



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Micropropagación de tres especies del genero *Hibiscus*

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller María Ingrid Botero Muñoz como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutora: Dra. Teresa Edith Vargas

**CARACAS, VENEZUELA
JULIO-2012**

DEDICATORIA

*A lo largo de la vida, te puedes dar cuenta o no, de las cosas que son verdaderamente importantes y las personas que estuvieron ahí, para darle aun más valor. Estudiar **BIOLOGIA**, representa parte de mi vida, a pesar de que quería estudiar otra carrera. Gracias a mi madre, note mi aprecio por las plantas. Cada mañana se levanta a regar sus plantas y siempre me hace saber que están vivas, que solo hay que cuidarlas.*

*Gracias a mi familia: **MI PADRE, MI MADRE, MI HERMANITA**, en este momento estoy entregando lo que había soñado desde hace mucho tiempo, ya que me dan su amor, su apoyo, su protección, su dedicación.*

ABUELOS ESTO TAMBIEN ES PARA USTEDES, LOS QUIERO MUCHO. ABUELITA STELLA ESPERO QUE ESTES ORGULLOSA DONDE QUIERAS QUE ESTES.

Las personas que nombrare continuación, no solo estoy agradecida con ellas, sino que también las quiero mucho, ya que, me formaron, me ayudaron en todo momento (claro todavía lo siguen haciendo), y representan para mi mucho.

AGRADECIMIENTOS

-  A Dios siempre creo en ti.
-  A mi tutora-madre Prof. Edith Vargas, por estar ahí cuando la necesito, por sus consejos, su apoyo, su amor...y SU PACIENCIA. La quiero mucho profe.
-  A mi novio Fernando, por amarme tanto, por no abandonarme cuando mas lo necesito, por escucharme, por darle solución a las cosas rápidamente..Gracias mi amor.
-  A mis amigos del laboratorio: GRECIO (te quiero mucho desde el 1er semestre, no solo por hacerme reir, sino por escucharme), AL PROFE LUIS, (tus consejos son adecuados para mi, ojala nunca cambies), A HECTOR (el negrito más lindo del laboratorio por su ayuda incondicional).
-  A Alejandra y a Vannessa mis amigas y compañeras de vida y de laboratorio.(pobrecita la profesora Edith con nosotras tres...jajaja).
-  A la profesora Eva de Garcia por ayudarme y darme consejos adecuados.
-  A estos profesores que me ayudaron a mi formación e influyeron mucho en mi y que me encantaban sus clases (orden aleatorio sin preferencias): Profs: MAIRA OROPEZA, LUIS HERMOSO, ANDREA MENENDEZ, ISELEN TRUJILLO, LOLI, EDITH VARGAS, RENATO DE NOBREGA, MAURICIO RAMIA, SHINGO NOSAWA, WILMER TEZARA, MARIA RAYMUNDEZ, MARCIA ESCALA, JESUS ROMERO, IRAMA CASALES, MARCIA TORO, ISMAEL HERNANDEZ.
-  Al equipo de Rugby UCV.
-  A la facultad de ciencias UCV.

🌺 A mis jurados Profesorass Iselen y Andrea por sus consejos, su apoyo y su disposición siempre.

🌺 Y a todos mis amigos de la carrera....SON MUCHOS PARA NOMBRARLOS...a todos los quiero.

🌺 A se me olvidaba...Virginia....muchas gracias por el mouse de la computadora....jajajaa

🌺 y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma me han acompañado de corazón.

MUCHAS GRACIAS

RESUMEN

El género *Hibiscus* spp. pertenece a la familia de las Malvaceae que son arbustos o árboles, y en menor frecuencia hierbas. Las especies del género *Hibiscus* además de ser utilizadas como plantas ornamentales, tienen importancia industrial y medicinal, ya que, las flores son utilizadas para la fabricación de mermeladas, jarabes y bebidas refrescantes; sirven como alimento para rumiantes, ovinos, cerdos y aves. A nivel medicinal el extracto de los cálices de la flor posee un alto porcentaje de fibra dietética, proteínas, minerales, vitaminas y una elevada capacidad antioxidante. Debido a la importancia de este género, en esta investigación se estableció sistemas de Micropropagación de tres especies de *Hibiscus* a partir de microesquejes, donde se probó los efectos de los reguladores de crecimiento (Benciladenina, Acido indolacetico y Thidiazuron, en las diferentes etapas. Tanto 1 y 2 mg/L de BA contribuyen a la inducción de brotes en los microesquejes. La mejor combinación para la multiplicación de microesqueje se obtiene con un medio MS suplementado con 1,5 mg/L de BA y 0.01 mg/L de AIA. *Hibiscus sabdariffa* es la especie de mayor respuesta a la inducción de la brotación, mientras que en la etapa de multiplicación las especies que poseen el mayor promedio de brotes por explante es *Hibiscus rosa-sinensis* cv *rosa-sinensis* (Cayena Doble) y *Hibiscus rosa-sinensis* cv *rosa-sinensis* (Cayena simple).

ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4-D Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA Ácido naftaleno-acético

AIA Ácido indol-acético

BA Bencil-adenina

cv. Cultivar

DKW sales básicas de medio de cultivo de Driver y Kuniyuki 1984

F-68 Fluorónico (Detergente no iónico)

HCl Ácido clorhídrico

K Cinetina

L Litros

mg/L Miligramos por litro

mM Milimolar

MS Medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog, 1962

m/v Porcentaje masa-volumen

NaOH Hidróxido

TDZ Thidiazuron

μM Micromolar

var. Variedad

INDICE GENERAL

I.	DEDICATORIA.....	I
II.	AGRADECIMIENTOS.....	II
III.	RESUMEN.....	IV
IV.	ABREVIATURA.....	V
V.	INDICE GENERAL.....	VI
VI.	INDICE DE FIGURAS.....	VIII
VII.	INDICE DE TABLAS.....	XIV
1.	INTRODUCCIÓN.....	1-2
2.	ANTECEDENTES.....	3-14
2.1.	Descripción botánica.....	4
	Taxonomía	
	Morfología y Anatomía	
2.2.	Importancia Económica.....	6
2.3.	Cultivo convencional de <i>Hibiscus</i> spp.....	8
2.4.	Micropropagación de <i>Hibiscus</i> spp.....	9
3.	OBJETIVOS.....	15
3.1.	Objetivo General	
3.2.	Objetivos Específicos	
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16-20
4.1.	Material vegetal.....	16
4.2.	Selección del explante.....	17
4.3.	Desinfección de los explantes.....	17
4.4.	Siembra de los explantes.....	18

4.5. Medios de Cultivo.....	19
4.6. Condiciones de Cultivo.....	20
4.7. Observaciones.....	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21-57
5.1. Establecimiento del cultivo.....	21
5.1.1. Desinfección de yemas	
5.1.2. Desinfección y germinación de semillas	
5.1.3. Desinfección de microesquejes.	
5.1.4. Cultivo in vitro de yemas	
5.1.5. Cultivo in vitro de microesquejes.	
6. CONCLUSIONES.....	58-61
7. BIBLIOGRAFÍA.....	62-70

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Germinación de semillas <i>Hibiscus sabdariffa</i>	22
Figura N°2: Porcentaje de contaminación para cada una de las especies de <i>Hibiscus</i> por tratamiento de desinfección al mes de cultivo.....	28
Figura N°3: Microesquejes de Cayena Doble contaminado (CONT) (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cv. <i>rosa-sinensis</i>) a los 15 días de cultivo.....	28
Figura N°4: Microesquejes de Cayena Simple contaminado (CONT) (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cv. <i>rosa-sinensis</i>) a los 15 días de cultivo.....	28
Figura N°5: Microesquejes de <i>Hibiscus mutabilis</i> contaminado (CONT) a los 15 días de cultivo.....	29
Figura N°6: Microesquejes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> contaminado (CONT) a los 15 días de cultivo.....	29
Figura N°7: Inducción a la Brotación de yemas de <i>Hibiscus mutabilis</i> a los 15 días de cultivo.....	30
Figura N°8: Microesquejes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> cultivados en MS a los 30 días del establecimiento del cultivo.....	35

Figura N°9: Microesquejes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> cultivados en MS+BA a los 30 días del establecimiento del cultivo.....	35
Figura N°10: Microesquejes de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cav. <i>rosa-sinensis</i> (cayena doble) cultivados en MS a los 30 días del establecimiento del cultivo.....	36
Figura N°11: Microesquejes de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cav. <i>rosa-sinensis</i> (cayena doble) cultivados en MS+BA a los 30 días del establecimiento del cultivo.....	36
Figura N°12: Microesquejes de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cav. <i>rosa-sinensis</i> (cayena simple) a los 30 días del establecimiento del cultivo.....	36
Figura N°13: Microesquejes de <i>Hibiscus mutabilis</i> (cayena doble) cultivados MS a los 30 días del establecimiento del cultivo.....	37
Figura N°14: Microesquejes de <i>Hibiscus mutabilis</i> (cayena doble) cultivados en MS+BA a los 30 días del establecimiento del cultivo.....	37
Figura N°15: Porcentaje de brotación de yemas (microesquejes) por especie al primer mes de cultivo en los medios MS2 y MS3 en el establecimiento del cultivo.....	37
Figura N°16: Porcentaje de brotación por especie al primer mes de cultivo en los medios MS2 y MS3, al mes de cultivo.....	42

- Figura N°17:** Porcentaje de formación de callos por especie al primer mes de cultivo en los medios MS2 y MS3, en la etapa de inducción a la brotación.....42
- Figura N°18:** Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 1 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.....43
- Figura N°19:** Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 2 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.....44
- Figura N°20:** Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena doble) cultivados en 1 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.....44
- Figura N°21:** Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena doble) cultivados en 2 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.44
- Figura N°22:** Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* cultivados en 1 mg/L de BA.....45
- Figura N°23:** Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* cultivados en 2 mg/L de BA en la inducción a la brotación.....45

Figura N°24: Microesquejes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> cultivados en 1 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.....	45
Figura N°25: Microesquejes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> cultivados en 2 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.....	46
Figura N°26: Promedio de brotes por explante para cada una de las especies al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.....	48
Figura N°27: Porcentaje de formación de callos por especie al primer mes de cultivo en los medios MS4 y MS5.....	49
Figura N°28: Microesquejes de <i>Hibiscus rosa-sinensis cv rosa-sinensis</i> (cayena simple) cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA en la etapa de multiplicación.....	54
Figura N°29: Microesquejes de <i>Hibiscus rosa-sinensis cv rosa-sinensis</i> (cayena simple) cultivados en 2 mg/L de BA y 0.5 mg/L TDZ al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.....	54
Figura N°30: Microesquejes de <i>Hibiscus rosa-sinensis cv rosa-sinensis</i> (cayena doble) cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.....	54

