alcanzado el tamaño máximo que les permite la capacidad del contenedor en el que se encuentran y, además, ya están listas para su comercialización.

En la figura 2 se muestra la evolución de la altura total de la planta (cm) a lo largo del tiempo. Se observa el lento desarrollo de los dos cultivares a lo largo del tiempo. No hubo cambios bruscos en la altura de la planta hasta el primer año de cultivo en invernadero. A partir

de este momento y hasta los dos años, el *Syngonium* “White Butterfly” se distingue por la dominancia apical de los tallos principales que llegan a ser dos veces más largos que los del variante “Selecta”. Se deduce, pues, que el momento óptimo para empezar a entutorar las plantas del parental es a partir de los 6 meses. El cv. “Selecta” no necesita tutor porque tarda al menos dos años en empezar a emitir rastras o sarmientos, tiempo más que suficiente para que las plantas se puedan poner a la venta. El hecho de que estas plantas no necesiten ser entutoradas es importante porque se requiere menos mano de obra y, además, pueden estar disponibles para la venta en un corto periodo de tiempo sin menoscabo del precio final de la planta. Todo lo que sea mantener las plantas en los invernaderos más tiempo de lo necesario, supondrá un incremento en los costos económicos y, por tanto, menos beneficios en la comercialización del producto final.



Cuando se analiza la evolución del número total de hojas a lo largo del tiempo (Figura 3) se observan pocas diferencias entre ambos genotipos hasta que las plantas se cultivan en invernadero. A partir de los 6 meses de cultivo en invernadero las diferencias empiezan a ser notables.

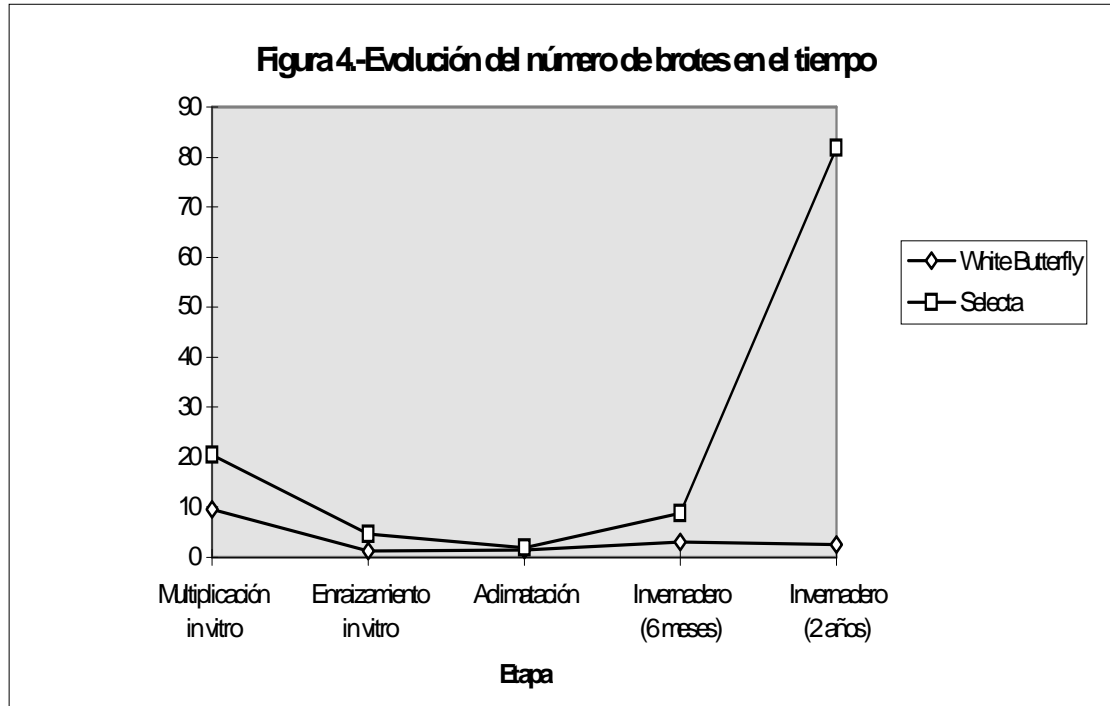


En efecto, el número de hojas del “Selecta” aumenta de un modo espectacular, alcanzando la increíble cifra de cerca de 1000 hojas por inóculo sembrado en cada maceta. Esto queda reflejado en el hecho de que la planta adopta una forma redondeada, de bola, muy homogénea, con gran cantidad de hojas, lo que le confiere una bella apariencia con un gran valor ornamental. En el *Syngonium* “White Butterfly” hay también un acuerdo en el número de hojas pero de una manera mucho más discreta.

En la figura 4, se muestra la evolución del número de brotes totales por inóculo sembrado a lo largo del tiempo. Las líneas correspondientes a los dos genotipos tienen una forma muy parecida a las de la figura relativa al número total de hojas (Figura 3). El motivo es que tanto el número de hojas como el número de brotes son dos variables directamente relacionadas entre sí y, por lo tanto, a mayor número de brotes totales habrá un mayor número de hojas y viceversa.

Cabe destacar que el número de brotes a los 2 años es de 81,82 en el cultivar “Selecta”, mientras que en el “White Butterfly” es, de tan solo, 2,54. La fuerte dominancia apical que manifiesta el parental salvaje hizo que los brotes que potencialmente se podrían haber formado en la parte basal de la planta nunca llegaran a desarrollarse. Así, de cada inóculo sembrado sólo se obtienen dos o tres plantas que se desarrollan principalmente a lo largo de un eje vertical a base de elongar el tallo. De estas plantas, una de ellas es claramente más grande que las otras,

posee un tallo de un mayor calibre, unas hojas de mayor tamaño y alcanza un altura mayor. Sin embargo, en el cv. "Selecta" los cerca de 80 brotes que se desarrollan en la base de cada inóculo sembrado son prácticamente iguales en tamaño, altura, número de hojas, etc., de ahí la gran uniformidad y compacidad que presenta el variante somaclonal "Selecta" con respecto al parental.



Con el fin de estudiar las diferencias de algunas características se midió, en otro experimento independiente, la anchura, la longitud del nervio central y la longitud del lóbulo de las hojas más desarrolladas y, al mismo tiempo, la longitud de los peciolo de dos plantas seleccionadas al azar a lo largo de las diferentes fases de cultivo: multiplicación *in vitro*, enraizamiento *in vitro*, aclimatación, después de 6 meses en el invernadero y a los dos años de cultivo en invernadero. En esta ocasión se tuvieron en cuenta todas la hojas más desarrolladas de cada planta (Hay que recordar que en los experimentos anteriores se midieron estas mismas características en las mismas fases de cultivo pero sólo en la hoja más desarrollada de cada planta). El hecho de considerar todas o casi todas las hojas de cada cultivar nos da una idea más exacta de las características de las hojas más representativas de cada planta tomadas en su conjunto y, por tanto, de su aspecto general. Se descartaron las hojas más pequeñas porque no eran representativas y, aunque sólo estaban presentes en un número pequeño, podían influir mucho en los valores medios y distorsionar el resultado final.



En la tabla 7 se muestran los valores de las características de las plantas del “White Butterfly” y el “Selecta” durante la fase de multiplicación *in vitro*.

**Tabla 7.-** Características de las hojas desarrolladas y peciolo de dos plantas seleccionadas al azar del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante “Selecta” durante la fase de multiplicación *in vitro*.

VARIABLE	White Butterfly		Selecta	
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2
<b>Anchura de la hoja (cm)</b>	1.58 $\pm$ 0.06	1.53 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.03
<b>Longitud del nervio central de la hoja.(cm)</b>	1.33 $\pm$ 0.07	1.35 $\pm$ 0.04	0.99 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.03
<b>Longitud del lóbulo de la hoja. (cm)</b>	1.74 $\pm$ 0.09	1.64 $\pm$ 0.05	1.11 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.05
<b>Longitud del peciolo (cm)</b>	2.66 $\pm$ 0.25	3.68 $\pm$ 0.10	1.97 $\pm$ 0.07	2.04 $\pm$ 0.10

Las medidas se realizaron al final del subcultivo, es decir después de 4 semanas de cultivo *in vitro* en el medio de multiplicación.

Los valores correspondientes a la anchura de la hoja, longitud del nervio central de la hoja y longitud del lóbulo del peciolo en el cv. “Selecta” son significativamente menores que los del parental salvaje. Los resultados confirmaron también en esta fase que las plantas del variante compacto eran, en general, más pequeñas que las plantas del *Syngonium* “White Butterfly”.

Las mediciones realizadas en las hojas de las plantas durante la fase de enraizamiento *in vitro* (Tabla 8) indican que el tamaño de las hojas del Selecta seguía siendo menor que el tamaño de las hojas del “White Butterfly”

**Tabla 8.-** Características de las hojas desarrolladas y peciolo de dos plantas seleccionadas al azar del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante “Selecta” durante la fase de enraizamiento *in vitro*.

VARIABLE	White Butterfly		Selecta	
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2
<b>Anchura de la hoja (cm)</b>	2.28 $\pm$ 0.09	2.11 $\pm$ 0.18	1.29 $\pm$ 0.13	1.19 $\pm$ 0.09
<b>Longitud del nervio central de la hoja. (cm)</b>	1.81 $\pm$ 0.08	1.94 $\pm$ 0.19	1.40 $\pm$ 0.12	1.15 $\pm$ 0.06
<b>Longitud del lóbulo de la hoja. (cm)</b>	2.35 $\pm$ 0.14	2.37 $\pm$ 0.23	1.56 $\pm$ 0.16	1.25 $\pm$ 0.08
<b>Longitud del peciolo (cm)</b>	5.29 $\pm$ 0.20	5.30 $\pm$ 0.45	3.74 $\pm$ 0.34	3.20 $\pm$ 0.29

En la tabla 9 se ven las características de las plantas de *Syngonium* “Selecta” y “White Butterfly” después de la fase de aclimatación. Como puede verse, las longitud del peciolo y el tamaño de las hojas son menores en el variante “Selecta” que en el parental “White Butterfly”

**Tabla 9.-** Características de las hojas desarrolladas y peciolo de dos plantas seleccionadas al azar del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante “Selecta” durante la fase de aclimatación *in vivo*.

VARIABLE	White Butterfly		Selecta	
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2
<b>Anchura de la hoja (cm)</b>	2.75 $\pm$ 0.14	2.67 $\pm$ 0.20	1.64 $\pm$ 0.10	1.89 $\pm$ 0.08
<b>Longitud del nervio central de la hoja. (cm)</b>	2.58 $\pm$ 0.19	2.25 $\pm$ 0.17	1.45 $\pm$ 0.08	1.58 $\pm$ 0.09
<b>Longitud del lóbulo de la hoja. (cm)</b>	3.47 $\pm$ 0.24	2.99 $\pm$ 0.25	1.81 $\pm$ 0.08	2.09 $\pm$ 0.11
<b>Longitud del peciolo (cm)</b>	5.89 $\pm$ 0.50	5.52 $\pm$ 0.53	3.65 $\pm$ 0.21	4.12 $\pm$ 0.42

A los 6 meses de cultivo en el invernadero (tabla 10), las diferencias entre ambos cultivares son evidentes. A partir de este momento las plantas del “Selecta” y “White Butterfly” se distinguen a simple vista.

**Tabla 10.-** Características de las hojas desarrolladas y peciolo de dos plantas seleccionadas al azar del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante “Selecta” después de 6-9 meses de crecimiento *in vivo*.

VARIABLE	White Butterfly		Selecta	
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2
<b>Anchura de la hoja (cm)</b>	4.85 $\pm$ 0.25	5.10 $\pm$ 0.22	3.53 $\pm$ 0.17	3.31 $\pm$ 0.14
<b>Longitud del nervio central de la hoja. (cm)</b>	5.77 $\pm$ 0.33	5.65 $\pm$ 0.40	4.21 $\pm$ 0.20	4.21 $\pm$ 0.17
<b>Longitud del lóbulo de la hoja. (cm)</b>	8.70 $\pm$ 0.53	8.47 $\pm$ 0.66	5.94 $\pm$ 0.32	6.01 $\pm$ 0.28
<b>Longitud del peciolo (cm)</b>	9.54 $\pm$ 0.92	9.13 $\pm$ 0.75	7.33 $\pm$ 0.31	6.58 $\pm$ 0.30

La Tabla 11 muestra las características del parental “White Butterfly” y del variante “Selecta” después de dos años de cultivo en condiciones de invernadero. Se puede ver que la longitud del peciolo es muy parecido en ambos cultivares. En cambio, las diferencias en el tamaño de las hojas son ya muy importantes. Estos resultados, unidos a la diferencia en la altura total de las plantas evidencian que nos encontramos ante dos productos totalmente distintos que pueden ocupar cuotas de mercado alternativas.

**Tabla 11.**- Características de las hojas desarrolladas y peciolo de dos plantas seleccionadas al azar del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante “Selecta” después de dos años de cultivo *in vivo*.

VARIABLE	White Butterfly		Selecta	
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2
<b>Anchura de la hoja (cm)</b>	9.41±0.36	9.80±0.46	5.93±0.39	4.89±0.44
<b>Longitud del nervio central de la hoja.(cm)</b>	9.95±0.42	10.26±0.52	7.50±0.45	7.00±0.46
<b>Longitud del lóbulo la hoja.(cm)</b>	16.70±0.65	17.18±0.76	11.28±0.74	10.06±0.81
<b>Longitud del peciolo (cm)</b>	22.91±0.91	22.42±0.85	19.71±1.13	18.26±1.08

En esta experiencia se tomaron el número de hojas más representativas y el número de hojas totales que tenía cada brote más representativo de cada planta. En el caso del Selecta, dada la dificultad que supone el hecho de medir todas las hojas, se midieron tan solo las que corresponden al brote más representativo del total de 80 que componen la planta. Debido a la homogeneidad y uniformidad que presentaron estos brotes, se podría tomar cualquiera de ellos.

### **Nuevos variantes somaclonales de *Syngonium*.-**

Durante la etapa de aclimatación de un lote de plantas del *Syngonium* “White Butterfly” se detectó y seleccionó una planta que presentaba un color verde intenso en sus hojas que la distinguía claramente de las otras plantas. Esta planta se denominó scSy-Ver por el color verde de sus hojas que era más oscuro que el de las del parental. Paralelamente y en otra tanda de aclimatación, esta vez de plantas del cultivar “Selecta” se seleccionaron por mostrar unas características diferentes a las de las demás, tres plantas: la primera, con las hojas de un color verde más intenso que las del parental (scSy-Comver); la segunda con unas hojas de un color verde que podríamos situar entre el verde de las hojas del parental y el verde de las hojas del scSy-comver (a esta planta se la denominó scSy-Comint); y la tercera, que aparentemente desarrollaba mucho menos que las otras plantas del mismo lote (scSy-Comabe). En la tabla 12 se muestran las características de las hojas desarrolladas y peciolo de una planta tipo del *Syngonium* “White Butterfly” y del “Selecta” y de plantas tipo de los nuevos variantes scSy-Ver, scSy-Comver, scSy-Comint y scSy-Comabe después de un año y medio de cultivo en el invernadero. Se indica también la longitud internodal, la altura de cada planta, el número de hojas totales, el color de las hojas y el número de brotes por inóculo.

La altura total de la planta, el número total de hojas y la longitud internodal del *Syngonium* “White Butterfly” y del variante scSy-Ver son muy similares. Ambos tienen el mismo patrón de crecimiento: emiten rastras con gran facilidad y, al mismo tiempo, presentan una fuerte dominancia apical. Por tanto, pueden ser comercializados o cultivados como planta colgante o planta entutorada. La característica que más claramente los distingue es el color de sus hojas: el scSy-Ver tiene un color de hoja verde esmeralda intenso. Además las hojas del

variante no presentan ningún tipo de variegación y la vena central de la hoja sobresale de la lámina foliar de manera notable.

Los variantes somaclonales Comver, Comint y Comabe son de tipo compacto como el “Selecta”. Al comparar las características de los cultivares compactos entre sí, hay que destacar que las hojas y peciolo del Comver son más pequeños que los del Selecta. El mayor número de brotes por inóculo (17 frente a 12), el mayor número de hojas totales (117 frente a 59), y la longitud del peciolo más corto (10,93 cm frente 16,04 cm), convierten al scSy-Comver en una planta mucho más compacta y de apariencia más homogénea que el “Selecta”. El color verde tan intenso de las hojas del Comver y, al mismo tiempo, el hecho de que no presente ningún tipo de variegación le augura un buen futuro a nivel comercial, ya que no conocemos ninguna otra variedad de *Syngonium* que presente estas características tan destacables. En efecto, el color verde intenso de sus hojas, la gran capacidad de producir brotes basales y el gran número de hojas que producen las plantas del nuevo variante somaclonal scSy-Comver hacen que sea muy diferente a cualquier otra variedad (conocida comercialmente) de esta especie.

**Tabla 12.-** Características de las hojas desarrolladas y peciolo de una planta del *Syngonium* “White Butterfly” y “Selecta” y de los variantes scSy-Ver, scSy-Comver, scSy-Comint y scSy-Comabe después de un año y medio de crecimiento *in vivo*.

A)

VARIABLES	White Butterfly	scSy-Ver	Selecta	scSy-Comver	scSy-Comint	scSy-Comabe
<b>Anchura de la hoja.(cm)</b>	8.10 $\pm$ 0.34	6.23 $\pm$ 0.23	4.93 $\pm$ 0.12	3.60 $\pm$ 0.13	4.16 $\pm$ 0.15	1.78 $\pm$ 0.04
<b>Longitud del nervio central de la hoja.(cm)</b>	9.34 $\pm$ 0.54	8.12 $\pm$ 0.43	6.35 $\pm$ 0.19	5.43 $\pm$ 0.13	5.26 $\pm$ 0.14	3.05 $\pm$ 0.16
<b>Longitud del lóbulo de la hoja.(cm)</b>	14.50 $\pm$ 0.90	12.05 $\pm$ 0.64	9.20 $\pm$ 0.31	7.28 $\pm$ 0.20	7.09 $\pm$ 0.25	3.63 $\pm$ 0.18
<b>Longitud del peciolo.(cm)</b>	19.24 $\pm$ 0.92	17.89 $\pm$ 0.92	16.04 $\pm$ 0.40	10.93 $\pm$ 0.34	9.76 $\pm$ 0.66	4.17 $\pm$ 0.16
<b>Longitud internodal.(cm)</b>	1.88 $\pm$ 0.30	2.03 $\pm$ 0.18	1.26 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.07

B)

VARIABLES	White Butterfly	scSy-Ver	Selecta	scSy-Comver	scSy-Comint	scSy-Comabe
<b>Altura de la planta.(cm)</b>	36.50	38.50	24.00	25.00	22.50	8.50
<b>Número de hojas desarrolladas</b>	8	11	26	51	26	15
<b>Número de hojas totales</b>	17	19	59	117	57	31
<b>Número de brotes por inóculo</b>	2	2	9	17	12	4
<b>Color</b>	verde claro	verde oscuro	verde claro	verde oscuro	verde intermedio	verde claro

El cultivar compacto scSy-Comint tiene unas características similares a las del scSy-Comver, aunque tiene un menor número de hojas (57 frente a 117) y un menor número de

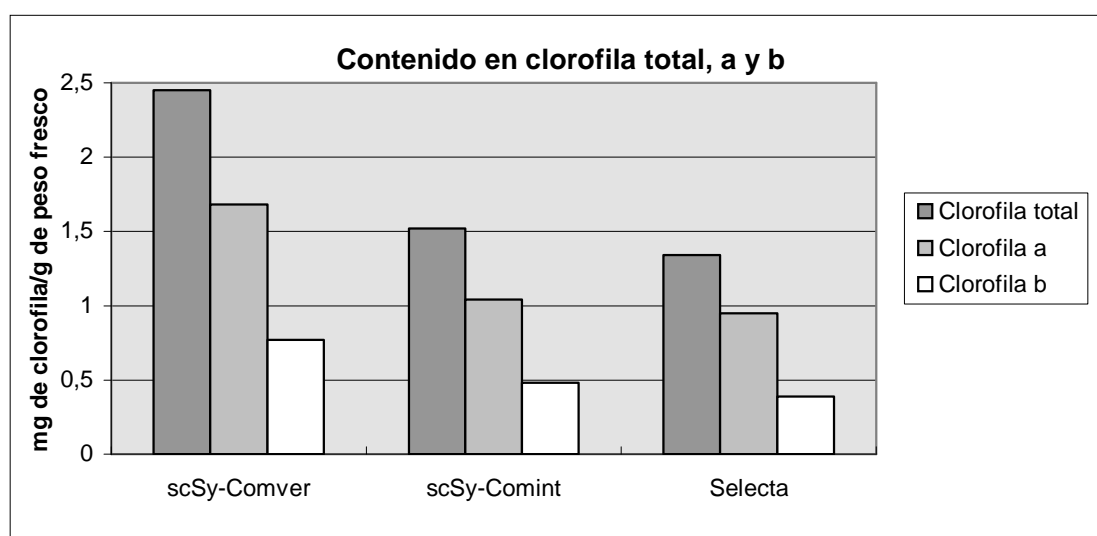
brotos por inóculo (12 frente a 17). La característica que más lo distingue del “Selecta” y del scSy-Comver es el color verde de las hojas y el tipo de variegación.

El scSy-Comabe es un cultivar de crecimiento muy lento, que no se desarrolla casi nada y , por tanto, es poco apto para el cultivo con fines comerciales.

De momento sólo se han podido estudiar las características de los nuevos variantes en un número muy limitado de plantas. La siguiente etapa sería, en este caso, la reintroducción de los nuevos variantes a condiciones de cultivo *in vitro*, con el fin de multiplicarlos a gran escala. Esto permitiría estudiar su comportamiento y sus características tanto *in vitro* como *in vivo* de una manera más detallada y a lo largo de un periodo de tiempo más largo. De esta manera se podría evaluar el interés comercial de cada variante con vistas a su producción en gran escala.

La Figura 5 muestra los contenidos en clorofilas totales, a y b de los variantes compactos de *Syngonium*: Selecta, scSy-Comint y scSy-ComVer. El color verde más intenso de las hojas del “Comver” se refleja en su mayor contenido en clorofilas con respecto al de las hojas del “Comint” y “Selecta” que, además, son de tipo variegado.

**Figura 5.-** Extracción de clorofila en mg de clorofila/g de peso fresco, de hojas más desarrolladas de los variantes de *Syngonium* compactos scSy-Comver, scSy-Comint y “Selecta”. Invierno 1997

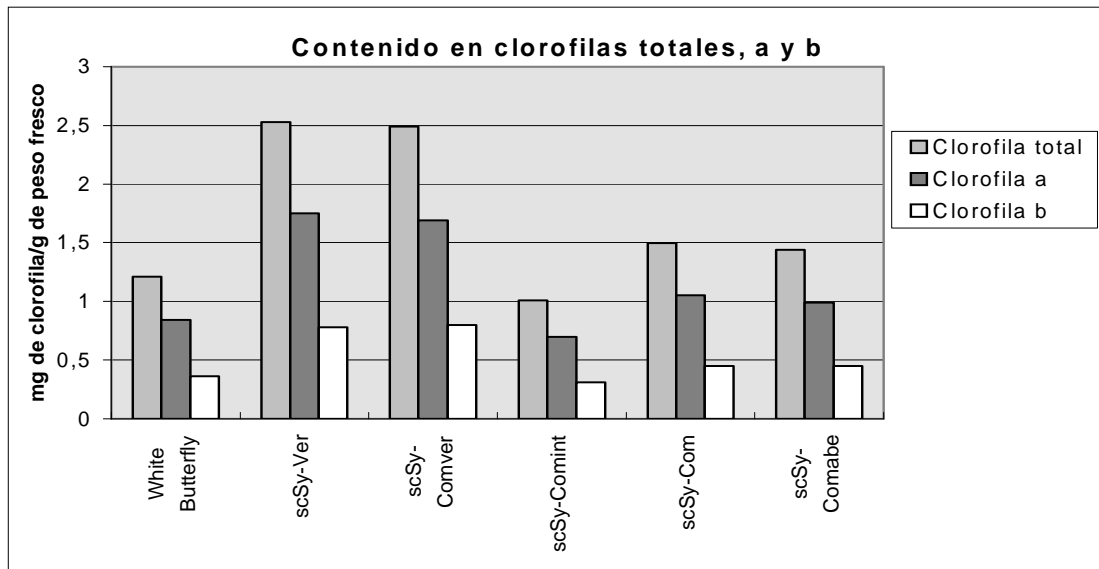


En verano de 1998 se realizó una nueva extracción de clorofilas. En la Figura 6 se muestran los contenidos en clorofila tanto de las hojas más desarrolladas de los cultivares compactos como de las hojas de las variedades que emiten rastras (“White Butterfly” y scSy-

Ver). Los resultados reflejan el color verde más intenso de las hojas del scSy-Ver con respecto al parental “White Butterfly”.

Es interesante resaltar la similitud en el contenido en clorofilas de los variantes scSy-Ver y scSy-Comver, que exhiben hojas de color verde intenso en ambos casos. La diferencia entre ambos radica en el patrón de crecimiento: El scSy-Ver emite rastras mientras que el scSy-Comver es compacto.

**Figura 6.-** Extracción de clorofilas de hojas más desarrolladas de los variantes de *Syngonium* “White Butterfly”, “Selecta”, scSy-Ver, scSy-Comver, scSy-Comint y scSy-Comabe. Verano 1998



Existen unas pequeñas diferencias entre los valores de los contenidos en clorofilas de las mismas variedades en las figuras 5 y 6. Esto puede ser debido a que las determinaciones se realizaron en distintas estaciones del año (invierno y verano).

## **Resumen.-**

### **“SELECTA”.-**

Surgió en un línea organogénica del *Syngonium* “White Butterfly” en la que se habían realizado 12 subcultivos durante cerca de un año. El *Syngonium* “Selecta” es una planta de fenotipo más compacto que el parental y tiene una apariencia muy homogénea debido al gran número de brotes que se desarrollan desde la parte basal y, sobre todo, a la menor altura total de la planta. La facilidad para su propagación en gran escala, la ausencia de problemas durante la aclimatación, su crecimiento vigoroso y, sobre todo, su porte compacto, uniforme y homogéneo, el mayor número de brotes, la mayor densidad foliar, el mayor número de hojas totales y la menor altura total de la planta hacen que el variante somaclonal svSy1-“Selecta” pueda ser de interés para su introducción en el mercado de las especies ornamentales.

Los rasgos que distinguen al “Selecta” del parental “White Butterfly” son:

- 1.- El parental, en su desarrollo, produce unos tallos sarmentosos muy elegantes, susceptibles de ser entutorados en soporte de musgo mientras que el hábito de crecimiento del “Selecta” hace innecesario el tutor, y permite dos usos alternativos de este producto: como planta de centro de mesa o como planta colgante.
- 2.- El nuevo variante “Selecta” desarrolla un gran número de brotes. Esto, unido a que los entrenudos son más cortos y el tamaño de las hojas es más pequeño que las del parental confiere a la planta un atractivo aspecto de bola.