- Figura N°31:** Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis cv rosa-sinensis* (cayena doble) cultivados en 2 mg/L de BA y 0.5 mg/L TDZ al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.....55
- Figura N°32:** Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA al mes de cultivo con brotes y callos, en la etapa de multiplicación.....55
- Figura N°33:** Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA en la etapa de multiplicación.....55
- Figura N°34:** Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 2 mg/L de BA y 0.5 mg/L TDZ al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.....56
- Figura N° 35:** Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis cv. rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 2 mg/L de BA con callo al mes de cultivo.....56
- Figura N° 36:** Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis cv. rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 1, mg/L de BA+0,01 mg/L de AIA con callo al mes de cultivo.....56
- Figura N°37:** Corte transversal del explante con callo de *Hibiscus rosa-sinensis cv. rosa-sinensis* en la etapa de multiplicación.....57

Figura N°38: Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 2 mg/L de BA+0,
mg/L de TDZ con callo al mes de cultivo.....57

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Tratamientos aplicados para la desinfección de las yemas y microesquejes para tres especies de <i>Hibiscus</i>	17
Tabla N°2: Tratamiento aplicado para la desinfección de semillas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> (Flor de Jamaica).....	18
Tabla N° 3: Medios de cultivo para las diferentes etapas de micropropagación para las tres especies de <i>Hibiscus</i>	19
Tabla N°4: Porcentaje de explantes sobrevivientes y contaminados para las tres especies de <i>Hibiscus</i>	27.
Tabla N°5: Tiempo de respuesta a la brotación de yemas y microesquejes en medio MS sin reguladores de crecimiento y con reguladores de crecimiento de las tres especies de <i>Hibiscus</i>	34
Tabla N°6: Porcentaje de explantes con formación de brotes y callos para dos concentraciones de Benciladenina (BA) al mes de cultivo.....	41
Tabla N°7: Contrastación del genotipo y medio de cultivo para la inducción de la brotación.....	43

Tabla N°8: Contrastación del genotipo y medio de cultivo para la formación de callo en la inducción de brotes.....	43
Tabla N°9: Números de brotes por explante para cada una de las especies al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.....	47
Tabla N°10: Porcentaje de explantes con callos en la etapa de multiplicación al mes de cultivo.....	49
Tabla N°11: Contrastación del genotipo y medio para la multiplicación de brotes.....	53
Tabla N°12: Contrastación del genotipo y medio para la multiplicación (formación de callo)	53
Tabla N°13: Contrastación del genotipo y medio para la multiplicación (brotes por explante).....	53

INTRODUCCIÓN

El género *Hibiscus* pertenece a la familia de las Malvaceae que son arbustos o árboles, y en menor frecuencia hierbas. Los géneros más importantes del Nuevo Mundo son *Hibiscus*, *Lavatera*, *Abutilon*, y *Malva*, mientras que en la vegetación venezolana, la familia Malvaceae posee 30 géneros y alrededor de 130 especies (Ricardi, 1992). Desde la introducción de *Hibiscus* en Europa en el siglo XVIII, han sido obtenidos muchos híbridos, principalmente en Hawái y Florida, pudiéndose cifrar en cientos los cultivares actuales ⁽¹⁾.

Las especies del género *Hibiscus* además de ser utilizadas como plantas ornamentales, tienen importancia industrial y medicinal, ya que de sus fibras se extrae pulpa para papel; las flores son utilizadas para la fabricación de mermeladas, encurtidos, jarabes y bebidas refrescantes; son un colorante natural, saborizante y sirven como alimento para rumiantes, ovinos, cerdos y aves. A nivel medicinal, el extracto de los cálices de la flor posee un alto porcentaje de fibra dietética, proteínas, minerales, vitaminas y una elevada capacidad antioxidante; pero, además de eso se han evidenciado efectos positivos como hipotensor, vaso-relajante y cardioprotector (Sáyago y Goñi et al., 2010).

En Venezuela, *Hibiscus mutabilis* L. y *Hibiscus rosa-sinensis* L. (cayenas) son especies ornamentales muy apreciadas paisajísticamente, por su gran follaje y el color de sus flores. Tradicionalmente se emplean como cercas naturales. El follaje y las semillas de *H. rosa-sinensis* L. son utilizadas como alimento y en la dieta integral de los ovinos, rumiantes y aves, debido a su alto potencial nutricional, su contenido de

proteínas y su rápida degradación (Flores et al., 1998). En la medicina casera, las flores de esta especie se usan como sedante (Lezama et al., 2007). *Hibiscus sabdariffa* L. (Flor de Jamaica) en la actualidad ha adquirido auge y un gran valor comercial, utilizándose las flores en la elaboración de mermeladas, infusiones, bebidas refrescantes y diuréticas (Sylvère et al., 2010).

Siendo estas especies tan importantes, al propagarlas por estaca su crecimiento es rápido, pero posee una vida corta; además requieren de un lugar protegido, soleado, con suelo fértil, bien drenado, ya que, estas especies son sustento de larvas, pulgones y hongos (Hoyos, 1990). Según la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), en la actualidad *Hibiscus rosa-sinensis* es una de las especies en peligro de extinción ⁽⁸⁾.

En los últimos años en Venezuela, ha habido un gran auge en el consumo de bebidas a base de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica). Sin embargo, el cultivo no se produce a gran escala. Por el valor comercial y las dificultades que presentan las especies del género *Hibiscus* para Venezuela y el Mundo, en este trabajo se planteó la micropropagación de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (Cayena Simple), *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (Cayena Doble), *Hibiscus mutabilis*, *Hibiscus sabdariffa*, ya que es una técnica que permite lograr la rápida multiplicación en condiciones asépticas de numerosas especies vegetales con gran importancia económica, (Govinden et al., 2009).

ANTECEDENTES

Descripción botánica

Taxonomía

El género *Hibiscus* fue descrito por primera vez por Linneo y publicado en *Specie Plantarum* 2:693 en el año de 1753. Pertenece al grupo de las Dicotiledóneas, Clase Equisetopsida (C. Agardh), Subclase Magnoliidae (Novák. ex Takht.), Superorden Rosanae (Takht), Orden Malvales (Juss.), Familia Malvaceae (Juss)⁽²⁾. Las especies seleccionadas para el proceso de propagación son: *Hibiscus mutabilis* L., *Hibiscus rosa-sinensis* L. e *Hibiscus sabdariffa* L.

Hibiscus mutabilis fue por primera vez descrita por Linneo y publicada en el *Species Plantarum* 2: 694 en el año de 1753⁽⁶⁾. Su sinonimia: *Abelmoschus mutabilis* ((L.) Wall. ex Hassk.), *Hibiscus immutabilis* (Dehnh.), *Hibiscus mutabilis* fo. *plenus* (S.Y. Hu), *Hibiscus sinensis* (Mill.), *Ketmia mutabilis* ((L.) Moench)⁽⁷⁾, y sus nombres comunes: confederate rose, cotton rosemallow, rosa de mayo, hibisco, entre otros.

Hibiscus rosa-sinensis fue por primera vez descrita por Linneo y publicada en el *Species Plantarum* 2:694 en el año 1753⁽³⁾, y sus nombres comunes son: cayena, hibisco, rosa de china, flor de beso, cardenales, pacífico, entre otros.

Hibiscus sabdariffa fue por primera vez descrita por Linneo y publicada en el *Species Plantarum* 2: 695-696 en el año 1753⁽⁴⁾. Su sinonimia: *Hibiscus cruentus* (Bertol.), *Hibiscus fraternus* (L.), *Hibiscus palmatilobus* (Baill.), *Sabdariffa rubra* (Kostel.)⁽⁵⁾, y sus nombres comunes son: rosa de Jamaica, flor de Jamaica, rosella, flor roja, flor de dardo, rosa de Jericó, entre otros.

Morfología y Anatomía.

El género *Hibiscus* pertenece a la familia Malvaceae, y está formado por plantas herbáceas, anuales o perennes, arbustos y árboles, con las hojas enteras o a veces lobuladas o partidas. Sus flores son axilares, generalmente solitarias, aunque a veces se disponen en racimos, corimbos o panículas. Tiene un epicáliz con 4-20 segmentos, separados o a veces unidos basalmente al cáliz, que es generalmente acampanado, con 5 lóbulos. La corona tiene 5 pétalos mucho más grande que el cáliz. Los estambres están unidos formando una columna estaminal que en ocasiones pueda sobresalir notablemente a la corona. El fruto es capsular. Comprende alrededor de 200 especies de zonas tropicales y cálidas. Su nombre proviene del griego *Hibiskos*, nombre dado al malvavisco común en la época de Dioscórides y Plinio ⁽¹⁾.

Hibiscus mutabilis L. es un arbusto exótico. Si se le realiza podas periódicas toma aspecto arbóreo y puede llegar a medir hasta 4 m de alto. Presenta hojas sencillas, agudas, o acuminadas en el ápice, obtusas o redondeadas en la base, con las márgenes dentado-crenuladas. Exhibe flores de varios colores, ordinariamente rojizas, rosadas, amarillas y blancas; las cuales se presentan en forma erecta y colgante. Posee frutos en forma de capsula; rara vez llegan a madurar en las plantas cultivadas (Hoyos, 1990).

La especie más conocida es, sin duda, *Hibiscus rosa-sinensis* L., popularmente “Rosa de China” ⁽¹⁾. Es un arbusto o arbolito siempreverde de 2-3 m de altura, con hojas de ovadas o anchamente lanceoladas, de color verde lustroso, dentadas de forma irregular. Presenta flores simples o dobles, solitarias, con epicáliz de 6-9 segmentos

lineares. En pétalos de 6-12 cm de longitud, de color rojo o rosado (muchos otros colores en las variedades). Posee columna estaminal sobresaliente, de aspecto petaloide en las formas de flor doble. Es nativo de China y Asia tropical. Existen más de 100 variedades con flores sencillas, semidobles y dobles, a veces con el follaje variado: “Snow Queen”, “Norman Lee”, “President”, “Fijian White”, “Orange Eye”, “Koniger”, “Apricot”⁽¹⁾ (Hoyos, 1978).

Hibiscus sabdariffa L. es una planta herbácea perenne de hasta 2 m de altura, leñosa en la base, con los tallos más o menos glabros y rojizos. Las hojas superiores con 3-5 lóbulos, de lineares elípticos, finamente dentados; hojas inferiores normalmente enteras, ovadas. Presenta flores solitarias, con epicáliz de 8-10 segmentos unidos en la base al cáliz, que es rojizo y succulento, con pétalos de 4-5 cm de longitud, amarillos con una mancha purpura en la base. Posee una columna estaminal poco saliente. Es nativa de los trópicos de viejo mundo y muy cultivada por sus cálices comestibles. En jardinería a menudo se le trata como una anual. Planta sensible a frío⁽¹⁾ (Krapovickas y Fryxell, 2004).

Importancia Económica.

En el género *Hibiscus* alrededor de 300 especies se encuentran en el mercado de floricultura (Lichtnerová et al., 2005). Actualmente son muy importantes por su uso medicinal, industrial, ornamental, alimenticio.