### **Descripción del “Selecta”.-**

**Propagación:** En la actualidad la mayoría de los *Syngonium* que se multiplican en gran escala lo hacen siguiendo las técnicas del cultivo de tejidos. Se obtienen plantas muy homogéneas y uniformes.

**Planta:** Las plantas del “Selecta” retrasan mucho tiempo la producción de rastras y, por consiguiente, pueden ser comercializados sin necesidad de ser entutoradas. Producen muchos brotes que surgen de la parte basal y sus hojas son pequeñas y muy numerosas. Pueden alcanzar

entre los 50-75 cm de altura sin haber comenzado a emitir las típicas rastras sarmentosas de los *Syngonium*. Las hojas de las plantas jóvenes son de color verde claro, pero con la edad aparece la variegación característica del “White Butterfly”. El tallo es corto y nunca ramificado. Contiene yemas axilares que se mantienen siempre en estado latente.

**Crecimiento:** Debido al retraso en la producción de rastras, el desarrollo en altura del “Selecta” es mucho menor que en el “White Butterfly”.

**Hojas:**

- **Forma:** Las hojas jóvenes son en forma de flecha y con el tiempo se vuelven ligeramente lobuladas
- **Tamaño:** (A los 2 años): 8,5 cm de anchura y 6,5 cm de longitud
- **Margen:** Liso
- **Aspecto:** Carnosas y suculentas
- **Textura:** Superficie de la hoja irregular al tacto
- **Pecíolo:** Robusto y en forma de vagina. 24,5 cm de longitud
- **Venas:** Tiene una vena central más marcada que las laterales que son muy finas.
- **Variegación:** Presentan un jaspeado muy acentuado y brillante
- **Color:** El fondo es de color verde claro y el jaspeado es de color verde intenso.

**Nuevos variantes somaclonales:**

scSy-Ver.-

Se detectó en un lote de plantas de *Syngonium* “White Butterfly” durante la etapa de aclimatación. Posee una hojas de un color verde intenso, más oscuro que el verde claro que exhiben las hojas del parental. El patrón de crecimiento es similar al del “White Butterfly”, es decir, emite rastras sarmentosas a partir de los 6 meses de cultivo en invernadero. Es, por tanto, susceptible de ser entutorada y ser comercializada como planta colgante o de rincón. La altura



total de la planta, el número de hojas y la longitud internodal son parecidos en el scSy-Ver y en el parental “White Butterfly”.

Los rasgos que distinguen al scSy-Ver del “White Butterfly” son:

- 1.- El color de sus hojas: el scSy-Ver tiene un color de hoja verde esmeralda intenso.
- 2.- Las hojas del nuevo variante no presentan ningún tipo de variegación en las primeras fases de crecimiento y la vena central se destaca de una manera notable.

### **Descripción del scSy-Ver**

**Propagación:** Es aconsejable su reproducción mediante el cultivo de tejidos. Se pueden propagar también mediante el esquejado.

**Planta:** Tiene la forma usual de los *Syngonium* “White Butterfly”. Con las hojas tersas y suculentas de un color verde mate muy intenso.

**Crecimiento:** Se trata de una trepadora cuyos brotes presentan una fuerte dominancia apical. Los tallos tienen en sus nudos yemas laterales que se mantienen siempre en un estado de latencia.

### **Hojas:**

- **Forma:** En forma de flecha que con la edad se vuelven lobuladas
- **Tamaño:** (Al año y medio): 8 cm de longitud y 6,5 cm de altura
- **Aspecto:** Carnoso y suculento
- **Textura:** La superficie de la hoja es ligeramente rugosa al tacto
- **Pecíolo:** (Al año y medio): 18 cm de longitud. Erecto y vaginado
- **Venas:** La vena central está muy marcada
- **Color:** Verde esmeralda intenso

- **Variegación:** No presenta ninguna variegación en la fase juvenil aunque con el tiempo aparece una zona de color verde más claro alrededor de la zona central y más tarde, otras alrededor de algunas venas laterales

### scSy-Comver, scSy-Comint, scSy-Comabe

Estos tres nuevos variantes se seleccionaron y aislaron en un lote de plantas de *Syngonium* “Selecta” durante la etapa de aclimatación. Se trata de tres plantas de crecimiento compacto similar al del parental pero con ciertas diferencias en las tonalidades del color verde de sus hojas. En los casos del scSy-Comver y del scSy-Comabe también hubo algunas diferencias importantes en el tamaño de las hojas con respecto al parental. Las plantas del scSy-Comabe mostraron un crecimiento poco normal y un desarrollo muy lento que nos hizo desistir de considerarla como una planta de interés comercial. Las plantas del scSy-Comint se parecen mucho a las del “Selecta”, y además, éstas se van haciendo cada vez mas pequeñas a medida que las plantas van creciendo. Por tanto, toda nuestra atención se dirigió al nuevo cultivar scSy-Comver que sí puede ser una planta susceptible de ser cultivada en gran escala.

Los rasgos que distinguen al scSy-Comver del “Selecta” son:

- 1.- Las hojas del Comver poseen un color verde oscuro intenso frente al color verde más claro del parental “Selecta”.
- 2.- En las etapas iniciales de cultivo las hojas son totalmente verdes. A medida que se desarrollan van apareciendo zonas muy estrechas de color verde más claro a lo largo de la vena central.
- 3.- El tamaño de sus hojas es muho menor que el de las del parental “Selecta” lo que le confiere un aspecto muy uniforme, compacto y homogéneo.

### Descripción del scSy-Comver

**Propagación:** Como las otras variedades de la especie se recomienda el uso del cultivo de tejidos porque proporciona una gran cantidad de plantas uniformes en un corto periodo de tiempo. Las plantas obtenidas por este método son de mejor calidad que las obtenidas por otros métodos tradicionales como el esquejado.

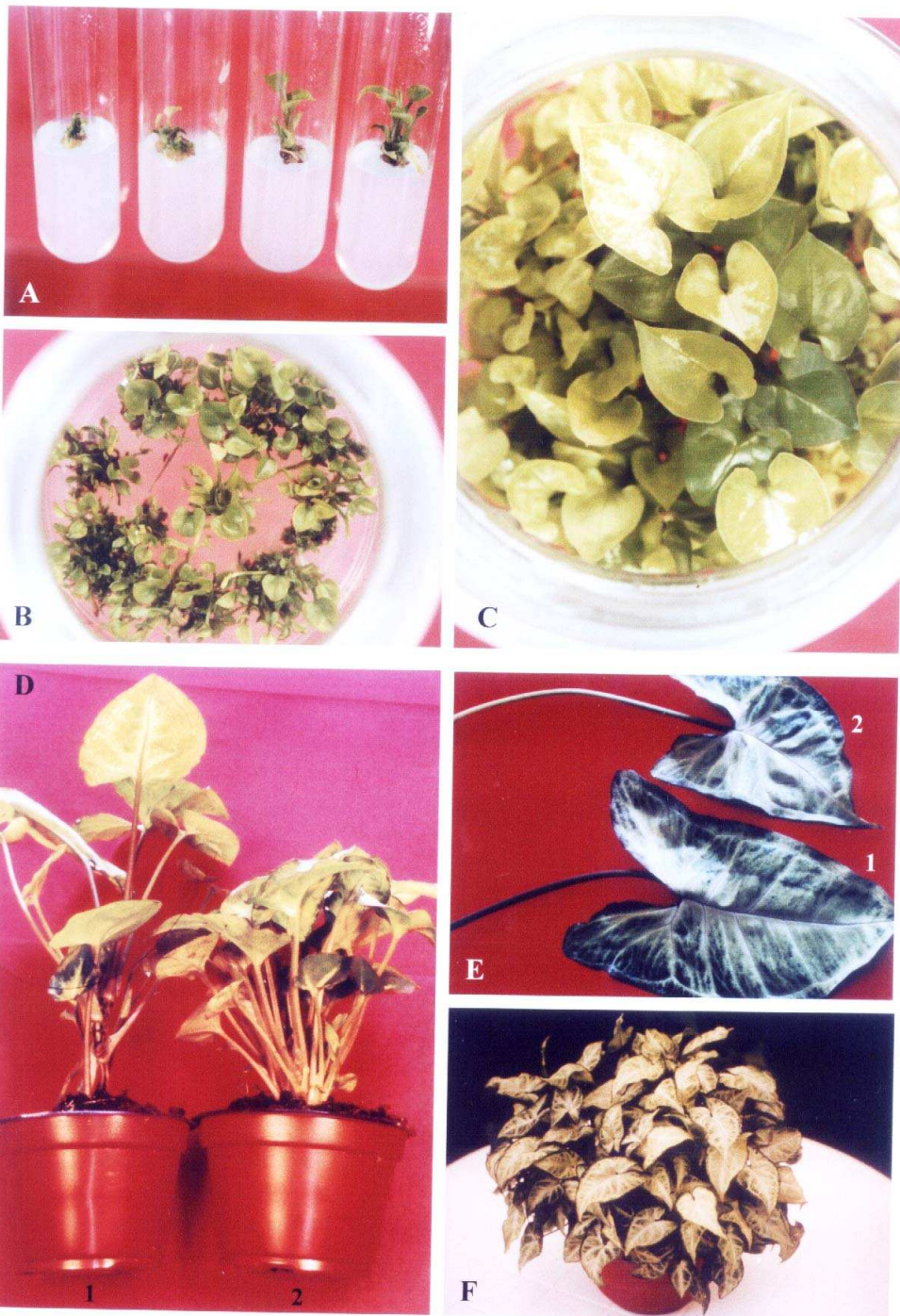
**Planta:** Mantiene el patrón de crecimiento del “Selecta” con una gran cantidad de brotes que surgen de la zona basal y con un número de hojas muy alto. Producen plantas muy compactas y uniformes.

**Crecimiento:** No emite rastras trepadoras con facilidad. Las yemas apicales presentan una fuerte dominancia apical y el desarrollo de las yemas laterales está inhibido.

**Hojas:**

- **Forma:** de corazón
- **Tamaño:** (al año y medio): 3,5 cm de anchura y 5,5 cm de longitud
- **Aspecto:** delicado
- **Textura:** suave al tacto
- **Pecíolo:** erecto. 11 cm de longitud al año y medio
- **Venas:** poco marcadas
- **Color:** verde oscuro
- **Variegación:** aparece una ligera zona de color verde claro alrededor de la vena central después de cierto tiempo de crecimiento.





Brotos procedentes de yemas laterales del variante "Selecta" de *Syngonium* "White Butterfly": (A) durante la fase de iniciación, (B) de multiplicación y (C) de enraizamiento. (D) Planta de *Syngonium* "White Butterfly" (1) y del variante "Selecta" (2) cultivada en maceta de 9 cm de Ø. (E) Hoja del variante "Selecta" (2) y del parental (1). (F) Planta del nuevo variante "Selecta" de *Syngonium* preparada para su comercialización.







Variante de hojas de color verde intenso (scSy-ver) de *Syngonium* (izquierda) y el parental "White Butterfly" (derecha) vistos desde arriba

Vista lateral del variante de hojas de color verde intenso (scSy-ver) de *Syngonium* (derecha) y del parental "White Butterfly" (izquierda)



Detalle de la hoja más desarrollada de plantas de doce meses de los variantes compactos "Selecta" (1), scSy-Comint (2) y scSy-Comver (3)

Plantas de los variantes compactos "Selecta" (1), scSy-Comint (2) y scSy-Comver (3) cultivadas en maceta de 12 cm de diámetro







## VIII.- Conclusiones



Durante el desarrollo de la presente investigación se han obtenido ocho nuevos variantes de plantas ornamentales mediante el aprovechamiento de la variación somaclonal. Estos variantes son los siguientes:

1.- El “Ivonne” se ha obtenido a partir de una línea organogénica de *Ficus lyrata* y su rasgo más característico es que posee unas hojas irregularmente variegadas con tres tonalidades de coloración diferentes: verde intenso alrededor de la vena principal, verde claro y verde amarillento en el área central y blanco en los márgenes de las hojas. La ausencia de problemas durante la micropropagación y la facilidad con que supera la fase de aclimatación hacen que el nuevo variante sea de interés para una posible comercialización en gran escala.

Durante la propagación *in vitro* del “Ivonne” apareció el “Ivonne-2” en un grupo de plantas procedentes de un callo organogénico. Se distingue del *F. lyrata* estándar porque sus hojas tienen dos áreas con intensidades de color verde claramente diferenciadas: una central de color verde claro y otra periférica de color verde oscuro.

2.- El cultivar “Blue” es un nuevo variante de *Ficus elastica* que apareció durante la fase de multiplicación en una línea permanente del cultivar “Decora”. Se caracteriza por una variegación especial en sus hojas que presentan tres zonas de color verde, verde intenso y verde claro alrededor de la vena central. Se puede propagar mediante cultivo de tejidos y la estabilidad fenotípica se mantiene un subcultivo tras otro. Su propagación a gran escala no es fácil pero es factible si se prestan los cuidados necesarios.

3.- El “Mallorca” es un nuevo cultivar ornamental de *Ficus benjamina*. Se ha obtenido en un programa de selección somaclonal a partir del parental *Ficus benjamina* “Exotica”. Las hojas exhiben una variegación con sectores verdes y blanco amarillentos, distribuidos irregularmente en toda la superficie de la hoja formando un dibujo de tipo jaspeado. La estabilidad fenotípica, la alta tasa de multiplicación *in vitro* y su peculiar atractivo le confieren un alto valor ornamental.