Hibiscus mutabilis L. se usa como planta ornamental, es apropiada para jardines y parques (Hoyos, 1990). Además el mucilago de las flores y hojas es empleada por las parteras para facilitar el parto (Dasuki et al., 2001).

Hibiscus rosa-sinensis L. es una de las especies más conocidas de este género cultivada como arbustos ornamentales (Pfeil et al., 2002, citado por Bhalla et al., 2009). Se considera la flor nacional de Malasia, conocido localmente como Bunga raya, y también es la flor del estado de Hawái. Además de su valor simbólico, posee un alto valor comercial y paisajístico (Bhalla et al., 2009). En la actualidad, en Venezuela y México, el follaje de esta planta es utilizada como alimento y dieta animal, ya que, mejora el crecimiento y la digestibilidad de los ovinos, logrando disminuir la pérdida de nitrógeno en la orina, y aumentar la cantidad de este elemento retenido para incrementar el aporte energético del animal, con lo que se podría obtener una mejor respuesta productiva (Ruiz et al., 2005; Medina et al., 2008). También el follaje de *Hibiscus rosa-sinensis* L. es utilizado como suplemento alimenticio de rumiantes en el trópico, debido a su elevado potencial nutricional, su alto contenido de proteína y su rápida degradación que puede generar niveles de producción en animales si se combinara con leguminosas, lo que podría ser una solución para cubrir los requerimientos alimenticios de estos animales, debido a que en los trópicos, la producción de gramíneas en la época seca es insuficiente y limita la producción de rumiantes (Flores et al., 1998; Medina et al., 2008).

Hibiscus sabdariffa L. (Roselle) se cultiva en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, porque es comestible, de ella se sacan fibras para la pulpa de papel. En algunos países, estas flores son usadas para propósitos decorativos (Sánchez-

Mendoza et al., 2007, citado por Govenden et al., 2009). *H. sabdariffa* de igual manera ha sido reportada como planta medicinal, ya que posee efectos antioxidantes y tiene la capacidad de regular el colesterol en sangre (Hirunpanich y col, 2006 citado por Govenden-Soulage et al., 2009).

Las flores de *Hibiscus sabdariffa* L. presentan en su composición un porcentaje importante de fibra dietética, así como una elevada capacidad antioxidante (Sáyago y Goñi, 2010), ya que, posee un contenido apreciable de proteínas, cenizas, fibra dietética tanto insoluble como soluble, minerales y vitaminas como calcio, potasio, hierro, magnesio, zinc, vitaminas, ácido ascórbico, niacina, tiamina y riboflavina. También se han evidenciado efectos saludables del extracto acuoso de los cálices, como un efecto hipotensor, atribuido a su acción vaso-relajante (Sáyago y Goñi, 2010), también posee un efecto cardioprotector (Chen et al., 2003 citado por Sáyago y Goñi, 2010), además de la reducción de las concentraciones de creatinina en orina, ácido úrico, citrato, tartrato, calcio, sodio, potasio y fosfato (Mojiminiyi et al., 2000 citado por Sáyago y Goñi, 2010).

Los cálices deshidratados de la flor de Jamaica son apreciados comercialmente porque a partir de estos, pueden obtenerse concentrados de color rojo (antocianinas) con aplicación a la industria alimenticia, industrial y farmacéutica. Su fibra se utiliza en la elaboración de cordones u otros productos similares, sustituyendo el cáñamo o yute. sus hojas se usan en ensaladas, incluso se emplea como alimento forrajero para ganado o aves. (Bhalla y col. 2010). A nivel industrial, sus extractos se usan para la elaboración de tintes y saborizantes de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. También los cálices contienen diversos compuestos, entre los que se hallan alcaloides, ácido

ascórbico, anisaldehído, antocianina, b-caroteno, b-sinosterol, ácido cítrico, ácido málico, galactosa, mucopolisacaridos, pectina, ácido protocatecuico, polisacáridos, quercetina, ácido esteárico y cera (Galicía et al., 2007).

Cultivo convencional de *Hibiscus* spp.

Las especies de *Hibiscus* se propagan vegetativamente por estacas de madera tierna o semidura, presentando un crecimiento rápido (Hoyos, 1978), pero requieren de abundante agua, nutrientes, luz y humedad, de lo contrario la planta presentaría marchitez ⁽¹⁾

Micropropagación de *Hibiscus* spp.

El cultivo de tejidos vegetales involucra diferentes técnicas para el cultivo de material vegetal diverso, células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante estas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de patógenos en un medio nutritivo aséptico en condiciones ambientales controladas. Hoy esta técnica tiene numerosas aplicaciones: propagación pasiva de plantas, clonación de individuos de características agronómicas, obtención de plantas libres de virus, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, mejora genética de plantas (Segretin, 2008).

Una de las técnicas más usadas en el cultivo de tejidos *in vitro* es la micropropagación y consiste en la multiplicación masiva de plantas a través de un explante (fracciones de tejidos u órganos) en condiciones asépticas (Villalobos y

Thorpe, 2001). Esta técnica de cultivo es realizada por personal especializado en medios específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz). La micropropagación constituye uno de los métodos biotecnológicos que ha aportado mayores logros al desarrollo de la agricultura, ya que se usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Segretin, 2008).

El éxito en la propagación de una planta, dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, y de algunas células recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe inducirse primero a la dediferenciación y luego la rediferenciación celular. El proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula.

La propagación eficiente de una especie debe tener cuatro pasos fundamentales: el establecimiento aséptico del cultivo, su multiplicación, el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo (Murashige, 1974).

Además existen factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación, tales como: la planta donante del explante, el explante, factores físicos (luz y temperatura), los reguladores de crecimiento y el medio de cultivo (Villalobos y Thorpe, 2001).

Airò et al. (2007), lograron la multiplicación de los brotes por medio de la micropropagación masiva de *Hibiscus rosa-sinensis* L. a partir de microesquejes,

probando en el medio de Murashige & Skoog (MS) (1962) cuatro concentraciones (0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L) de benciladenina (BA), con 0.1 mg/L ácido indol-acético (AIA). La mayor tasa de multiplicación (4.9 brotes/explante) la obtuvieron al emplear una concentración de 0.4 mg/L de BA

Christensen et al. (2008), realizaron la propagación y multiplicación *in vitro* de *Hibiscus rosa-sinensis* L, a partir de microesquejes. Estos investigadores trataron de probar la influencia de hierro, calcio y benciladenina (BA) en la disminución de la clorosis y necrosis de las hojas de las plantas de esta especie crecidas *in vitro*, ya que, asociaron este fenómeno a la deficiencia de estas sustancias. Emplearon dos concentraciones de calcio de 5 y 9 mM y usaron dos fuentes de hierro, Fe-EDTA (etilenediamina 2 dihidroxifenil) y Fe-EDDHA (acetato férrico), en concentraciones que oscilaban entre 98-394 µM. El mayor número de plantas con hojas sanas lo observaron en el medio de cultivo suplementado con 295 µM con Fe-EDDHA, 0.5 mg/L de BA y 9 mM de calcio.

Bhalla et al. (2009) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de BA y de las sales del medio MS, para la inducción de brotes a partir microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* L, determinando que el medio MS con la concentración sales reducida a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS) y el uso de BA de 0-1.1 mg/L, inducía la formación de brotes vigorosos con un menor número de hojas necrotizadas.

Gómez et al. (2008), establecieron un protocolo para la regeneración eficiente de múltiples brotes de *Hibiscus sabdariffa* L. a partir del cultivo de yemas. Para ello utilizaron la germinación de las semillas en un medio MS, suplementado con 1 mg/L de

BA, mientras que para la regeneración de múltiples brotes emplearon diferentes concentraciones de BA (2-8 mg/L), thiazuron (TDZ) (0.2-4 mg/L) y m-topolin (8.28-33.12 μ M). El número más alto de brotes regenerados (33.2 brotes/explantos) fue obtenidos en el medio de cultivo suplementado con 4 mg/L de BA.

Govinden-Soulange et al. (2009), indujeron organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales y hoja en *Hibiscus sabdariffa* L. La organogénesis directa a partir de segmentos nodales, la obtuvieron en el medio MS que contenía 0 mg/L de BA y 0 mg/L de cinetina (K), obteniéndose entre 81-100% de regeneración. La organogénesis indirecta a partir de segmentos nodales y hoja, la cual obtuvieron en el medio MS que contenía 1.5 mg/L TDZ y 0.04 mg/L 2,4 D, obteniéndose un 80% de explantes en callos y brotes.

Sylvère et al. (2010), realizaron un protocolo para la inducción de callos y embriones somáticos con dos genotipos de *Hibiscus sabdariffa* L. (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa* e *Hibiscus sabdariffa* var. *Altissima*), variando concentraciones de sales en el medio MS y DKW, el tipo de explante (raíces, hipocotilos, cotiledones); el tipo de azúcar (sacarosa o glucosa), y los reguladores de crecimiento empleados (ANA, K, 2,4-D, BA, TDZ). Los resultados más exitosos, para la inducción de callos indican que se obtuvieron con 3% de sacarosa, a partir de explantes como hipocotilos y cotiledones para los dos genotipos, mientras que embriones somáticos fueron obtenidos con el medio DKW suplementado con 4 mg/L 2,4-D + 1 mg/L TDZ y 1 mg/L 2,4D + 0,5 mg/L TDZ.

Herath et al. (2004), desarrollaron un método para la regeneración *in vitro* de múltiples brotes de 4 genotipos de *Hibiscus cannabinus* L. Para ello, cultivaron brotes jóvenes en un medio de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con BA en combinación con K. La observación más resaltante de este trabajo fue que concentraciones mayores de 2 mg/L BA tenía un efecto negativo en el número de brotes regenerados. Para el alargamiento y enraizamiento de los brotes, estos se colocaron en medios MS sin reguladores de crecimiento, obteniendo un 98% de plantas enraizadas en los cuatro genotipos de *Hibiscus cannabinus* L.

Chen et al. (2010), logrando establecer organogénesis directa a partir de yemas utilizando cotiledones regeneraron plantas de *Hibiscus cannabinus* L. Para la regeneración de brotes utilizaron un medio MS suplementado con varias concentraciones de BA, AIA y F-68 (sulfactante no iónico), encontrando que la mejor combinación para la regeneración de brotes fue el medio MS suplementado con 5 mg/L BA, 1 mg/L de AIA y 0,2 % (m/v) F-68 donde obtuvieron 100% de explantes con brotes.

Ayadi et al. (2011), propagaron plantas de *Hibiscus cannabinus* L. usando como explantes, yemas y segmentos nodales. Ellos utilizaron diferentes combinaciones de concentraciones de ANA y BA, obteniendo los mejores resultados en el medio control sin reguladores de crecimiento, logrando un 90.5 % de explantes con brotes y un promedio de 5 brotes/explante. Con respecto al enraizamiento, se obtuvo un 91% brotes con raíces, al utilizar un medio MS sin reguladores de crecimiento.