4.- El nuevo cultivar compacto “Núria” de *Spathiphyllum* se identificó y seleccionó en un lote de plantas después de la fase de aclimatación. Se trata de un cultivar homogéneo y uniforme, con una gran capacidad de producir brotes y hojas y que presenta una menor altura con respecto al parental lo que le proporciona un aspecto muy compacto y atractivo para el consumidor. Se cultiva con facilidad tanto *in vitro* como en el invernadero y, por tanto, es una planta susceptible de ser multiplicada a gran escala.

5.- El cultivar “Selecta” surgió en una línea organogénica del *Syngonium* “White Butterfly”. Es una planta de fenotipo compacto y tiene un aspecto muy homogéneo debido al gran número de brotes que se desarrollan desde la parte basal de la planta y a la menor altura de la planta. La facilidad para su propagación a gran escala, la ausencia de problemas durante la aclimatación, su crecimiento vigoroso y sobre todo, su porte compacto, el mayor número de brotes, la mayor densidad foliar y la menor altura de la planta hacen que el “Selecta” pueda ser de interés para su introducción en el mercado de las especies ornamentales.

Además del “Selecta”, se han identificado otros nuevos variantes de *Syngonium*:

- i) el scSy-Ver que tiene un patrón de crecimiento similar al del parental “White Butterfly” (es decir, emite rastras con facilidad) pero que se distingue por sus hojas de color verde intenso.
- ii) el scSy-Comver y el scSy-Comint que tienen un desarrollo tan compacto y homogéneo como su parental “Selecta” pero cuyas hojas son de un color verde más intenso, especialmente en el primero.

**IX.- Referencias bibliográficas**



- ABD-KARIM, A.G.; HAMIDAH, M.; WAN-MOHAMAD, W.O. 1992.** Effect of auxin and cytokinin on in vitro organogenesis of *Cineraria chinensis* L. *Acta Horticulturae* 292: 181-186.
- AL MAARI, K.W.; AL GHAMDI, A.S. 1995.** Effect of culturing date on in vitro micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. "Hillaly". *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences* 3 (1): 151-167.
- ALDERSON, P.G.; HARBOUR, M.A.; PATIENCE, M.A. 1991.** Micropropagation of *Prunus tenella* cv. Firehill. *Acta Horticulturae* 212: 463-468.
- ANDERSON, W.C. 1975.** Propagation of *Rhododendrons* by tissue culture: Part I, development of a culture medium for multiplication of shoots. *Combined Proceedings of The International Plant Propagators Society* 25: 129-135.
- ANÓNIMO, 1995.** "Variety: "Gorguis 1" syn. "Sensation". Application no. 91/075". *Plant Varieties Journal* 8 (1): 28-29.
- ANONYMOUS, 1995.** In: Sigma Plant Culture Catalogue Supplement. Sigma-Aldrich Company Ltd. Dorset, UK.
- ARELLO, E.F.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. 1991.** Benzylaminopurine in the in vitro propagation of the apple rootstock "MM-111". *Revista Ceres* 38 (216): 94-100.
- ARENE, L.; PELLEGRINO, C.; GUDIN, S. 1993.** A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv. Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. *Euphytica* 71 (1-2): 83-90.
- ARMSTRONG, C.L.; PHILLIPS, R.L. 1988.** Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Science* 28: 363-369.
- ARORA, A. 1996.** Grain growth in wheat ears cultured in saccharose solution. *Biologia Plantarum* 38: 2, 223-228.
- AULT, J.R. 1992.** In vitro propagation of a *Silene hybrid* (*S. polypetala* X *S. virginica*). *HortScience* 27 (11): 1226.
- BABBER, S.; SHARMA, K. 1991.** Study of anatomy of vitrified structure in *Viola tricolour* L. *Annals of Biology Ludhiana* 7 (1): 93-95.
- BAEUCHESNE, G. 1981.** Les milieux minéraux utilisés en culture et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. *Comptes Rendues de l'Academie Agricole de Paris* 67: 1389-1397.
- BAKER, C.M.; WETZSTEIN, H.Y. 1994.** Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 3, 361-368.
- BALAKRISNA, M.; BHATTACHARJEE, SK. 1991.** Studies on propagation of ornamental trees through stem cuttings. *Indian Journal of Horticulture* 48 (1): 87-94.
- BANERJEE, S.; UPADHYAY, N.; KUKREJA, A.K.; AHUJA, P.S.; KUMAR, S.; SAHA, G.C.; SHARMA, R.P.; CHATTOPADHYAY, S.K. 1996.** Taxanes from in vitro cultures of the Himalayan yew *Taxus wallichiana*. *Planta Medica* 62 (4): 329-331.
- BARRET, C.; CASSELLS, A.C. 1994.** An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. "Grand Slam". *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 169-175.

- BARRET, J.E.; NELL, T.A. 1983.** *Ficus benjamina* response to growth retardants. *Proceedings of The Florida State Horticultural Society* 96: 264-265
- BARWALE, U.B.; WIDHOLM, J.M. 1987.** Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. *Plant Cell Reports* 6: 365-368.
- BATLLE, A.; MELÉ, E. 1984.** In vitro propagation of *Ficus elastica*. *Comunicaciones de la III reunión de ornamentales. Jornadas técnicas*: 140-146. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas; Almería. Spain
- BAUBAULT, C.; LANOY, V.; BAUDIER, F.; GARNIER, D.; DUCOMMUN, C. 1992.** The agronomic performance of a range of ornamental dwarf fruit trees produced by *in vitro* culture. *Acta Horticulturae* 320: 141-146.
- BHASKAR, P.; SUBHASH, K. 1996.** Micropropagation of *Acacia mangium* Willd. through nodal bud culture. *Indian Journal of Experimental Biology* 34 (6): 590-591.
- BHAT, S.R.; CHANDEL, K.P.S. 1991.** A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports* 10 (6-7): 358-361.
- BEHE, B.K. 1993.** Floral Marketing and Consumer Research. *HortScience* 28(1): 11-14.
- BEN JAACOV, J.; ZIV, D.; STEINITZ, B. 1985.** Clonal variability in response to light intensity during growth and to subsequent dark storage of *Ficus benjamina* and *Ficus retusa*. *HortScience* 20 (5): 934-936.
- BERGMANN, B.A.; SUN-Y. H.; STOMP, A. M. 1997.** Harvest time and nitrogen source influence in vitro growth of apical buds from Fraser fir seedlings. *HortScience* 32, 125-128.
- BISTRICHANOV, S.; HARALAMPIEVA, V.; KALOYANOVA, N. 1997.** Testing of different types of antibiotics against bacterial contamination in *Hydrangea hortensis* in vitro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 3 (6): 749-753.
- BLAKE, J. 1988.** Mites and thrips as bacterial and fungal vectors between plant tissue cultures. *Acta Horticulturae* 225: 163-166.
- BLOCK, R.; LANKES, C. 1995.** Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during in vitro establishment. *Gartenbauwissenschaft* 60 (6): 276-279.
- BLOCK, R.; LANKES, C. 1996.** Measures to prevent tissue browning of the explants of the apple rootstock M9 during in vitro establishment. *Gartenbauwissenschaft* 61 (1): 11-17.
- BORNMAN, C.H.; VOGELMANN, T.C. 1984.** Effect of rigidity of gel medium on benzyladenina induced adventitious bud formation and vitrification in in vitro *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 61: 505-512.
- BOUGERFAOUI, M.; ZAID, A. 1993.** The effect of the ammonium nitrate content of the culture medium on tissue vitrification of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) cultivars in vitro. *Al Awami* 82: 177-196.
- BOUMAN, H.; DE KLERK, G. J. 1996.** Somaclonal variation in biotechnology of ornamental plants. In: *Biotechnology of ornamental plants*. R. Geneve, J. Preece, S. Merkle (eds.). CAB International, 165-183.
- BOUZA, L.; JACQUES, M.; MAZIERE, Y.; ARNAUD, Y. 1992.** In vitro propagation of *Prunus tenella* Batsch. cv. "Firehill": control of vitrification; increase of the multiplication rate and growth by chilling. *Scientia Horticulturae* 52 (1-2): 143-155.



- BOUZA, L.; JACQUES, M.; MIGINIAC, E. 1994.** In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. Cv. "Mme de Vatry" developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase. *Scientia Horticulturae* 57 (3): 241-251.
- BOUZAR, H.; JONES, J.B.; HODGE, N.C. 1993.** Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *The American Phytopathological Society* 83: 733-739.
- BOXUS, P.; DRUART, P. BRASSEUR, E. 1978.** Rapport d'activités du Centre de Recherches de Gembloux: 126-127.
- BOXUS, P.; TERZI, J.M. 1987.** Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. *Acta Horticulturae* 212: 91-93.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. 1981.** Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of American Society of Horticultural Science* 106: 515-518.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C.S. 1981.** Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plum grown under different environments. *HortScience* 16: 173-175.
- BRAND, M.H. 1993.** Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35 (3): 203-209.
- BRAND, A.J.; BRIDGEN, M.P. 1989.** "Uconn White": a white flowered *Torenia fournieri*. *HortScience* 24 (4): 714-715.
- BROOME, C.; ZIMMERMAN, R.H. 1978.** In vitro propagation of blackberry. *HortScience* 13(2): 151-153.
- BROSCHAT, T.K.; DONSLMAN, H. 1985.** Wounding method affects rooting and water conductivity in air layered foliage plants. *Foliage Digest* 8 (10): 1-4.
- BUCKLEY, P.M.; DE WILDE, T.N.; REED, B.M. 1995.** Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 31P: 58-64.
- BUNN, E.; DIXON, K.W. 1992.** Micropropagation of *Stirlingia latifolia* (Protaceae), an important cut flower from Western Australia. *HortScience* 27 (4): 368.
- BUNN, E.; DIXON, K.W. 1992.** Micropropagation of the pineapple lily, *Dasypogon hookeri* J. Drumn. *HortScience* 27 (4): 369.
- CABALLERO, M.; CID, M.C. 1998.** El material vegetal en la viverística de plantas ornamentales. *Producción de plantas ornamentales.* 17-23)
- CABONI, E.; TONELLI, M.; FALASCA, G.; DAMIANO, C. 1996.** Factors affecting adventitious shoot regeneration in vitro in the apple rootstock "Jork 9". *Advances in Horticultural Science* 10 (3): 146-150.
- CAMPOS, R.; REED, DW. 1994.** Influence of irrigation water salinity on optimal nitrogen, phosphorus, and potassium liquid fertilizer rates for *Spathiphyllum* "Petite". *Journal of Environmental Horticulture* 12 (2): 104-107.
- CAPELLADES, M.; VANDERSCHAEGE, A.; LEMUER, R, DEBERGH, P. 1990.** How important is photosynthesis in micropropagation? In: Sagwan, R.S.; Sangwan-Norreel, B.S. (Eds) *The Impact of Biotechnology in Agriculture.* Kluwer Academic Publs, Dordrecht.

- CAPELLADES, M; BERUTO, M; VANDERSCHAEGE, A; DEBERGH, P.C. 1991.** Ornamentals. In P.C. Debergh&R.H. Zimmerman (eds.) Micropropagation: 215-229. Kluwer Academic publisher.
- CASSELLS, A.C. 1986.** Production of healthy plants. In Proceedings of the Institute of Horticulture Symposium: Micropropagation in Horticulture. Eds. Alderson, P.G.; Dullforce W.M. Nottingham: University of Nottingham Trent Print Unit. pp. 53-71.
- CASSELLS, A.C. 1990.** Setting up a commercial micropropagation laboratory. In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag, Berlín.
- CASSELLS, A.C. 1991.** Problems in tissue culture: culture contamination, In. PC Debergh y R. H. Zimmerman (eds.) Micropropagation, 31-44. Kluwer Academic Publishers.
- CASSELLS, A.C.; TAHMATSIDOU, V. 1996.** The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 15-26.
- CASSELLS, A.C.; WALSH, C. 1994.** The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37 (2): 171-178.
- CASSELLS, A.C.; HARMEY, M.A.; CARNEY, B.F.; MC CARTHY, E.; MC HUGH, A. 1988.** Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium domesticum*: the use of *Xanthomonas pelargonii*-specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plants. *Acta Horticulturae* 225: 153-161.
- CATÁLOGO DE PLANTAS DE MACETA. OFICINA HOLANDESA DE FLORES. 1997/1998.** Bloemenbureau Holland. P.O. Box 9324. 2300 PH Leiden/Holland.
- CEULEMANS, R.; ASSCHE, F. VAN; IMPENS, I. 1985.** Effect of temperature on CO<sub>2</sub> exchange rate and photosynthetic light reactions in different ornamental plants. *Gartenbauwissenschaft*, 50: 5, 230-236.
- CEULEMANS, R.; GABRIELS, R.; IMPENS, I. 1983.** Effect of fertilization level on some physiological, morphological and growth characteristic of *Ficus benjamina*. *Physiologia Plantarum* 59 (2): 253-256.
- CHASE, A.R.; STALL, R.E.; HODGE, N.C.; JONES, J.B. 1992.** Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological, and fatty acid analysis. *Phytopathology* 82: 754-759.
- CHEVRE, A.M.; GILL, S.S.; MOURAS, A.; SALESSES, G. 1983.** In vitro vegetative multiplication of chestnut. *Journal of Horticultural Science* 58: 23-29.
- CHIARIOTTI, A.; ANTONELLI, M. 1988.** The effect of 6-BAP and adenine sulphate on peach shoot proliferation. *Acta Horticultura* 227, 418-420.
- CHOUDARY, M.L.; PRAKASH, P. 1993.** Effect of different levels of agar and MS macro salts on the production of hardened carnation in vitro. *Advances in Horticulture and Forestry* 3: 165-169.
- CHRISTIANSEN, J.; FONNESBECH, M. 1975.** Prevention by polyvinylpyrrolidone of growth inhibition of *Hamamelis* shoot tips grown in vitro and browning of the agar medium. *Acta Horticulturae* 54: 101-104.
- CID M.C., CABALLERO M., LOPEZ D. 1990.** Desarrollo de nuevos cultivos en Horticultura Ornamental. *Hortofruticultura*, 7: 45-49

- COLLAND, R.C.; JOINER, J.N.; CONNOVER, C.A.; MCCONNELL, D.B. 1977.** Influence of shade and fertilizer on light compensation point of *Ficus benjamina* L. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 102 (4): 447-449
- CONOVER, C.A.; POOLE, R.T. 1977.** Effects of cultural practices on acclimatization of *Ficus benjamina* L. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 5: 529-531.
- CONOVER, C.A.; POOLE, R.T. 1978.** Production of *Ficus elastica* "Decora" standards. *HortScience* 13 (6) sect. 1: 707-708)
- CORMIER, F.; CREVIER, H.A.; DO, C.B. 1990.** Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Canadian Journal of Botany* 68 (8): 1822-1825.
- CURTIS, O.F.; SHETTY, K.; CRAKER, L.E.; NOLAN, L. 1996.** Growth medium effects of vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of in vitro propagated oregano clones. *Acta Horticulturae* 426: 489-497.
- DALAL, M.A.; SHARMA, B.B.; MIR, N.A.; SAHNI, C.K. 1993.** Initiation culture mode and subculturing in in vitro culture of grapevine-control of oxidative browning. *Annals of Agricultural Research* 14 (2): 168-172.
- DALAL, M.A.; SHARMA, B.B.; SRINIVASA RAO, M.; RAO, M.S. 1992.** Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in in vitro cultures of grapevine. *Scientia Horticulturae* 51 (1-2): 35-41.
- DE PROFT, M.; MAENE, L.J.; DEBERGH, P. 1985.** Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia soulangeana* cultured in vitro. *Physiologia Plantarum* 65: 375-379.
- DE SIQUEIRA, E.R.; INOUE, M.T. 1991.** Controlling oxidation in the tissue culture of coconut. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 26 (7): 949-953.
- DEBERGH, P.C. 1983.** Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum* 59: 270-276.
- DEBERGH, P.C.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. 1992.** Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 135-140.
- DEBERGH, P.C.; DE WAEL, J. 1977.** Mass propagation of *Ficus lyrata*. *Acta Horticulturae* 78: 361-364.
- DEBERGH, P.C.; HARBAOUI, Y.; LEMEURE, R. 1981.** Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia plantarum* 53: 181-187
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. 1981.** A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture, *Scientia Horticulturae*. 14, 335-345
- DEBERGH, P.C.; VANDERSCHAEGHE, A.M. 1988.** Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue culture. *Acta Horticulturae*. 255: 53-56.
- DEIMLING, G.; MÖLLERS, C. 1988.** Aseptic handling of potato material during protoplast isolation and regeneration. *Acta Horticulturae* 225: 209-215.
- DEROOSE R. 1994.** Variety "Reginald". Application n° 92/108. *Plant Varieties Journal* 7 (3): 16-17.

- DILLEN, W.; BUYSSENS, S.; 1989.** A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 181-188.
- DILLEN, W.; DIJKSTRA, I.; OUD, J. 1996.** Shoot regeneration in long-term callus cultures derived from mature flowering plants of *Cyclamen persicum* Mill. 1996. *Plant Cell Reports* 15 (7): 545-548.
- DONNAN, A., JR., DAVIDSON, S.E. AND WILLIAMS, C.L., 1978.** Establishment of tissue culture growth plants in the greenhouse environment. *Proceedings of the Florida State of Horticultural Society* 91: 235-237.
- DONNAN, A. JR.; HICKERSON, NE. 1994.** "Variety: "Sandra". Application no. 93/035". *Plant Varieties Journal* 7 (1): 23-24, 21.
- DRUARD, P. 1988.** Regulation of axillary branching in micropropagation of woody fruit species. *Acta Horticulturae* 227: 369-380.
- DRUARD, P. 1995.** C-source and growth response of *Prunus glandulosa* "Sinensis" Thund. and *Malus pumila* Mill. M26 and M9 clone 29 during in vitro propagation. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux* 30 (1-2): 29-37.
- DUNBAR, K.B.; STEPHENS, C.T. 1989.** An in vitro screen for detecting resistance in *Pelargonium* somaclones to bacterial blight of geranium. *Plant Disease* 73 (11): 910-912.
- EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. 1975.** Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. *HortScience* 10: 608-610.
- EL BAHR, M.K.; EL GIZAWY, A.M.; MOURSY, H.A.; BEKHEET, S.A. 1993.** Factors affecting the establishment of in vitro globe artichoke cultures. *Annals of Agricultural Science Cairo* 2: 751-753.
- EL HADRAMI, I.; HOUSTI, F.; MICHAUX FERRIERE, N.; CARRON, M.P.; D'AUZAC, J. 1993.** Effects of gellings agents and liquid medium on embryogenic potential, polyamines and enzymatic factors in browning in *Hevea brasiliensis* calli. *Journal of Plant Physiology* 141 (2) 230-233.
- EL MARDI, M.O.; RIVERA, F.A.; AL SADDI, N.A.; CONSOLACIÓN, E. 1993.** Variation in somaclonal progeny of *Saintpaulia* as influenced by explant phenotype. *Indian Journal of Horticulture* 50 (1): 84-88.
- ELTORKY, M.G.M. 1993.** Control of flowering and improvement of some morphological characters in *Spathiphyllum* X Mauna Loa by gibberelic acid. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 38 (1): 271-282.
- ENJALRIC, F.; CARRON, M.P.; LARDET, L. 1988.** Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horticulturae* 225: 57-65.
- EVANS, D.A. 1989.** Somaclonal variation-Genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics* 5: 46-50.
- FALKINER, F.R. 1988.** Strategy for the selection of antibiotics for use against common bacterial pathogens and endophytes of plants. *Acta Horticulturae*. 225: 53-56.
- FALKINER, F.R. 1990.** The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. *Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture* 60: 13-23.

- FEITO, I.; RODRIGUEZ, A.; CENTENO, M.L.; SANCHEZ-TAMES, R.; FERNANDEZ B. 1994.** Effect of the physical nature of the culture medium on the metabolism of benzyladenina and endogenous cytokinins in *Actinida deliciosa* tissue cultured in vitro. *Physiologia Plantarum* 91 (3): 449-453.
- FERNANDEZ, M. 1997.** Intercambios comerciales y estrategias de marketing. *Horticultura*. Extra 15 aniversario. 79-84.
- FINNIE, J.F.; ACKERMANN, C.; STADEN, J. 1989.** *In vitro* culture of guayule using pretreated seeds. *HortScience* 24: 5, 836-837.
- FIROOZABADY, E.; MOY, Y.; COURTNEY-GUTTERSON N.; ROBINSON, K. 1994.** Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. *Bio/Technology* 12: 609-613.
- FISSE, J.; BATALLE, A.; PERA, J. 1987.** Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. *Acta Horticulturae* 212: 87-90.
- FITCHET-PURNELL, M. 1990.** Dimple guava established in tissue culture. *Inligtingsbulletin Navorsingsinstituut vir Sitrus en Subtropiese Vrugte* 212: 5.
- FRANCK, T.; KEVERS, C.; GASPAR, T. 1995.** Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L. raised in vitro. *Plant Growth regulation* 16 (3): 253-256.
- FREY, L.; JANICK, J. 1991.** Organogenesis in carnation. *Journal of The American Society for Horticultural Science* 116 (6): 1108-1112.
- GARCÍA-PITARCH, A.; MORENO, V. 1991.** SvFl-“Ivonne”: a variegated somaclon mutant from *Ficus lyrata*. *Acta Horticulturae* 289: 227.
- GARCÍA-PITARCH, A.; GARCÍA-SOGO, B.; SALA, E.; MORENO, V. 1995a.** SvFb-“Mallorca”: un nuevo variante somaclonal de *Ficus benjamina*. VI Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Barcelona.
- GARCÍA-PITARCH, A.; SALA, E.; GARCÍA-SOGO, B.; MORENO, V. 1995b.** SvFb-“Mallorca”: un nuevo variante somaclonal de *Ficus benjamina*. Patente ref. P9500786 (24 de Abril de 1995).
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. 1987.** Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga, J.M. y Durzan D. C. (Eds) *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 1 (pp 152-166). Kluwer Academic Press Publ, Dordrecht.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. 1984.** Plant propagation by tissue culture. Eversley, Basingstokek: Exegetics ltd. pp. 88-93.
- GEORGE, K.L.; FALKINGHAM, J.O. 1986.** Selective medium for the isolation and enumeration of *Mycobacterium avium*-intracellulare and *M. scrofulaceum*. *Canadian Journal of Microbiology* 32: 10-14.
- GERTNERE, D. 1992.** Influence of hormone on woody plant, particularly *Rhododendron*, tissue culture growth and development. *Eksperimentine Biologija* 3-4: 36-37.
- GI, H.S.; TSAY, H.S. 1989.** Anther culture and somaclonal variation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Journal of Agricultural Research of China* 38 (3): 346-352.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A.; 1991.** Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. *HortScience* 26 (8): 1083.

- GRIESBACH, R.J. 1989.** Selection of a dwarf *Hemerocallis* through tissue culture. *HortScience* 24 (6): 1027-1028.
- GRIESBACH, R.J.; SEMENIUK, P. 1987.** Use of somaclonal variation in the improvement of *Eustoma grandiflorum*. *Journal of Heredity* 78 (2): 114-116.
- GROUT, B.W.W.; ASTON, H. 1987.** Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture 1. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Horticultural Research* 17: 1-7.
- GRUSELLE, R.; NICAISE, C.; BOXUS, P. 1995.** Regulation of in vitro shoot multiplication in Persian walnut by different carbon sources and ammonium phosphate. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux* 30 (1-2): 47-53.
- GUNSON, H.E.; SPENCER-PHILIPS, P.T.N. 1994.** Latent bacterial infections: Epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. In: *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. J.R. Nicholas, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 379-396.
- GUNUA, T.G. 1997.** Effect of contaminants in tissue cultures of taro (*Colocasia esculenta*). *Papua New Guinea Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries* 40:1-2.
- GUPTA, P.K.; NADGIR, A.L.; MASCARNHAS, A.; JAGANNATHAN, V. 1980.** Tissue culture of forest tree: clonal multiplication of *Tectoni grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science Letter* 17: 259-268.
- HADI, M.Z.; BRIDGEN, M.P. 1996.** Somaclonal variation as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia fourmieri* "Compact Blue". *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 43-50.
- HAKKAART, F.A.; VERSLUIS, J.M.A. 1983.** Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Neth Journal of Plant Pathology* 89: 47-53.
- HAMEED, S.; AHMAD, Z.; KHAN, F.Z.; AKRAM, M. 1993.** Callus cultures of *Rosa hybrida* cultivars, Diamond Jubly and Lans France. *Pakistan Journal of Botany* 25 (2): 193-198.
- HAMMATT, N. 1993.** Micropropagation of fastigiata bird cherry (*Prunus padus* L.) and adventitious shoot formation from leaves. *Journal of Horticultural Science*. 68 (6): 975-981.
- HAN, B.H.; PAEK, K.Y.; CHOI, J.K. 1991.** Micropropagation of *Gypsophila paniculata* using shoot tip culture in vitro. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 32 (3): 394-400.
- HARIKRISHNAN, K.N.; MARTIN, K.N.; ANAND, P.H.M.; HARIHARAN, M. 1997.** Micropropagation of sweetflag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 19 (2): 427-429.
- HAUSER, B.; LEINMULLER, C.; WALZ, F. 1995.** Micropropagation of *Pelargonium grandiflorum* hybrids. II. Effect of basal medium, gelling agent, and closure of test tube. *Gartenbauwissenschaft* 60 (2): 62-65.
- HDIDIER, C.; DESJARDINS, Y. 1993.** Prevention of shoot vitrification of strawberry micropropagated shoots proliferated on liquid media by new antivitrifying agents. *Canadian Journal of Plant Science* 73 (1): 231-235.
- HE, Q.Y.; ZHANG, D.F.; WANG, R.H. 1995.** A preliminary study on preventing browning of sucker explants from banana by ascorbic acid pretreatment. *Journal of South China Agricultural University*. 16 (3): 79-82.