Lichtnerová et al (2005), realizaron la micropropagación de *Hibiscus moscheutos* L. a partir meristemas. Para ello utilizaron un medio MS, suplementado con diferentes concentración de BA 1-4 mg/L y ANA a 1 mg/L. Los mejores resultados para la multiplicación de brotes se lograron al adicionar 2 mg/L de BA al medio de cultivo. Una alta concentración de citoquininas (4mg/L) indujo la formación de callos en la base de los brotes.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ✿ Establecer un sistema de micropropagación de tres especies del genero *Hibiscus* a partir de yemas y microesquejes.

Objetivos Específicos

- ✿ Establecer un protocolo adecuado de desinfección para los explantes (yemas y microesquejes) provenientes de plantas de tres especies de *Hibiscus* cultivadas en condiciones de vivero.
- ✿ Determinar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de yemas y microesquejes de tres especies de *Hibiscus*.
- ✿ Determinar la respuesta morfogénica de las tres especies *Hibiscus* micropropagadas a partir de yemas y microesquejes, al emplear diferentes medios y condiciones de cultivo, comparando el proceso entre las especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Se utilizaron plantas madres de *Hibiscus mutabilis* L., *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Dos morfotipos: cayena simple y cayena doble) y *Hibiscus sabdariffa* L. provenientes de viveros comerciales, y luego se mantuvieron en viveros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Instituto de Biología Experimental, adscrito a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela) hasta el momento de la extracción de los explantes.

Las plantas madres de *Hibiscus* que se mantuvieron en los viveros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (IBE), fueron mantenidas hasta el momento de la extracción de los explantes. Se regaron tres veces por semana y se asperjaron con fungicida: 5 gr/L de carbendazim; De igual forma, se asperjaron con benciladenalina (BA) para inducir la brotación de yemas.

Debido a algunos inconvenientes para la adquisición de las plantas madres de *Hibiscus sabdariffa*, se procedió a conseguir las semillas, las cuales se extrajeron de las flores de las plantas que se obtuvieron en casas de familia ubicadas en los estados Bolívar y Aragua.

Selección del explante.

Para la iniciación del proceso de micropropagación se tomaron las yemas axilares, apicales, y microesquejes de 0, 5 cm aproximadamente, de las plantas mantenidas en condiciones de vivero. Además de semillas de *Hibiscus sabdariffa*

Desinfección de los explantes.

Con la finalidad de obtener explantes libres de agentes contaminantes se realizaron los procesos de desinfección para yemas y microesquejes señalados en la Tabla N°1, y semillas en la Tabla N°2:

Tabla N°1: Tratamientos aplicados para la desinfección de las yemas y microesquejes para tres especies de *Hibiscus*

Tratamiento	Lavado con detergente	Tipo de Fungicida /t	Solución Iodada (Betadine %)/ t	Peróxido de Hidrogeno % /t	Etanol puro/t	Hipoclorito de Sodio (%)/ t	Tween 20	Gerdex puro/t	Alcohol 50% /t	Tipo de fungicida en el medio de cultivo (1 mg/L)
1	+	Vitavax 200 F/ (2 hrs)	20/15 min	---	---	30/20 min	+	+/1 min	---	---
2	+	Dithane 45 (2 hrs)	---	50/5 min	+/2 seg	70/15 min	+	---	+/2 seg	---
3	+	Dithane 45 (2 hrs)	---	50/5 min	+/2 seg	70/15 min	+	---	+/2 seg	Dithane 45/Captan
4	-	Carbendazim (2 hrs)	---	50/5 min (Dioxogen)	+/2 seg	50/15 min	+	---	--	Carbendazim (2 mg/L) se agrega despues de esterilizar el medio con un miliporo.

Tabla N°2. Tratamiento aplicado para la desinfección de semillas de *Hibiscus sabdariffa* (Flor de Jamaica)

Tratamiento	Tipo de Fungicida /t	Hipoclorito de Sodio (%) / t	Tween 20	Al sembrar (%) /t	Tipo de fungicida en el medio de cultivo (2mg/L)
1	Carbendazim/ (2 hrs)	50/20 Min	+	Dioxogen 50/5 seg	Carbendazim

Siembra de los explantes.

Los explantes provenientes de plantas *ex vitro* de *Hibiscus* spp. se sembraron en los medios en la cámara de flujo laminar, bajo condiciones de asepsia. Se colocó un explante por tubo de ensayo en un medio de cultivo, para un total de 30 replicas por tratamiento en el caso de las yemas y 80 replicas en el caso de microesquejes de 1 cm de largo para cada especie de *Hibiscus* para el protocolo de desinfección. Para las demás etapas, brotación y multiplicación se sembraron alrededor de 30-50 microesquejes de 1 cm de largo aproximadamente, para cada especie de *Hibiscus*.

De igual manera, se sembraron en envases de 250 cm³ 10 semillas por envase para un total de 125 semillas de *Hibiscus sabdariffa*

Medios de Cultivo.

Todos los medios de cultivo que se utilizaron durante las diferentes etapas estaban constituidos por las sales de Murashige & Skoog, 1962 (MS) suplementados con 100 mg/L de mio-inositol, 0,4 mg/L de tiamina y 30 g/L de sacarosa, además se le agregó fungicida carbendazim. Se le ajustó el pH a 5.8 con NaOH y/o HCl, se añadió como agente gelificante agar 8 gr/L y sirvieron en tubos de ensayos. Se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C y 1.5 libras de presión (Tabla N°3).

Tabla N° 3: Medios de cultivo para las diferentes etapas de micropropagación para las tres especies de *Hibiscus*

Etapas de micropropagación	Tratamiento	Tipo de Hormona	Concentración	Fungicida (concentración) con la utilización de un miliporo 0.2 µm
Germinación de semillas	MS	---	---	2 mg/L Carbendazim
Establecimiento del cultivo	MS1	---	---	2 mg/L Carbendazim
Inducción de brotación de yemas	MS2	BA	1 mg/L	2 mg/L Carbendazim
	MS3	BA	2 mg/L	2 mg/L Carbendazim
Multipliación	MS4	BA/TDZ	2 mg/L+0.5 mg/L	1 mg/L Carbendazim
	MS5	BA/AIA	1.5mg/L+0.01 mg/L	1 mg/L Carbendazim

MS2 medio reportado por Gómez-Leyva (2008). MS3 medio reportado por Herath (2004). MS4 (TDZ) medio reportado por Gómez-Leyva (2008) y MS5 (AIA) medio reportado por Airó (2007).

Condiciones de Cultivo

El material vegetal fue incubado en una cámara de crecimiento con luz fluorescente continua ($50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a una temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$ durante el lapso de tiempo necesario para el desarrollo de las etapas de la micropropagación. Sin embargo, para etapas como la inducción y la multiplicación de brotes se uso una temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$.

Observaciones

En cada cultivo, para las tres especies de *Hibiscus* se realizaron observaciones cualitativas y cuantitativas, con frecuencia semanal. Las observaciones cuantitativas se basaron en los siguientes aspectos: porcentaje de contaminación de los explantes, porcentaje de contaminación de semillas, tiempo de respuesta del explante, porcentaje de brotación, promedio de brotes por explante, entre otros. Las observaciones cualitativas se tomo en cuenta: el tiempo de respuesta del explante, la cantidad de mucilago por especie, la respuesta del explante ha determinado medio de cultivo, entre otros.

Para la contrastación de las tres especies de *Hibiscus* en relación con diversas variables, se realizó una prueba de análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la ayuda del programa CaEst 1.2 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo

Para la etapa de establecimiento del cultivo *in vitro* es necesario lograr un adecuado tratamiento de desinfección de los explantes y semillas, que permita continuar con el desarrollo de las diferentes etapas del cultivo. La desinfección de los explantes utilizados para establecer el cultivo “*in vitro*” de las tres especies de *Hibiscus*, ha sido uno de los objetivos más difíciles, es así como ha sido necesario realizar cambios en el protocolo de desinfección planteado al inicio de la investigación, de acuerdo al explante utilizado.

Desinfección de las yemas.

Para la desinfección de las yemas solo se utilizó el tratamiento N° 1 (Tabla 1), después de 5-7 días en cultivo, se presentó un alto porcentaje de contaminación (60-90 %) en las tres especies de *Hibiscus*, donde el mayor valor corresponde a *Hibiscus mutabilis*, mientras que el menor porcentaje a *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble). Así mismo, se pudo apreciar que el porcentaje de explantes sobrevivientes por cada especie fue bajo, ya que aproximadamente al mes de cultivo, las yemas no contaminadas, no se desarrollaban y finalmente se oxidaban. Solo en el caso de *Hibiscus mutabilis*, un 8% de yemas se desarrollaron.

Desinfección y germinación de semillas

El tratamiento de desinfección empleado para las semillas fue adecuado, ya que, de un total de 125 semillas sembradas, se obtuvo un 76% de semillas libres de contaminación. De las cuales, el 48 % de semillas germinaron (Figura N°1).

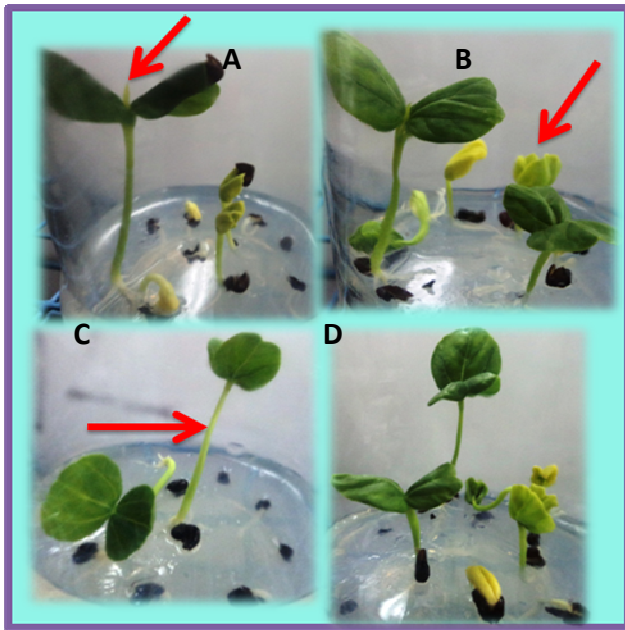


Figura N°1: Germinación de semillas *Hibiscus sabdariffa*. A-C. Primera semana de germinación. B-D. Segunda semana de germinación.

Desinfección de los microesquejes.

Para la desinfección de los microesquejes se probaron cuatro tratamientos (Tabla N°1), pudiéndose observar para las tres especies de *Hibiscus*, que el porcentaje de contaminación de los explantes va disminuyendo a medida que se modificó el tratamiento de desinfección 1-4 (Tabla N°4, Fig. N°2). Con el tratamiento N° 1 los porcentajes de contaminación fueron muy altos para todas las especies (86-89 %), al emplear el tratamiento N° 2 se observó una considerable disminución de la contaminación en *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple), aunque no hubo el mismo resultado con las otras especies estudiadas. Con respecto al tratamiento N°3, se observó un bajo porcentaje de contaminación para *Hibiscus sabdariffa* (flor de Jamaica) y *Hibiscus rosa-sinensis* L. var. *rosa-sinensis* (Cayena simple)(16% y 13% respectivamente), y un alto porcentaje de sobrevivencia (84 % y 87 % respectivamente). Pero cuando probamos el último tratamiento de desinfección notamos una apreciable disminución en el porcentaje de contaminación para las tres especies (18- 37 %), sobre todo para especies como *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-*

sinensis (Cayena simple) y *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble).

Es importante señalar que la contaminación antes descrita suponemos que es por hongos, mientras que la contaminación por bacterias es poca siendo esta para cada especie alrededor ± 2 % aproximadamente.

En las figuras N° 3, 4,5 y 6 se muestran algunos ejemplos de agentes contaminantes en microesquejes de las tres especies de *Hibiscus*. Puede apreciarse sobre el explante y en el medio de cultivo la presencia de posibles agentes fúngicos de aspecto mohoso y de colores blancos, amarillos, marrones y rosados.

Analizando los componentes de los tratamientos de desinfección, se pudiera inferir que fue apropiado agregar al medio de cultivo 2 mg/l carbendazim a través de un miliporo 0.2 μm , para así disminuir la contaminación en estas especies.

Cabe resaltar que el género *Hibiscus* en el interior de sus hojas y tallos posee mucilago. Al aplicar los tratamientos de desinfección, se apreció notablemente la presencia de esta sustancia en mayor o menor cantidad, dependiendo de la especie. Las especies de *Hibiscus* posee de mayor a menor cantidad de mucilago son las siguientes: *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple), *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble), *Hibiscus mutabilis*, *Hibiscus sabdariffa*. Es posible, que la presencia de esta sustancia en los explantes, pueda incidir en el porcentaje de contaminación o la respuesta de los explantes en una medio de cultivo determinado.

Los mucilagos están compuestos por polisacáridos complejos, y se producen como resultado de la disgregación de la pared celular o como producto metabólico, su

función principal es proteger a la planta de insectos, hongos o heridas. También en las especies leñosas, el mucílago se ha asociado a la protección de la yema (Lindorf et al., 2006). Pero también se pudiera inferir, que este mucilago impida la penetración de las sustancias desinfectantes hacia el interior del explante, limitando la eficiencia del método de desinfección. Vargas et al., 2006, trabajando en la propagación de *Hippeastrum*, a partir de bulbos, asociaron la dificultad del establecimiento del cultivo *in vitro* de esta especie en condiciones asépticas, con la presencia de mucílago en el interior de los bulbos.

El alto nivel de contaminación presente en los cultivos, se fundamenta principalmente en el hecho de que los explantes son tomados de las plantas que provienen del campo y de viveros que muchas veces no presentan las condiciones más ideales para su cultivo y de las características morfológicas de las plantas, para cada una de las especies del genero *Hibiscus*, que como sabemos son plantas leñosas.

Durante la fase de establecimiento de especies leñosas la presencia de microorganismos es un serio problema que afecta el cultivo *in vitro*, debido a que el explante inicial constituye la fuente principal de contaminantes quizás, por características anatómicas, tales como la presencia de cera y estipulas en los tallos que permiten la acumulación de agentes contaminantes (Cruz et al., 2003); lo que dificulta a menudo su desinfección. Pero también se toma en cuenta la edad de la planta y si son cultivadas en el campo, debido a que eso se le atribuye como causa el alto porcentaje de contaminación bacteriana y fungosa. Por eso, la selección y el crecimiento de la planta madre juega un papel importante en reducir la contaminación (Cruz et al., 2003).

Los explantes pueden llevar contaminantes en su superficie o en su interior, o en ambas partes. Aquellos microorganismos que estén sobre la superficie se pueden eliminar mediante la desinfección superficial que permite remover bacterias y hongos exógenos en el explante; pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de eliminar, a no ser que se incluyan agentes fungistáticos o antibióticos al medio, o a través de la utilización de otras técnicas que permitan disminuir su presencia (Ramírez et al., 2000)

Para la eliminación de agentes contaminantes, las plantas madres empleadas en este trabajo fueron tratadas aplicando fungicida con una periodicidad semanalmente. Diversos investigadores afirman que desde la primera fase preparatoria en la micropropagación de especie leñosas, hay que tomar las medidas necesarias para prevenir o eliminar la contaminación en el establecimiento *in vitro*, preparando la planta donadora para disminuir la contaminación por microorganismos en los explantes iniciales (Acosta et al., 2009). Vieira et al., 1988 y Carrazana et al., 1997, han obtenido buenos resultados en el control de los contaminantes fungosos con el empleo de fungicidas en el medio de cultivo previa identificación del microorganismo y la determinación de su susceptibilidad (Cruz et al., 2003). En el establecimiento de cultivo *in vitro* de ciertas plantas leñosas como mango (Isea et al., 2004), guayabo (Ramírez et al., 2000) y café (Martin et al., 2003), se disminuyó notablemente el porcentaje de contaminación (oscilando entre el 20 y el 40%), adicionando al medio de cultivo, fungicida en concentraciones de 0,5 a 1 mg/l.

Christensen et al., 2008, trabajando con yemas axilares de dos variedades de *Hibiscus rosa-sinensis* "Casiopea viento amarillo" y "Rosa del Caribe" encontraron que

el porcentaje de contaminación en el establecimiento del cultivo *in vitro* fue de un 10%, utilizando para la etapa de desinfección hipoclorito de sodio (NaOCl) 1.5 (v/v) mas Tween 20 por 20 min. En la tabla N°1 muestra el porcentaje de sobrevivencia y explantes contaminados para las tres especies de *Hibiscus*, trabajados en este investigación en cada uno de los tratamientos empleados, donde se puede deducir que el cloro es una sustancia que contribuye al éxito de la micropropagación en la etapa de desinfección de los explantes.

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana, la cual ocasiona pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos y de investigación (Isea et al., 2004)

Tabla N°4: Porcentaje de explantes sobrevivientes y contaminados para las tres especies de *Hibiscus*.

TIPO DE EXPLANTE																
YEMAS								MICROESQUEJES								
% Explantes sobrevivientes				% Contaminación de los explantes				% Explantes sobrevivientes				% Contaminación de los explantes				
	Especie				Especie				Especie				Especie			
TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN	CS	CD	HM	FJ	CS	CD	HM	FJ	CS	CD	HM	FJ	CS	CD	HM	FJ
1	0	0	8	0	82	60	92	87	11	16	21	14	89	84	79	86
2	--	--	--	--	--	--	--	--	54	22	18	--	46	78	82	--
3	--	--	--	--	--	--	--	--	87	21	36	84	13	79	64	16
4									82 ±2	77 ±2	63 ±2	64 ±2	18	23	37	36

±2 Explantes contaminados por bacteria CS: Cayena simple (*Hibiscus rosa-sinensis* L. cav. *rosa-sinensis*). CD: Cayena doble (*Hibiscus rosa-sinensis* L. cav. *rosa-sinensis*). HM: (*Hibiscus mutabilis*). FJ: Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

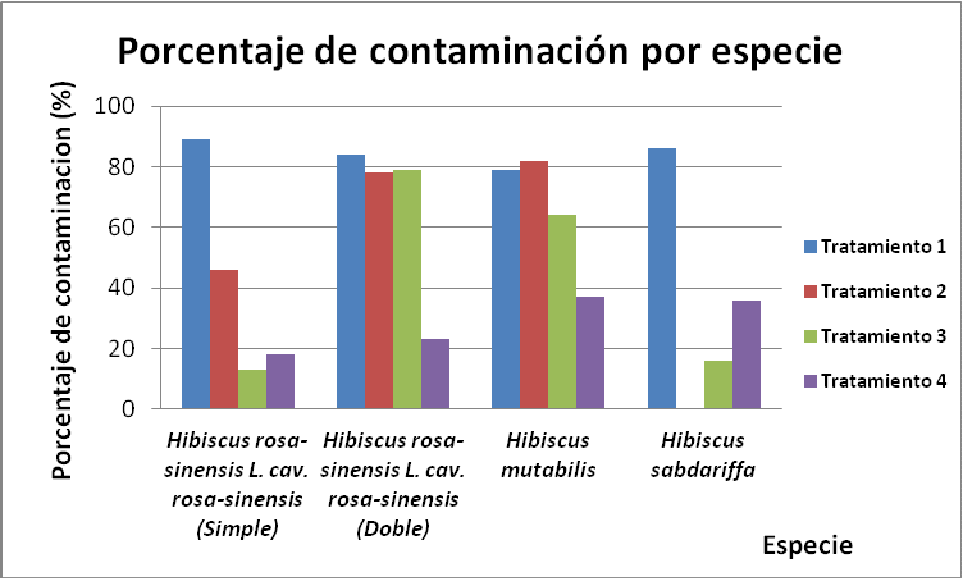


Figura N°2: Porcentaje de contaminación para cada una de las especies de *Hibiscus* por tratamiento de desinfección al mes de cultivo.