- HELL, B. TER.; HENDRIKS, L.; TER-HELL, B. 1994.** The keeping quality of pot plants in the living room depends on cultural practices. *Gartenbau Magazin* 3 (4): 12-14.
- HELL, B. TER.; LUDOLPH, D.; HENDRIKS, L.; TER HELL, B. 1992.** *Ficus benjamina*: shorter growing period and better quality with the help of assimilation light. *Gartenbau Magazin* 1 (5): 32-34.
- HENDRIKS, L.; LUDOLPH, D. 1988.** Assimilation lighting of foliage plants. *Gartnerhorse und Gartenwelt* 88 (37): 1582-1585.
- HENLEY, R.W.; POOLE, R.T. 1989.** Evaluation of selected ornamental figs for interior use. *Proceedings of The Florida State Horticultural Society* 102: 119-123.
- HERNANDEZ PINA, M.C.; ABADÍA, J.; SALVADOR, A.; MORENO, V. 1987.** Variación somaclonal en calliclones primarios de melón para seis caracteres del fruto. En VI Jornadas de Selección y Mejora de Plantas Hortícolas, Murcia pp. 125-136.
- HESSAYON, D.G. 1982.** El experto en plantas de interior. Blume. Elfos. Barcelona.
- HILDEBRANDT, D.C., HENDSON, M.; SCHROTH, M.N. 1993.** Usefulness of nutritional screening for the identification of *Xanthomonas campestris* DNA homology groups and pathovars. *Journal Applied Bacteriology* 75: 447-455.
- HODGE, FM; MORGAN, JV. 1978.** Chemical induction of axillary bud development in *Ficus elastica* "Robusta". *Acta Horticulturae* 79: 133-138.
- HORSCH, R.B.; KING, J. 1983.** A cover contaminant of cultured plant cells: elimination of a *Hyphomicrobium* spp. From cultures of *Datura innoxia* (Mill.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2: 21-28.
- HOSOKI, T.; TAHARA, Y. 1993.** In vitro propagation of *Salvia leucantha* Cav. *HortScience* 28 (3): 226.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. 1983.** Meristem, shoot tip, and bud cultures. pp. 177-217. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada (eds.). Handbook of plant cell cultures: vol. 1, MacMillian, New York.
- IBRAHIM, K.M.; COLLINS, J.C.; COLLIN, H.A. 1992.** Characterization of progeny of *Coleus blumei* following an *in vitro* selection for salt tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28 (2): 139-145.
- JACQ, B.; TETU, T.; SANGWAN, R.S.; DE LAAT, A. 1993.** Efficient production of uniform plants from cotyledon explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Breeding* 110 (3): 185-191.
- JAIN, S.M. 1993.** Studies on somaclonal variation in ornamental plants. *Acta Horticulturae* 336: 365-372.
- JAIN, S. M; DE KLERK, G. J. 1998.** Somaclonal variati6n in Breeding and propagation of Ornamental Groups. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4 (2): 63-75.
- JIMENEZ MEGÍAS, R. 1998.** El interés económico de la viverística de plantas ornamentales. *Producci6n de Plantas Ornamentales*. Editor: José Fco. Ballester-Olmos y Anguís, pp. 11-16.
- JONES, J.B.; CHASE, A.R.; HARRIS, G.K. 1993.** Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Disease* 77: 553-558.

- JONES, N.B.; DRENNAN, P.M.; VAN STADEN, J. 1993.** Leaf anatomy, chloroplast organization and photosynthetic rate of hyperhydric *Eucalyptus saligna* Sm. material. *South African Journal of Botany* 59 (5): 551-555.
- JONES, J. B.; SLUIS, C.J. 1991.** Marketing of micropropagated plants, p. 141-154. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman(eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherlands
- JORDAN, M.; ITURRIAGA, L.; ROVERARO, C.; GOREUX, A. 1991.** Promotion of *Annona cherimola* in vitro shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. *Gartenbauwissenschaft* 56 (5): 224-227.
- KABIR, J.; SEN, S. 1990.** In vitro induction and maintenance of callus in lablab bean. *Horticultural Journal* 3 (1-2): 47-50.
- KAEPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. 1993.** DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In vitro Cell Development Biology* 29: 125-130.
- KAMOUN, R.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. 1998.** Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus cerasus* cv. "Montmorency". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 57-59.
- KANE, M.E. 1995.** Indexing explants and cultures to maintain clean stock. *In vitro* 31: 25A
- KATAEVA, N.V.; ALEXANDROVA, I.G.; BUTENKO, R.G.; DRAGAVTCEVA, E.V. 1991.** Effects of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27 (2): 149-154.
- KATAOKA, I.; INOUE, H.; SUBHADRABANDHU, S. 1992.** Factors influencing ex vitro rooting of tissue cultured papaya shoots. *Acta Horticulturae* 321: 589-597.
- KEITH, V.M.; BRAND, M.H. 1995.** Influence of culture age, cytokinin level, and retipping on growth and incidence of brooming in micropropagated *rhododendrons*. *Journal of Environmental Horticulture* 13 (2): 72-77.
- KELLER, E.R.J.; KHAN, M.A. 1997.** Introduction of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) into the in vitro collection of the Gatersleben genebank. *Plant Genetic Resources Newsletter* 112: 55-59.
- KEVERS, C.; GASPAR, T. 1985.** Soluble membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonialyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured in vitro. *Journal of Plant Physiology* 118: 41-48.
- KHILBAS, J.S. 1995.** Somaclonal variation in *Rudbeckia*. *Dirasat. Series B, Pure and Applied Sciences* 22 (1): 171-181.
- KIM, K.W.; BYUN, M.S. 1988.** Physiological and morphological characteristics of glaucous and vitreous carnation plantlets obtained in vitro. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 29 (3): 216-223.
- KIM, K.W.; BYUN, M.S.; KANG, M.S. 1988.** Effects of ABA and agar in preventing vitrification of carnation plantlets cultured in vitro. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 29: 208-215.
- KITTO, S. L. 1997.** Commercial Micropropagation. *HortScience* 32 (6): 1012-1014.
- KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. 1990.** Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest.



- KLIJN, N.; WEERKAMP, A.H.; DE VOS, W.M. 1991.** Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3390-3393.
- KNAPP, E.; HANZER, V; MENDONÇA, D.; DA CÂMARA MACHADO, A.; KATINGER, H.; LAIMER DE CÂMARA MACHADO, M. 1998.** Improved virus detection in rosaceous fruit trees in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 3-6.
- KNAUSS, J.F.; MILLER, J.M. 1978.** A contaminant, *Erwinia carotovora*, affecting commercial plant tissue cultures. *In vitro* 14: 754-756.
- KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. 1992.** Testing of different antibiotics against gram positive and gram negative bacteria isolated from plant tissue cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 29: 139-144.
- KRAFFKA, B.D.L.; SHUMWAY, C.R.; REED, D.W. 1990.** Foliage stock. Texas Nurseryman, September, 24-44.
- KRISTIASSEN, K. 1989.** Increasing growth in *Ficus benjamina*. Does it give better plants?. *Garten Tidende* 105 (50): 1256-1257.
- KRISTIANSEN, K. 1990.** Tissue propagation of *Ficus benjamina*. *Gartner Tidende* 106 (48): 1304-1305.
- KRISTIANSEN, K. 1992.** Micropropagation of *Ficus benjamina* CLEO. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28 (1): 53-58.
- KROMWIJK, A.; MOURIK, N. VAN. 1990.** Source material affects the longitudinal growth and branching of *Ficus benjamina*. *Vaklad voor de Bloemisterij* 45 (22): 50-51.
- KUMAR, DP; VIJAYAKUMAR, N; SULLADAMATH, UV. 1985.** Studies on nutritional status of parent plants in relation to rooting behaviour of *Ficus elastica* cultivars. *South Indian Horticulture* 33 (4): 283-285.
- LAKSHMANAN, P.; LEE, C.L.; GOH, C.J. 1997.** An efficient in vitro method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. *Plant Cell Reports* 16 (8): 572-577.
- LALIBERTE, S.; LALONDE, M. 1990.** Histology and ultrastructure of caulogenic callus cultures of *Larix X eurolepis*. *Canadian Journal of Botany* 68 (5): 979-989.
- LAMANNA, D.; CASTELNUOVO, M.; D'ANGELO, G. 1991.** Compost-based media as alternative to peat on ten pot ornamental. *Acta Horticulturae* 294: 125-129.
- LANERI, U. 1990.** A somaclonal variant in *Cymbidium*. *Acta Horticulturae* 280: 451-453.
- LANERI, U; FRANCORI, R.; ALTAVISTA, P. 1990.** Somatic mutagenesis of *Gerbera jamesonii* hybr.: irradiation and in vitro culture. *Acta Horticulturae* 280 : 395-402.
- LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, H. 1988.** Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of in vitro grown rose shoots. *Acta Horticulturae* 227: 305-310.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. 1981.** Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetic* 60: 197-214.
- LARKIN, P.J.; RYAN, S.; BRETTEL, R.; SCOWCROFT, W.R. 1984.** Heritable somaclonal variation in wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 76: 443-455.

- LAUZER, D.; VIETH, J. 1990.** Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L., cv. "Green Globe". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21 (3): 237-244.
- LE CAIN, D.R.; SCHEKEL, K.A.; WAMPLE, R.L. 1986.** Growth retarding effects of paclobutrazol on weeping fig. *HortScience* 21 (5): 1150-1152
- LEE, M. 1988.** The chromosomal basis of somaclonal variation. Annual Review of Plant Physiology. *Plant Molecular Biology* 39: 413-437.
- LEGATT, I.; WAITES, W.M.; LEIFFERT, C.; NICHOLAS, J.R. 1988.** Characterization of microorganisms isolated from plants during micropropagation. *Acta Horticulturae* 225: 93-102.
- LEIFERT, C.; 1990.** Contaminants of plant tissue cultures. Ph. D. Thesis, Nottingham University, School of Agriculture.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITES, W.M. 1992.** Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris*, and *Photinia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 29: 153-160.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V.A.; WAITES, W.M. 1991.** Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium*, cultures using antibiotics. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 307-330.
- LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. 1994.** Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field- grown plants: Reasons for contamination problems in vitro. *Critical Reviews in Plant Science* 13: 139-183
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M. 1990.** Contaminants of plant tissue cultures. *Newsletter of The IAPTC* 60: 2-13.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M. 1994.** Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. In: *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. P.J. Lumsden, J.R. Nicholas and W.J. Davies, eds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 363-378.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M.; NICHOLAS, J.R. 1989.** Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Bacteriology* 67: 353-361.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M.; CAMOTTA, H.; NICHOLAS, J.R. 1989.** *Lactobacillus plantarum*: a deleterious contaminant of plant tissue culture. *Journal of Applied Bacteriology* 67: 363-370.
- LEIFERT, C.; WOODWARD, S.; CASSELLS, A.C. 1998.** Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tissue Culture* 52: 83-88.
- LESHEM, B. 1983.** Growth of carnation meristems in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Annals of Botany* 52: 413-415.
- LESHEM, B.; SHALEV, D.P.; IZAHAR, S. 1988.** Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. *Annals of Botany* 61: 41-48.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. 1988.** The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany* 62 (3): 271-276.
- LETOUZÉ, R.; DAGUIN, F. 1983.** Manifestation spontanée d'une croissance anormale en culture in vitro. Recherche des marqueurs métaboliques. *Revue Canadienne de Biologie Experimentale* 42: 23-28.

- LETOUZÉ, R.; DAGUIN, F. 1987. Control of vitrification and hipolignification process in *Salix babylonica* cultured in vitro. *Acta Horticulturae* 212: 185-191.
- LEVERETT G.M. 1994. "Variety: "Caroline". Application no. 92/002". *Plant Varieties Journal* 7 (1): 9-10, 18.
- LEWANDOWSKI, I.; KAHNT, G. 1993. Possibilities of establishing an in vitro propagation system for *Miscanthus "Giganteus"*, using different plant parts as explant tissue. *Bodenkultur* 44 (3): 243-252.
- LI, S.J.; MENG, Z.; SHENG, F.J.; LI, D.B. 1992. Plant regeneration of mesophyll protoplasts from axenic of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Chinese Journal of Biotechnology* 8: 3, 249-254.
- LINDGREN, D.T.; MCCOWN, B. 1992. Multiplication of four *Penstemon* species in vitro. *HortScience*. 27 (2): 182.
- LININGTON, I.M. 1991. In vitro propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27 (1): 81-88.
- LIU, S.L.; HAN, B.W. 1989. Plant regeneration from excised embryos of *Juglans regia*. *Acta Phytophysiologica Sinica* 15 (1) 98-100.
- LOOMIS, W.D.; BATAILLE, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5: 423-438.
- LOOSE, R. DE. 1981. Mutation breeding of ornamental plants. *Verbondsnieuws voor de Belgische Sierteelt* 25 (10): 478-479.
- LLOYD, G.; MCCOWN. 1980. Commercially fesible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*). *Combined Proceedings of The International Plant Propagators Society* 30: 421-427.
- MADDOCK, S.E.; RISIOT, R.; PARMAR, S.; JONES, M.G.K.; SHEWRY, P.R. 1985. Somaclonal variation in the gliadin patterns of grains of regenerated wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 36: 1976-1984.
- MAENE, L.J.; DEBERGH, P.C. 1987. Optimalisation of the transfer of tissue cultured shoots to in vivo conditions. *Acta Horticulturae* 212: 335-348.
- MAES, M.; CREPEL, C.; WERBROUCK, S.; DEBERGH, P. 1998. Prespectives for a DNA-based detection of bacterial contamination in micropropagated plant tissue. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4 (1): 49-56.
- MAGNANI, G.; MALORGIO, F. 1995. Fertilizer application to pot plants of *Spathiphyllum* and *Dracaena*. *Colture Protette* 24 (9): 119-125.
- MALAURE, R. S.; BARCLAY, G.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. 1991a. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture 1. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by the regenerated plants. *Journal of Plant Physiology* 139 (1): 8-13.
- MALAURE, R. S.; BARCLAY, G.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. 1991b. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture 2 Securing narural mutations (sports). *Journal of Plant Physiology* 139 (1): 14-18.
- MANTELL, S.H. 1998. Microbes intimately associated with tissue and cell cultures of tropical *Dioscorea* yams. *Plant Cell Tissue, and Organ Culture* 52: 47-52.