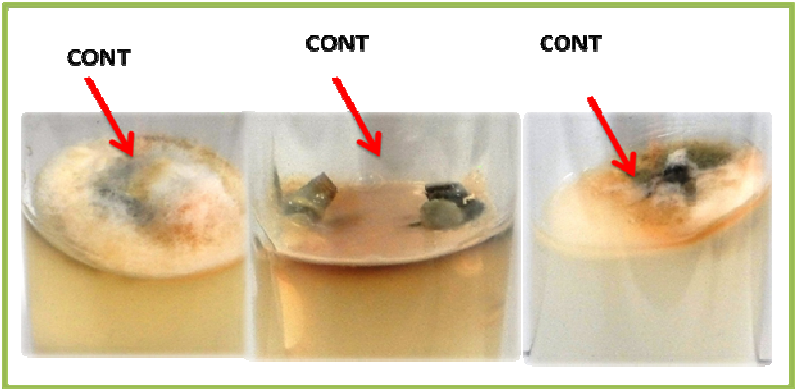


Figura N°3: Microesquejes de Cayena Doble contaminado (CONT) (*Hibiscus rosa-sinensis* L. cav. *rosa-sinensis*) a los 15 días de cultivo

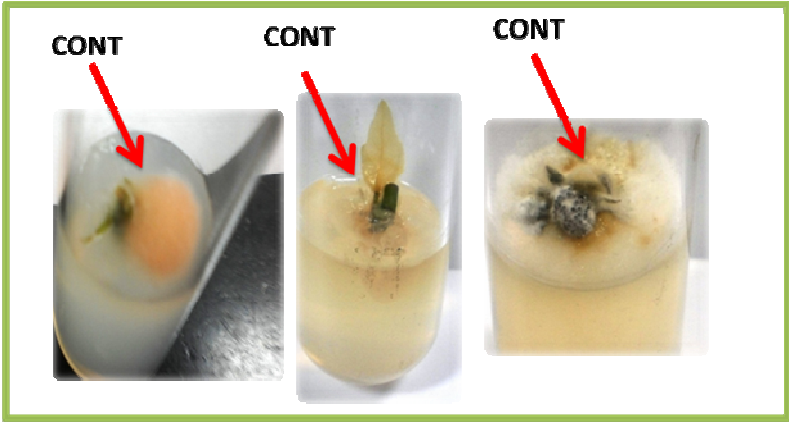


Figura N°4: Microesquejes de Cayena Simple contaminado (CONT) (*Hibiscus rosa-sinensis* L. cav. *rosa-sinensis*) a los 15 días de cultivo

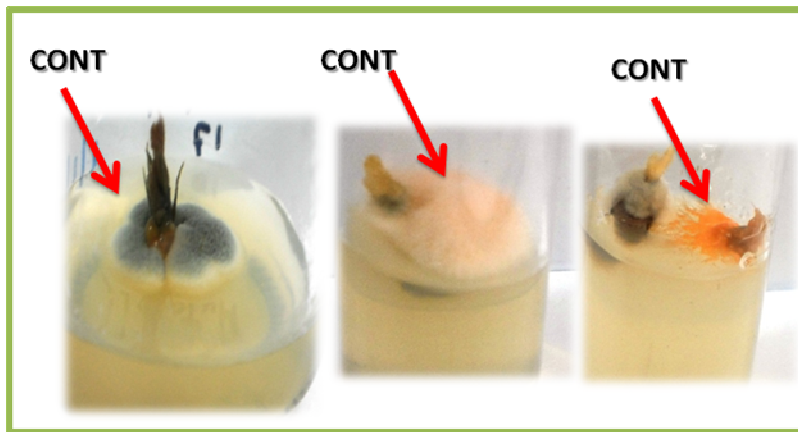


Figura N°5:
Microesquejes de
Hibiscus mutabilis
contaminado (CONT) a
los 15 días de cultivo.

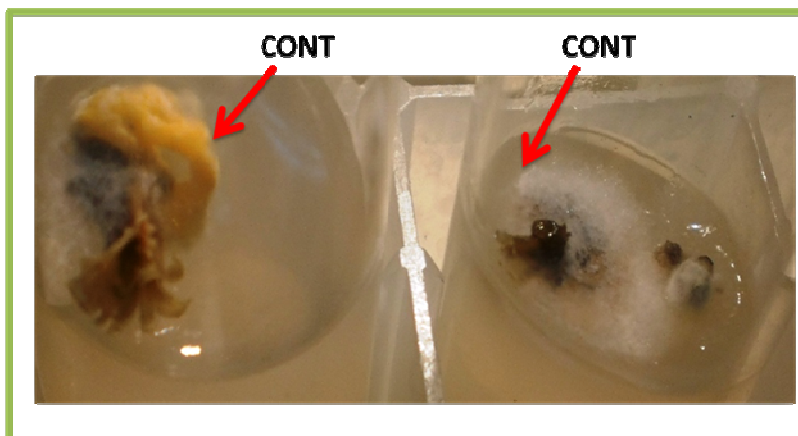


Figura N°6: Microesquejes
de *Hibiscus sabdariffa*
contaminado (CONT) a los
15 días de cultivo.

Cultivo *in vitro* de yemas.

Al comienzo de la investigación, fueron cultivadas yemas aisladas de microesquejes de tres especies de *Hibiscus* en el medio MS control sin reguladores de crecimiento, con la idea de seleccionar el material limpio de agentes contaminantes, pero estos explantes no presentaron ninguna respuesta de desarrollo, y por el contrario se oxidaban y no sobrevivían. Si las yemas sobrevivían a esta primera etapa de selección, en un medio sin reguladores de crecimiento, morían al trasladarlos a los medios de cultivo en presencia de benciladenina.

Es por ello que el proceso de micropropagación de las tres especies de *Hibiscus* a partir de yemas, tanto apicales como laterales, en las condiciones de cultivo empleadas

no fue posible en esta investigación. En la tabla N° 4 y 5 se puede observar que no hubo respuesta hacia la brotación de yemas para la mayoría de las especies, excepto para *Hibiscus mutabilis* que trascurrido 7 días de cultivo se observó la brotación de 8 yemas (ver figura N° 7).

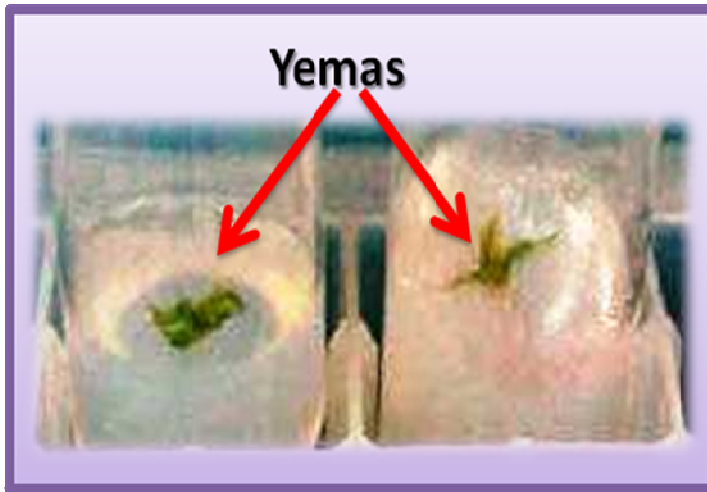


Figura N°7 Inducción a la Brotación de yemas de *Hibiscus mutabilis* a los 15 días de cultivo

Cultivo *in vitro* de microesquejes

En el establecimiento de un sistema de micropropagación a partir de microesquejes si se logró la inducción de la brotación de las yemas. Esto se pudo observar al transcurrir los 7 días después de cultivar microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* (Tabla N° 4 y 5), mientras que el tiempo de respuesta para la brotación en *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble) y *Hibiscus mutabilis* fue de 15 días, continuos. Por otro lado, quien tardó más en responder fue *Hibiscus rosa-sinensis* L. cav. *rosa-sinensis* (Cayena simple) con un periodo de 20 días aproximadamente.

Los resultados mostrados en la tabla N° 4 y 5 indican que fue difícil establecer un sistema de micropropagación a partir de yemas aisladas, pero cuando se emplearon microesquejes fue posible lograr el establecimiento de este sistema a partir de la inducción a la brotación de las yemas. Estos resultados pueden estar asociados, entre

otras cosas, al mayor tamaño de los microesquejes, con respecto a las yemas, lo que permite la aplicación de un tratamiento fuerte de desinfección sin que se dañe la yema que se va a desarrollar. El hecho de que los brotes se formen más rápidamente y se mantengan vivos por mayor tiempo cuando se usa microesquejes que cuando se emplean yemas, probablemente se deba a que el trozo de tallo que acompaña la yema este proporcionando las sustancias necesarias para permitir un mayor desarrollo de los brotes que se forman de estos explantes (Vargas y De García et al., 1989).

Muchos investigadores que han trabajado con cultivo *in vitro* de especies del género *Hibiscus*, seleccionaron como explantes, segmentos nodales debido a su alta capacidad de respuesta y a él bajo tiempo de regeneración, comprobado en explantes de *Hibiscus rosa-sinensis*, al compararlos con las yemas apicales (Airò et al., 2007). Christensen et al., 2008 lograron realizar la propagación y multiplicación *in vitro* de *Hibiscus rosa-sinensis* a partir de microesquejes. Por otro lado, Govinden et al., 2008, indujeron la organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales en *Hibiscus sabdariffa*.

Los explantes (microesquejes) de las tres especies de *Hibiscus*, se mantuvieron por un periodo de 30 días en un medio MS, posteriormente se repicaron los en medios con benciladenina (BA) suplementados 1 mg/L y 2 mg/L (Tabla N°3), con el objetivo de inducir la brotación y/o la multiplicación de los brotes. La especie que tiene el mayor porcentaje brotación de yemas corresponde a *Hibiscus sabdariffa* con un 66%, seguidamente con un 51% *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble), luego *Hibiscus mutabilis* con un 26%, y el menor porcentaje de brotación corresponde para *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple) con un 22%. Al comparar la respuesta morfogénica de los explantes de las tres especies de *Hibiscus* con

el medio de cultivo aplicado, se deduce que en un medio MS suplementado con BA (MS+BA) presenta el mayor porcentaje de brotación de yemas, en comparación con el medio MS sin sustancia de crecimiento (Ver tabla N°5 y figuras N° 8-14). Siendo *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple) la especie que responde en un tiempo más corto a la inducción, a los 4 días luego de repicada, seguida de *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble) y *Hibiscus mutabilis* (Cayena doble) a los 7 días, y por último la especie que tarda 15 días aproximadamente en responder al medio de inducción de brotación es *Hibiscus sabdariffa*. En la figura N°15, se puede apreciar el porcentaje de brotación de cada una de las especies de *Hibiscus*.

Ayadi et al., en el 2011, propagaron plantas de *Hibiscus cannabinus* usando segmentos nodales, logrando un 90.5% de regeneración en un medio MS sin reguladores de crecimiento. También se ha demostrado que en el medio MS sin hormonas de crecimiento, hay una regeneración en los explantes nodales de *Scaevola aemula* (Malvaceae). Esto pueda deberse, a las diferentes respuestas de los explantes nodales, y a los diferentes tipos de brotes poseen diversos estados fisiológicos en las diferentes partes de la planta. Igualmente, dispara la inducción de brotes y la regeneración de explantes nodales, además de su fácil preparación (Bhalla et al., 2006).

Por medio de la estimulación de la inducción de yemas se producen nuevos brotes, que una vez enraizados, formaran nuevas plantas. La formación de yemas pueden ser estimuladas en gran número y en corto periodo de tiempo (Marín, 1997). Para la multiplicación de las yemas en especies leñosas, se sabe que la capacidad morfogénica es mayor en material juvenil que en el adulto, es por ello que se inducen las yemas

utilizando benciladenina (BA), que asegura el alargamiento del material vegetal juvenil (Pliego et al., 1999).

Bhalla et al., en el 2006, en un trabajo con *Hibiscus rosa-sinensis* observó que las yemas sembradas en un medio MS sin sustancias de crecimiento muestran un crecimiento limitado, en comparación con aquellos explantes que se sembraron en un medio con benciladenina, donde la inducción de la brotación de yemas aumento. Esto se debe a que la benciladenina (BA) es una de las citoquininas más efectivas, ya que posee efectos estimulantes para la inducción de múltiples brotes en explantes nodales.