- MARCOTRIGIANO, M.; JAGANNATHAN, L. 1988. *Pawlownia tormentosa* "Somaclonal Snowstorm". *HortScience* 23 (1): 226-227.
- MARCOTRIGIANO, M.; BOYLE, T.H.; MORGAN, P.A.; AMBACH, K.L. 1990. Leaf color variants from coleus shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115 (4): 681-686.
- MARGA, F.; VEBRET, L.; MORVAN, H. 1997. Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 49 (1): 1-5.
- MARTIN, C.A.; BORGARDT, S. 1994. Self watering container design and salinity effect growth of two foliage plants. *Journal of Environmental Horticulture* 12 (3): 170-173.
- MATHIAS, P.J.; ALDERSON, P.G.; LEAKEY, R.R.B. 1987. Bacterial contamination in tropical hardwood cultures. *Acta Horticulturae* 212: 43-48.
- MAYER, A.M.; HAREL, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.
- MCWILLIAMS, E. 1991. Standardizing Research Clones in Ornamental Horticulture. *HortScience* 26 (1): 1-7.
- MENSUALI-SODI, A.; PANIZZA, M.; SERRA, G.; TOGNONI, F. 1993. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue cultures. *Scientia Horticulturae* 54: 1, 49-57.
- METAKOVSKY, E.V.; NOVOSELSKAYA, A.YU; SOZINOV, A.A. 1987. Problems of interpreting results obtained in studies of somaclonal variation in gliadin proteins in wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 73: 764-766.
- MEYNET, J.; DUCLOS, A. 1990. *In vitro* culture of garden ranunculus (*Ranunculus asiaticus* L.). I. Neof ormation and micropropagation of plants from thalamus sections. *Agronomie* 10 (2) : 157-162.
- MEYNET, J.; DUCLOS, A. 1990. *In vitro* culture of garden ranunculus (*Ranunculus asiaticus* L.). III. Study of plants produced by somatic embryogenesis using surface tissues of anthers. *Agronomie* 10 (4): 285-290.
- MIGUENS, F.C.; LOURO, R.P.; MACHADO, R.D. 1993. A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura innoxiosa* plantlets cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32 (1): 109-113.
- MIN, G.M.; LEE, J.S. 1992. Growth responses and acclimatization of *Ficus benjamina* "WG-1" to changes in light conditions. *Journal of The Korean Society for Horticultural Science* 33 (1): 48-53.
- MIZUTANI, T.; TANAKA, T. 1994. Study on the floret culture of *Higo-chrysanthemum*. *Proceedings of Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University* 13: 9-14.
- MOES, E. 1975. Temperatures for *Ficus elastica* "Robusta". *Gartner Tidende* 49: 830-831.
- MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B.B. 1993. Effects of 6-benzyl amino purine (BAP) and sucrose on chlorophyll content in leaves of in vitro cloned papaya, *Carica papaya* var. Honey Dew. *Indian Journal of Experimental Biology* 31 (4): 338-341.
- MORENO, V. 1997. La selección somaclonal, una alternativa biotecnológica para la mejora de las plantas ornamentales. *En Biotecnología y Agricultura: Las plantas del futuro* (en prensa).

- MORENO, V.; GARCÍA-SOGO, B. 1993.** Variación somaclonal y su aplicación a la mejora genética de especies de cosecha. Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia.
- MORENO, V.; ROIG, L.A. 1990.** Somaclonal variation in Cucurbits. In Bajaj YPS (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 11. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg p. 435-464.
- MOSQUERA, T.; ANGARITA, A.; MONTES DE GOMEZ, V. 1992.** Elongation, clonal micropropagation and phenotypic evaluation of plantlets obtained from callus, cultured in presence of *Fusarium oxysporum* toxic material. *Acta Horticultura* 307: 257-263.
- MUHITCH, M.J.; FLETCHER, J.S. 1984.** Isolation and identification of the phenols of Paul's Scarlet rose stems and stem derived suspension cultures. *Plant Physiology* 75: 572-575.
- MULDERIJ, G.E. 1991.** Influence of postharvest light level on leaf drop and leaf necrosis of *Ficus benjamina* "Starlight". *Acta Horticulturae* 228: 153-159.
- MURASHIGE, T., 1974a.** Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- MURASHIGE, T., 1974b.** Propagation through tissue cultures. *HortScience* 9 (3): 2-3.
- MURASHIGE, T., 1976.** Clonal crops through tissue cultures. In: W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk (Editors), *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 392-403.
- MURASHIGE, T., 1978.** Principles of rapid propagation. In: Propagation of Higher Plants through Tissue Culture. A Bridge between Research and Application. *University of Tennessee Symposium Proceedings*, pp. 14-24.
- NAGAKUBO, T.; NAGASAWA, A.; OHKAWA, H. 1993.** Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32 (2): 175-183.
- NIN, S.; SCHIFF, S.; BENNICI, A.; MAGHERINI, R. 1994.** In vitro propagation of *Artemisia absinthium* L. *Advances in Horticultural Science* 8 (3): 145-147.
- NOMURA, K.; MATSUMOTO, S.; MASUDA, K.; INOUE, M. 1998.** Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M26. *Plant Cell Reports* 17 (8): 597-600.
- NOVOSELSKAYA, A.Y.; UPELNIK, V.P.; SUTKA, J.; GALIBA, G.; METAKOVSKY, E.V.; SOZINOV, A.A. 1987.** Studying somaclonal variation in wheat with the help of biochemical markers. In: Lasztity, R. y F. Bekes (eds.) *Proceedings of The Third International Workshop of Gluten Proteins*. World Scientific, Teaneck N.J. pp. 57-70.
- OGAWA, I.; IWAI, S.; AZUMA, T. 1994.** Flower induction of *Spathiphyllum patinii* by gibberellin A3 and miniaturization of flowering plants. *Bulletin of the Faculty of Biorresources, Mie University* 11: 191-197.
- OHISHI, K.; SAKURAI, Y. 1988.** Morphological changes in *chrysanthemum* derived from petal tissue. *Research Bulletin of the Aichi ken Agricultural Research Centre* 20: 278-284.
- ORLIKOWSKA, T. 1987.** Vitrification problem in the in vitro culture of fruit tree rootstock. *Acta Horticulturae* 212: 239-244.
- ORLIKOWSKA, T.; OLSZEWSKI, T. 1993.** Influence of agar brands on the multiplication of apple rootstock and on chemical and physical attributes of the media. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 1 (4): 115-125.

- PAEK, K.Y.; YU, K.J.; PARK, S.I.; SUNG, N.S.; PARK, C.H.; SVOBODA, K.P.(ED); LAUGHLIN, J.C. (ED); BROWN, V.E. 1995.** Micropropagation of *Rhemanina glutinosa* as medicinal plant by shoot tip culture and root segment culture. *Acta Horticulturae* 390: 113-119.
- PAQUES, M.; BOXUS, P. 1987.** A model to learn vitrification, the rootstock apple M.26. Present results. *Acta Horticulturae* 212: 193-210.
- PARRA, R.; AMO MARCO, J.B. 1996.** Effect of plant growth regulators and basal media on in vitro shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. *Biologia Plantarum* 38 (2): 161-168.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. 1988.** The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant, Cell and Tissue Organ Culture* 14: 31-40.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. 1994.** Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proceedings of The National Academy of Sciences of U.S.A* 91: 5222-5226.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; PESCHKE, V.M. 1990.** Do we understand somaclonal variation? In: Nijkamp, H.J.J et al. (eds). *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands pp. 131-141.
- PIAGNANI, C.; ECCHER, T. 1988.** Factors affecting the proliferation and rooting of chestnut in vitro. *Acta Horticulturae* 227: 384-386.
- PIERIK, R.L.M. 1987.** Sterilization of plant material. In: *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht)
- PIERIK, R. L. M. 1991.** Commercial aspects of micropropagation, p. 141-153. In. J. Prokash and R.L.M Pierik (eds.) *Horticulture- New technologies and application*. Kluwer Academic Publ., Netherlands).
- PIERIK, R.L.M.; RUIBING, M.A. 1998.** Developments in the micropropagation industry in the Netherlands. *Plant Tissue culture and biotechnology* 3 (3): 152-156.
- PIERIK, R.L.M.; VAN VOORST, A.; BOOY, G.; VAN ACKER, C.A.M.; LEVIVELT, C.L.C.; DE WIT, J.C. 1988.** Vegetative propagation of *Alstroemeria* hybrids in vitro. *Acta Horticulturae* 226: 81-89.
- PIMPINI, F; LUCCHIN, M; TESTOLIN, R. 1983.** The effect of the position of the leaf cutting on the branch and of auxin treatments on the rooting of *Ficus elastica* cuttings *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana* 67 (4): 299-313.
- PINDEL, A.; MICZYNSKI, K. 1996.** Regeneration of *Cymbidium* orchids from leaf and root explants. *Folia Horticulturae* 8: 2, 95-105.
- PONCHIA, G.; TONON, G. 1993.** Preliminary results of research on micropropagation of walnut. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 55 (1): 91-94.
- POGANI, M.F.; LINEBERGER, R.D. 1990.** Phenotypic variation during micropropagation of the chimeral *Rhododendron* "President Roosevelt". *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21 (3): 201-209.
- POOLE, R.T.; CONOVER, C.A. 1984.** Propagation of ornamental *Ficus* by cuttings. *HortScience.*, 19: 1, 120-121.

- POOLE, R.T.; CONOVER, C.A. 1988. Influence of paclobutrazol on foliage plants. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 101:319-320.)
- POOLE, R.T.; CONOVER, C.A. 1990. Leachate electrical conductivity and pH for ten foliage plants. *Journal of Environmental Horticulture* 8 (4): 166-172.
- PRAKASH, A.H.; RAO, K.S.; KUMAR, M.U. 1997. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. *Journal of Biosciences* 22: 3, 339-344.
- PRATHANTURARUG, S.; SCHAFFNER, W.; BERGER BUTER, K.; PANK, F. 1996. In vitro propagation of the Thai medicinal plant *Andrographis paniculata* Nees. *Proceedings. International Symposium. Breeding research on medicinal and aromatic plants* 2: 1, 304-306.
- PREECE, J.E.; IMEL, M.R.; SHEVADE, A. 1993. Regulation of *Rhododendron* PJM group plants from leaf explants. *American Rhododendron Society Journal* 47 (2) : 68-71.
- RAJBHANDARY, SB. 1992. Mass producing tissue cultured trees. *ACIAR Forestry Newsletter* No. 14: 1.
- RAMIREZ, A.; ANGARITA, A. 1990. Preliminary studies on in vitro clonal propagation of the Andes berry (*Rubus glaucus* L.). *Agronomia Colombiana* 7 (1-2): 17-25.
- RATHORE, T.S.; TANDON, P.; SHEKHAWAT, N.S. 1991. In vitro regeneration of pitcher plant (*Nepenthes khasiana* Hook. F.) a rare insectivorous plant of India. *Journal of Plant Physiology* 139: 2, 246-248.
- REED, B.M.; BUCKLEY, P.M.; DE WILDE, T.N. 1995. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular Development Biology* 31P: 53-57
- REED, B.M.; TANPRASET, P. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant tissue culture and Biotechnology*, Vol 1 N°3, 137-142.
- REEVES, J.C. 1998. Molecular diagnostics for pathogen detection in seeds and planting materials. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 33-39.
- REUTER, G. 1988. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under in vitro and greenhouse conditions. *Acta Horticulturae* 226: 91-98.
- RHODES, J.M.; WOOLTOTRON, L.S.C. 1978. The biosynthesis of phenolic compounds in wounded plant storage tissues. Pp. 243-286. In: G. Kahl (ed.). *Biochemistry of wounded plant tissues*. Walter de Gruyter and Co., Berlín.
- RÍODÁIN, F.Ó. 1992. The European plant tissue culture industry-1990. *Agronomie* 12: 743-746.
- RITCHIE, G.A.; SHORT, K.C.; DAVEY, M.R. 1991. In vitro acclimatization of *chrysanthemum* and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. *Journal of Experimental Botany* 42 (245): 1557-1563.
- ROBINSON, T. 1983. *The Organic Constituents of Higher Plants*. Fifth Edition. Cordus Press, North Amehrst, MA.
- ROMSTAD, K. 1989. High Temperature for *Ficus* is good economics. *Gartneryrket* 79 (1): 11-12.
- ROSU, A.; SKIRVIN, R.M.; BEIN, A.; NORTON, M.A.; KUSHAD, M.; OTTERBACHER, A.G. 1995. The development of putative adventitious shoots from a chimeral thornless rose (*Rosa multiflora* Thunb. Ex J. Murr.) in vitro. *Journal of Horticultural Science* 70 (6) : 901-907.