Herath et al., en 2004, regenero vástagos de *Hibiscus cannabinus*, donde el porcentaje de regeneración de brotes varió de 42 a 99%, entre los diferentes tratamientos en presencia y ausencia de BA, y el aumento en la concentración BA redujo la eficiencia de regeneración de brotes, por ende llega a la misma conclusión de Bhalla, 2006 ; los explantes cultivados en un medio MS con benciladenina presenta un crecimiento de brotes en una fase temprana en comparación con los explantes sembrados en un medio MS libre de citoquininas. El BA es una de las citoquininas más utilizadas, una cantidad baja de esta citoquinina reprograma el desarrollo en todo el ápice del brote, y hace que las células que normalmente permanecen en reposo puedan dividirse repetidas veces y dar lugar a numerosas yemas vegetativas.

Tabla N°5: Tiempo de respuesta a la brotación de yemas y microesquejes en medio MS sin reguladores de crecimiento y con reguladores de crecimiento de las tres especies de *Hibiscus*

Especie	Tiempo de respuesta al medio de cultivo a partir de yemas (Medio MS)	Tiempo de respuesta al medio de cultivo a partir de microesquejes (Medio MS)	Tiempo de respuesta al medio de cultivo a partir de microesquejes (Medio MS+BA)
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. var. <i>rosa-sinensis</i> (cayena simple)	No	15 días	4 días
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. var. <i>rosa-sinensis</i> (cayena doble)	No	10 días	7 días
<i>Hibiscus mutabilis</i> (cayena doble)	7 días	10 días	7 días
<i>Hibiscus sabdariffa</i> (flor de Jamaica)	No	7 días	15 días

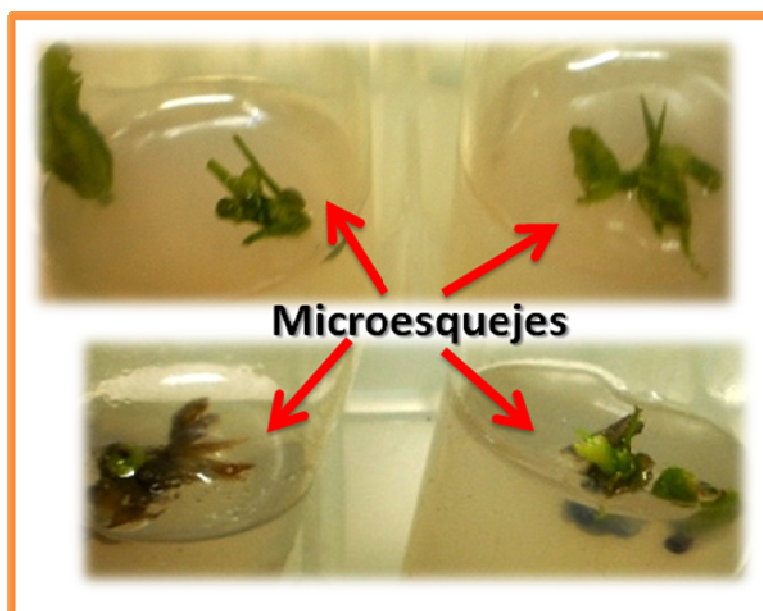


Figura N°8: Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en MS a los 30 días del establecimiento del cultivo

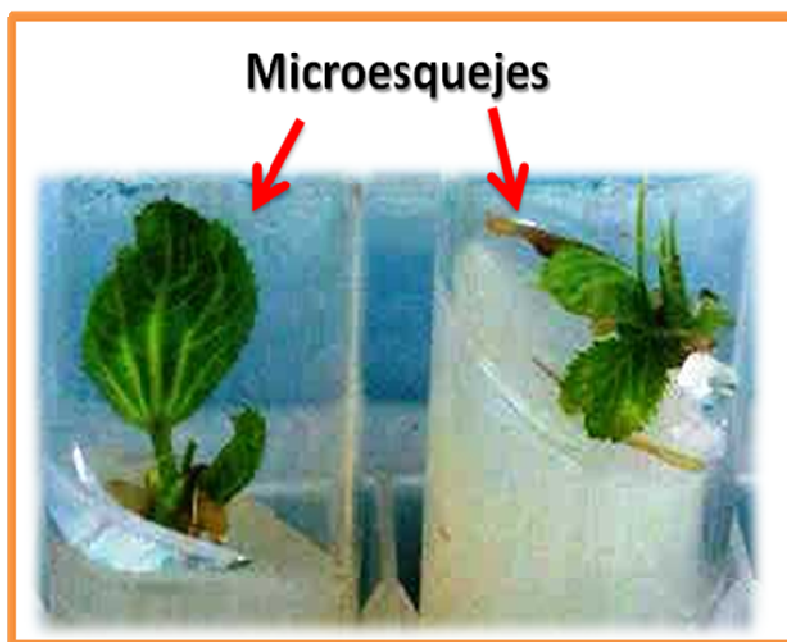


Figura N°9:
Microesquejes de
Hibiscus sabdariffa
cultivados en MS+BA
a los 30 días del
establecimiento del
cultivo.

Figura N°10:
Microesquejes de
Hibiscus rosa-sinensis L.
cv. rosa-sinensis (cayena
doble) cultivados en MS
a los 30 días del
establecimiento del
cultivo

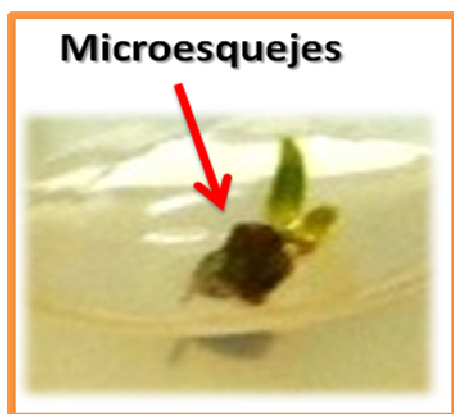
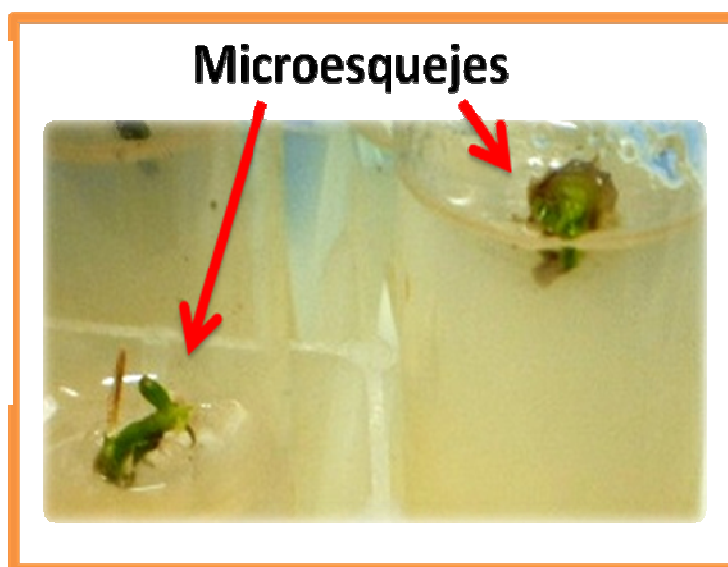


Figura N°11: Microesquejes de
Hibiscus rosa-sinensis L. *cv. rosa-*
sinensis (cayena doble) cultivados
en MS+BA a los 30 días del
establecimiento del cultivo.

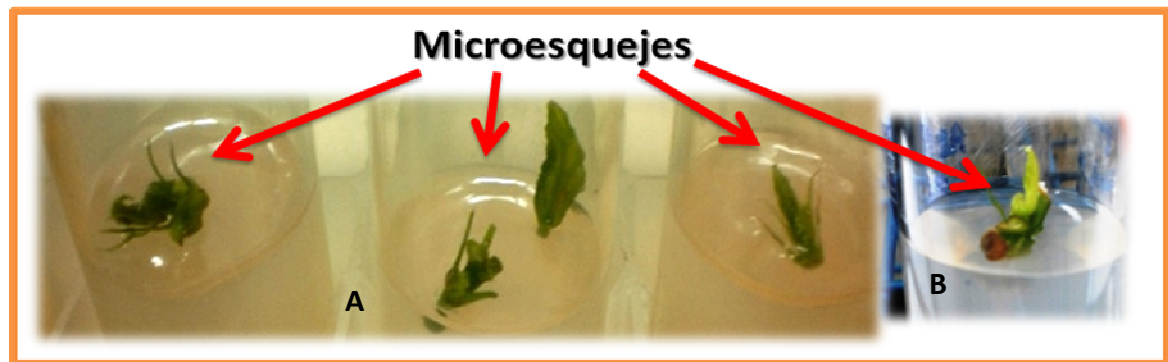


Figura N°12 Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (cayena simple) a los 30 días del establecimiento del cultivo. A. Microesquejes cultivados en MS. B. Microesquejes cultivados en MS+BA.

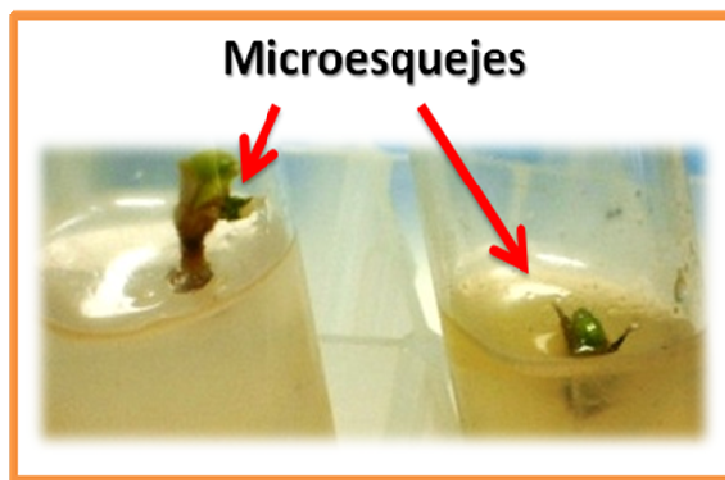
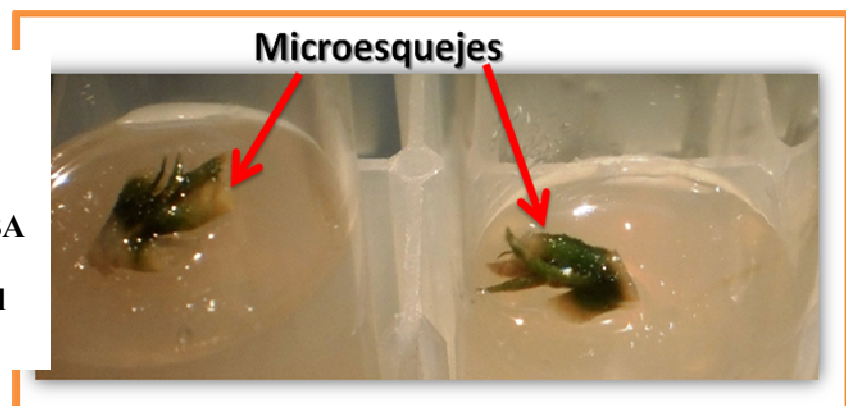