- ROUT, G.R.; DAS, P. 1994.** Somatic embryogenesis from callus cultures of *Simarouba glauca* Linn. *Indian Journal of Experimental Biology* 32:8, 581-583.
- RUGGE, B.A.; BRITS, G.J.; 1995.** Micropropagation of *Protea repens*. *Acta Horticulturae* 387: 121-127.
- RUGINI, E.; TARINI, P.; ROSSODIVITA, M.E. 1987.** Control of shoot vitrification of almond and olive grown in vitro. *Acta Horticulturae* 212: 177-183.
- RUGINI, E.; VERMA, B.C. 1983.** Micropropagation of difficult-to-micropropagate almond (*Prunus amygdalus* Batsch cultivars. *Plant Science Letters* 28: 273-281.
- RUTLEDGE, C.B.; DOUGLAS, G.C. 1988.** Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar in vitro. *Physiologia Plantarum* 72: 367-373.
- SARATHCHANDRA, T.M.; UPALI, P.D.; ARULPRAGASAM, P.V. 1990.** Progress towards the commercial propagation of tea by tissue cultura techniques. *Sri Lanka Journal of Tea Science* 59: 2, 62-64.
- SARRACINO, J.M.; MERRIT, R.; Y CHIN, C.K. 1992.** Morphological and physiological characteristics of *Leea coccinia* and *Leea rubra* in response lo light flux. *HortScience* 27 (5): 400-403.
- SATO,S.; HAGIMORI, M.; IWAI, S. 1993.** Recovering vitrified carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoots using Bacto-Peptone and its subfractions. *Plant Cell Reports* 12 (7-8): 370-374.
- SAVELA, ML; UOSUKAIEN, M. 1994.** Characterization of bacteria contaminating tissue cultures of apple rootstock YP. *Journal of Applied Bacteriology.* 76:4, 368-376)
- SCHREIBER, L.R.; DOMIR, S.C.; GINGAS, V.M. 1996.** Identificacion and control of bacterial contamination in callus cultures of *Ulmus americana*. *Journal of Environmental Horticulture* 14 (2): 50-52.
- SCHWENKEL, H.G; GRUNEWALDT, J; DE JONG, J. 1990.** Somaclonal variation in *Cyclamen persicum* Mill. after *in vitro* mass propagation. Integration of *in vitro* techniques in ornamental plant breeding. Proceedings, symposium, 10-14 November 1990, 62-67.
- SEABROCK, J.E.A.; FARRELL, G. 1993.** City water can contaminate tissue culture stock plants. *HortScience* 28: 628-629.
- SECOR, G.A.; SHEPARD. 1981.** Variability of protoplasts derived potato clones. *Crop Science* 21: 102-105.
- SENEVIRATNE, P.; FLEGMAN, A.W.; WIJESEKARA, G.A.S. 1995.** The problem of surface sterilization of shoot materials of *Hevea*. *Journal ef the rubber research Institute of Sri Lanka* 75: 51-60.
- SENEVIRATNE, P.; WISEJEKARA, G.A.S. 1994.** The growth phase and its effect on bud proliferation and growth of in vitro culture of *Hevea brasiliensis*. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka* 22 (4): 313-324.
- SEYRING, M. 1998.** Detection and identification of endophytic bacteria in plant tissue cultures of *Primula vulgaris* Huds. *Gartenbauwissenschaft* 63 (1): 27-33.
- SHEPARD, J. F. 1980.** Mutant selection and plant regeneration from mesophyll protoplasts. In: I. Rubinstein et al. (eds.). *Genetic Improvement of Crops: Emergent Techniques*. Univ. Minnesota Press. 185-215. Minnesota.



- SHEPARD, J. F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. 1980.** Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208: 17-24.
- SHETTY, K.; CARPENTER, T.L.; CURTIS, O.F.; POTTER, T.L. 1996.** Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysacchride isolated from *Pseudomonas* spp. *Plant Science Limerick* 120 (2): 175-183.
- SHETTY, K.; CURTIS, O.F.; LEVIN, R.E. 1996.** Specific intraction of mucoid strains of *Pseudomonas* spp. With oregano (*Origanum vulgare*) clones and the relationship to prevention of hyperhydricity in tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 149 (5): 605-611.
- SHETTY, K.; CURTIS, O.F.; LEVIN, R.E.; WITKOWSKY, R.; ANG, W. 1996.** Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiology* 147 (3-4): 447-451.
- SHIBATA, T.; ENDO, M. 1990.** The effects of gibberelic acid, night temperature and shading on the flowering of *Spathiphyllum*. *Bulletin of the Chiba Prefectural Agricultural Experiment Station* 31: 85-93.
- SHINGA, S.; BISONNETTE, G.K.; DOUBLE, M.L. 1987.** Methods for sterilising instruments contaminated with *Bacillus* sp. from plant tissue cultures. *Horticultural Science* 22: 659.
- SHORT, K.C.; WARBURTON, J.; ROBERTS, A.V. 1987.** In vitro hardening of cultured cauliflower plantlets to humidity. *Acta Horticulturae* 212: 329-334.
- SHUKLA, R.; KHAN, A.Q.; GARG, G.K. 1994.** In vitro clonal propagation of sugarcane: optimisation of media and hardening of plants. *Sugar Cane* 4: 21-23.
- SHURE, K.B.; HEINICK-KLING, T.; ACREE, T.E. 1994.** Inhibition of fungal infection using sulfite pads prior to initiation of callus from *Vitis labruscana* cv. Concord. *Vitis* 33 (3): 177-178.
- SHURES, C.; SAHRAWAT, A.K.; PRAKASH, D. 1997.** In vitro culture of *Pimpinella anisum* L. (anise). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 6 (2): 91-95.
- SIGEE, D.A.; 1993.** Bacteria as plant pathogens. In: *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects*. D.C. Sigee, ed. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1-12
- SINGH, H.P.; SAXENA, R.P.; SINGH, R.K.; SINGH, S. 1993.** In vitro bud break in axillary nodal segments of mature trees of *Acacia nilotica*. *Indian Journal of Plant Physiology* 36 (1): 21-24.
- SKIRVIN, R.M.; JANICK, J. 1976a.** Tissue culture induced variation in scented *Pelargonium* spp. *Journal of The American Society of Horticultural Science* 101: 281-290.
- SKIRVIN, R.M.; JANICK, J. 1976b.** "Velvet Rose" *Pelargonium*, a scented geranium. *HortScience* 11: 61-62.
- SKIRVIN, R.M.; MCPHEETERS, K.D.; NORTON, M. 1994.** Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience* 29 (11): 1232-1237.
- SMITH, E.F. 1992.** The preparation of micropropagated plantlets for transplantation. *Newsletter British Society for Plant Growth Regulation* 1: 3-4.
- SMITH, M.K.; DREW, R.A. 1990.** Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Australian Journal of Plant Physiology* 17: 267-289.
- SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. 1977.** High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L.Z. *Pflanzenphysiologia* 81: 395-408.

- SPARNAAIJ, L.D.; KOEHORST, H.J.J.; SEGERS, T.A.; DE JONG, J. (ED.). 1990.** The inheritance of premature flowering in regenerants from carnation ovaries. Integration of *in vitro* techniques in ornamental plant breeding. Proceedings, symposium, 10-14 November 1990. 62-67.
- STANDAERT-DE METSENAERE, R.E.A. 1991.** Economic considerations, p. 123-140. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherlands
- STANDARDI, A.; MICHELI, M. 1988.** Control of vitrification in proliferation shoots of M.26. *Acta Horticulturae* 227: 425-427.
- STEAD, E.D.; HENNESSY, J.; WILSON, J. 1998.** Modern methods for identifying bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 17-25.
- STEAD, D.E.; SELLWOOD, J.E.; WILSON, J.; VINEY, I. 1992.** Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *Journal Applied Bacteriology* 72: 315-321.
- STIEVE, S.M.; STIMART, D.P. 1993.** *Zinnia marylandica* tissue culture-induced variation and heritability. *Acta Horticulturae* 336: 389-398.
- STIMART ET AL. 1980.** Plants from callus of interspecific hybrid *Lilium* "Black Beauty". *HortScience* 15: 313-315.
- SUTER, E.G.; LANGHANS, R.W. 1982.** Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot tip culture. *Canadian Journal of Botany* 60: 2896-2902
- TANPRASERT, P.; REED, B. A. 1998.** Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 52: 53-55.
- TARMIZI, A.H.; MARZIAH, M.; HALIM, A.H.; DING, Y. 1993.** Effects of various concentrations of sucrose on growth and proline accumulation in oil palm polyembryonic cultures. *Proceedings of the First Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology*, Beijing, China, 20-24 August 1992. 365-368.
- TIAINEN, T. 1991.** The role of ethylene and reducing agents on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 10 (12): 604-607.
- TJOSVOLD, S.A. 1991.** Controlling height of mature potted foliage plants with the growth retardants B-Nine, Cycocel, Sumagic and Bonzi. *Flower and Nursery Report for Commercial Growers Cooperative Extension-University of California, Fall 6*
- TORRANCE, L. 1998.** Developments in serological methods to detect and identify plant viruses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 27-32.
- TOTH, K.; HAAPALA, T.; HOHTOLA, A. 1994.** Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. *Biologia plantarum* 36 (4): 511-517.
- TRIMBLE, R.; MEMBREY, S. 1991.** Kangaroo paw (*Anigozanthos hybrid*). Variety: "Lemon Whizz". Application no. 90/099. *Plant Varieties Journal* 4 (3): 18, 15.
- VANDERSCHAEGE, A.M.; DEBERGH, P.C. 1987.** Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. In Ducaté, G.; Jacob, M.; Simeon, A. (Eds) *Plant Micropropagation in Horticultural Industries* (pp 68-76) Presses Universitaires, Liège, Belgium.
- VAUGH, K.C.; DUKE, S.O. 1984.** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum* 60: 106-112.

- VERNIERE, C.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E.L.; GAMBIN, O.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; LUISETTI, J. 1993.** Evaluation of the biolig substrate utilization system to identify and asses metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 243-249.
- VIEITEZ J.; MULLER, M.; VEITEZ, A.M.; BALLESTER, A. 1988** Endogenous cytokinins, as determined by the ELISA test, in normal and vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. *Agricultura Mediterranea* 118 (4): 301-304.
- VISS, PR., BROOKS, EM AND DRIVER, JA. 1991.** A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 27P: 42
- VOGELEZANG, J.V.M. 1991.** Effect of root-zone and air temperature on growth, ornamental value and keepability of *Ficus benjamina* and *Schefflera arboricola* "Compacta". *Scientia Horticulturae* 46 (3-4): 301-311.
- VOGELEZANG, JVM. 1992.** Effect of root-zone and air temperature on flowering and growth of *Spathiphyllum* and *Guzmania minor* "Empire". *Scientia Horticulturae* 49 (3-4): 311-322.
- WAINWRIGHT, H.; ENGLAND, N. 1987.** The micropropagation of *Prosopis juliflora*: Establishment in vitro. *Acta Horticulturae* 212: 49-54.
- WALKEY, D.G.A. 1972.** Production of apple plantlets from axillary buds meristems. *Canadian Journal of Plant Science* 52: 1085-1087.
- WAND, J.F.; CAI, L.; JIA, Z.L.; ZHU,D. 1995.** Effect of 6 BA on the commodity characteristic of tissue cultured floribundum *Spathiphyllum* F1. *Acta Horticulturae* 404: 157-160.
- WANG, Q.C.; TANG, H.R.; QUAN, Q; ZHOU, G.R. 1994.** Phenol induced browning and establishment of shoot tip explants of "Fuji" apple and "Jinhua" pear cultured in vitro. *Journal of Horticultural Science* 69 (5): 833-839.
- WARDLE, K.; SHORT, K.C. 1983.** Stomatal responses of in vitro cultured plantlets I. Responses in epidermal strips of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators. *Biochem Physiol Planfen* 178: 619-624.
- WERBROUCK-SPO; DEBERGH, PC. 1995.** Imazalil enhances the shot-inducing effect of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* Schott. *Journal of Plant Growth Regulation* 14 (2): 105- 107.
- WERKER, E.; LESHEM, B. 1987.** Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Annals of Botany* 59: 377-385.
- WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. 1982.** Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (*Hamamelidaceae*) during acclimatization. *American Journal of Botany* 69: 1579- 1586.
- WICKREMESINHE, E.R.; ARTECA, R.N. 1993.** Establishment of fast-growing callus and root cultures of *Cephalotaxus harringtonia*. *Plant Cell Reports* 12 (2): 80-83.
- WILLIAMSON, B.; COOKE, D.E.L.; DUNCAN, J.M.; LEIFERT, C.; BREESE, W.A.; SHATTOCK, R.C. 1998.** Fungal infections of micropropagated plants at weaning: a problem exemplified by downy mildews in *Rubus* and *Rosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 89-96.
- WOOD, B.T. 1994.** Variety: "Citation" synonym "Curly Ben". Application n° 93/031. *Plant Varieties Journal* 7 (3): 19-27.

- ZHANG, B.H.; WANG, Q.L.; LI, F.G.; LI, F.L. 1996.** Occurrence of vitreous seedling and its regulation control in cotton tissue culture. *Acta Agriculturae Boreali Sinica* 11: 22-26.
- ZHU, Y.; YAZWA, S.; ASAHIRA, T. 1993.** Varietal differences in leaf color variation of plants regenerated from in vitro culture of leaf blade in *caladium* cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 62 (2): 431-435.
- ZIMMERMAN, R.H.; BARNHILL, J. 1991.** Commercial micropropagation in North America. In *Micropropagation: 173-180*. Kluwer Academic Publishers.
- ZIMMERMAN, T.W.; COBB, B.G. 1989.** Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* levels as influenced by media Gelrite and sucrose concentrations. *Plant Cell Reports* 8: 358-360.
- ZIMMERMAN, R.H.; JONES, J.B. 1991.** Commercial micropropagation in North America, p. 173-179. In: P.C. Debergh and R.H.Zimmerman (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publ., Dordrech, Netherlands.
- ZIV, M. 1986.** In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In Withers L. A., Alderson, P.G. (Eds) *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications* (pp 187-196) Butterworths, London.
- ZIV, M. 1989.** Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17: 101-110.
- ZIV, M.; ARIEL, T. 1988.** The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation in vitro. *Poceedings of The International Society of Plant Molecular Biology Congress*. Jerusalem: 425.
- ZIV, M.; KARSSSEN, C.M. (ed.); VAN LOON, L.C. (ed.); VREUGDENHIL, D. 1992.** The use of growth retardants for the regulation and acclimatization of in vitro plants. *Proceedings of te 14<sup>th</sup> international conference on plant growth substances, Amsterdam, 21-26 july*: 809-817.
- ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A.H. 1983.** Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 55-60.
- ZIV, M.; SCHWARTS, A.; FLEMINGER, D. 1987.** Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; implications for hardening. *Plant Science* 52: 127-134.
- ZOCCA, A.; BENINI, D. 1993.** Research on raising young *Ficus* plants. *Colture Protette* 22 (11): 87-92.
- ZUCHERELLI, G. 1979.** Moltiplicazione in vitro dei portainnesti clonali del pesco. *Frutticoltura* 41: 15-20.