Figura N°13: Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* (cayena doble) cultivados MS a los 30 días del establecimiento del cultivo

Figura N°14: Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* (cayena doble) cultivados en MS+BA a los 30 días del establecimiento del cultivo



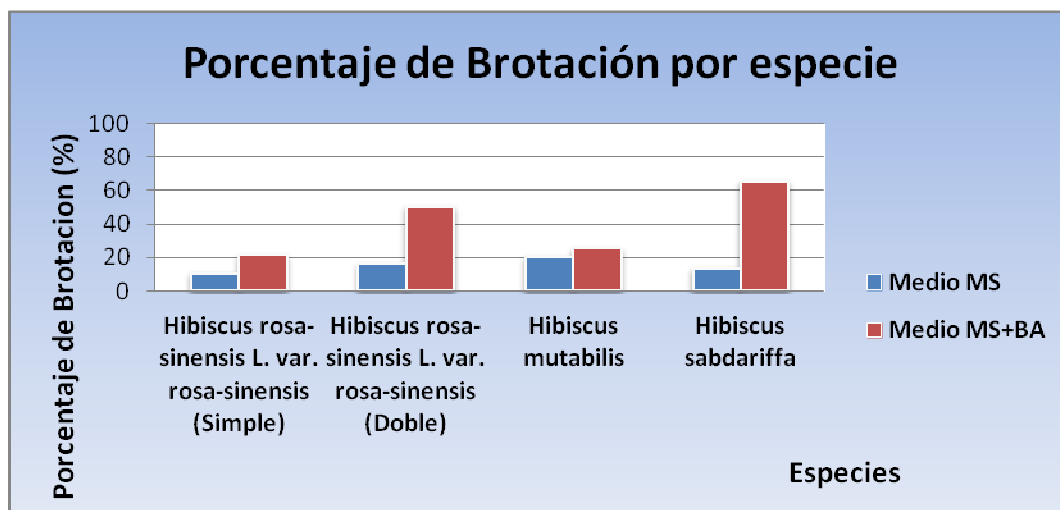


Figura N°15: Porcentaje de brotación de yemas (microesquejes) por especie al primer mes de cultivo en los medios MS2 y MS3 (ver tabla N°2) en el establecimiento del cultivo.

Como puede observarse en la tabla N°6 y en la figura N°16, a los 30 días de colocar los microesquejes en los medio con 1 y 2 mg/L BA (MS+BA) se observó la inducción de brotes, además de la formación de callos. El menor porcentaje de inducción de brotes se registró en *Hibiscus sabdariffa* tanto para 1 y 2 mg/L BA (8-10 %), mientras que para *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple), *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble) y *Hibiscus mutabilis* (41-40 %; 39 %; 46-29 % respectivamente), los porcentajes de inducción de brotes fueron mayores para los medios 1 y 2 mg/L BA. Como podemos notar, en los medios suplementados con un 1 y 2 mg/L de benciladenina no hay una diferencia significativa a la inducción de la brotación (Tabla N°7). Es importante hacer referencia a la cantidad de callos formados por especie, percibiéndose que en 2 mg/L BA la cantidad de callo es mayor (Figura N° 17 y Tabla N°6). Los mayores porcentajes de formación de callo se observaron en las especies de *Hibiscus sabdariffa* e *Hibiscus mutabilis*, con un 70 % y 17 % respectivamente. Los callos eran de color verde blanquecina, apariencia granular y frecuentemente emergían del nudo del microesqueje (Figura N° 17,19, 20, 21).

La aplicación del análisis estadístico arroja que hay diferencias significativas en el genotipo de las especies en relación a la respuesta a la inducción de la brotación, siendo diferentes *Hibiscus mutabilis* con *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple) y *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble), de igual manera *Hibiscus sabdariffa* con *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble). Y las especies iguales son: *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple) con *Hibiscus mutabilis*, *Hibiscus mutabilis* con *Hibiscus sabdariffa*, y *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple) con *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble) siendo estas dos especies un morfotipo (Tabla N° 7).

Haciendo referencia a la influencia que ejercen las citoquininas añadidas en los medios de cultivo sobre la inducción y el desarrollo de los brotes, Christensen et al., en el 2008, llegó a la conclusión de que benciladenina induce la formación de yemas axilares, trabajando con *Hibiscus rosa-sinensis*, pero deduce que bajos niveles de citoquininas promueven la diferenciación y regeneración. Demostrando específicamente que *Hibiscus rosa-sinensis* tiene un mayor rendimiento a bajas concentraciones de citoquininas.

Sivanesan et al., en el 2007, realizó un estudio tomando en cuenta el tipo, la concentración de los reguladores de crecimiento y la fuente de los explantes, donde evaluó las condiciones óptimas para regenerar yemas de *Sida cordifolia* (Malvaceae). Cuando los brotes fueron cultivados en un medio de cultivo que contenía una citoquinina (BA), las yemas axilares se desarrollaron precozmente, proliferando para formar grupo de brotes secundarios y terciarios. Concentraciones de BA superiores tenía un efecto negativo en la regeneración de brotes.

Ayadi et al., en el 2011, trabajando con la propagación y regeneración de microesquejes de *Hibiscus cannabinus* concluye que la regeneración de brotes depende de la suma de las concentraciones de los reguladores de crecimiento que posee la planta y los medios de cultivo. Además que los medios MS suplementados con 1 mg/L de BA se utilizan para estimular y/o disparar el alargamiento de los brotes, ya que la adición de BA al medio de cultivo reprograma las células de los meristemas de los brotes axilares, causando una acelerada división, dando lugar a múltiples yemas vegetativas.

Herath et al., en el 2004, trabajando con la regeneración de microesquejes de varios cultivares de *Hibiscus Cannabinus* señalaron que BA es la citoquinina mas utilizada para disparar la formación de múltiples microesquejes. Bajas concentraciones de BA reprograma el desarrollo del ápice del brote y hace que las células que normalmente permanecen en reposo (en lugar de dividirse), dan lugar a múltiples yemas vegetativas. Pero altas concentración de BA (2 mg/L) induce a la formación de callos, suprimiendo completamente el crecimiento de los brotes, reduciendo la eficiencia de la regeneración de los brotes en todos los cultivares. Govinden et al., en el 2009 cultivando *Hibiscus sabdariffa* encontraron también que concentraciones mayores a 1,98 mg/L de BA tienen resultados negativos en la regeneración de brotes.

Chen et al., en el 2010 empleado cotiledones de *Hibiscus cannabinus* dedujeron que altas concentraciones de BA inducen a la formación de callo en la base de los brotes, ya que el callo puede competir con los meristemas axilares en la absorción de nutrientes. La excesiva proliferación de callos también puede tener un impacto negativo en la nutrición del meristema, poniendo así en peligro la capacidad de

regeneración. Bhalla et al., en el 2009, induciendo brotes de *Hibiscus rosa-sinensis* observaron la formación de callos en los extremos de los microesquejes, y concluyeron que el callo es una respuesta natural de la planta a una lesión en las células de alrededor de la área del daño, las cuales se dividen rápidamente de modo que una capa de células se forman sobre la herida. El crecimiento y el desarrollo del callo implica una compleja relación entre el explante utilizado, los constituyentes del medio y las condiciones ambientales durante el periodo del cultivo. De igual manera, altas concentraciones de BA inducen a la formación de callos a partir de los meristemas de los brotes apicales.

Tabla N°6: Porcentaje de explantes con formación de brotes y callos para dos concentraciones de benciladenina (BA) al mes de cultivo de diferentes especies de *Hibiscus*.

	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cav. <i>rosa-sinensis</i> (Simple) (n=80)		<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cav. <i>rosa-sinensis</i> (Doble) (n=80)		<i>Hibiscus mutabilis</i> (n=80)		<i>Hibiscus sabdariffa</i> (n=80)	
Respuestas	Porcentaje de explantes con brotes (%)	Porcentaje de explantes con callo (%)	Porcentaje de explantes con brotes (%)	Porcentaje de explantes con callo (%)	Porcentaje de explantes con brotes (%)	Porcentaje de explantes con callo (%)	Porcentaje de explantes con brotes (%)	Porcentaje de explantes con callo (%)
Medios								
1 mg/L de BA	41	6	39	0	46	0	41	20
2 mg/L de BA	40	3	39	10	29	17	41	75

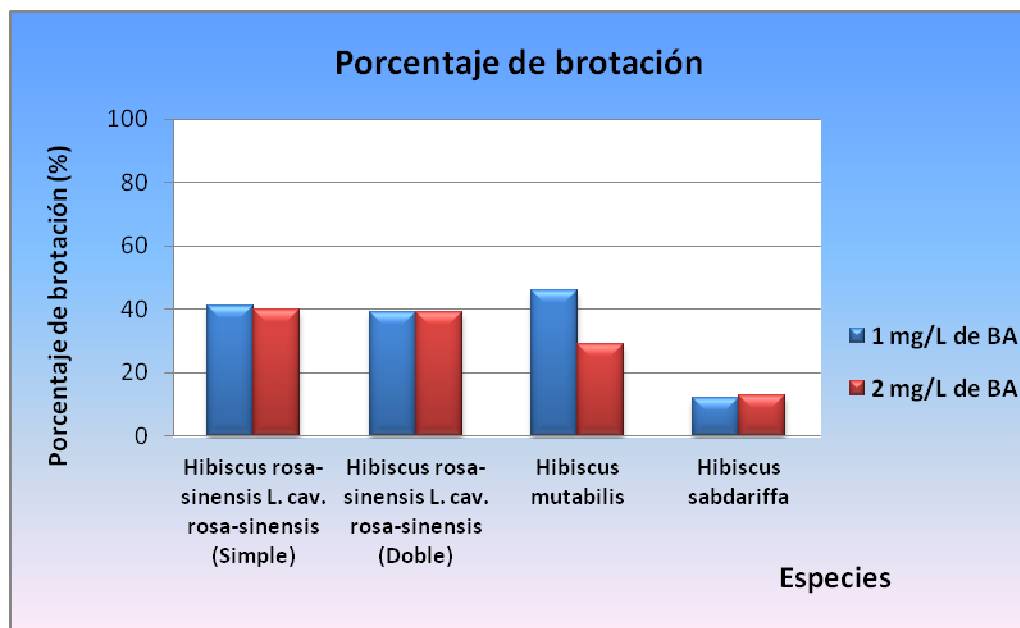


Figura N°16 Porcentaje de brotación por especie al primer mes de cultivo en los medios MS2 y MS3, al mes de cultivo.

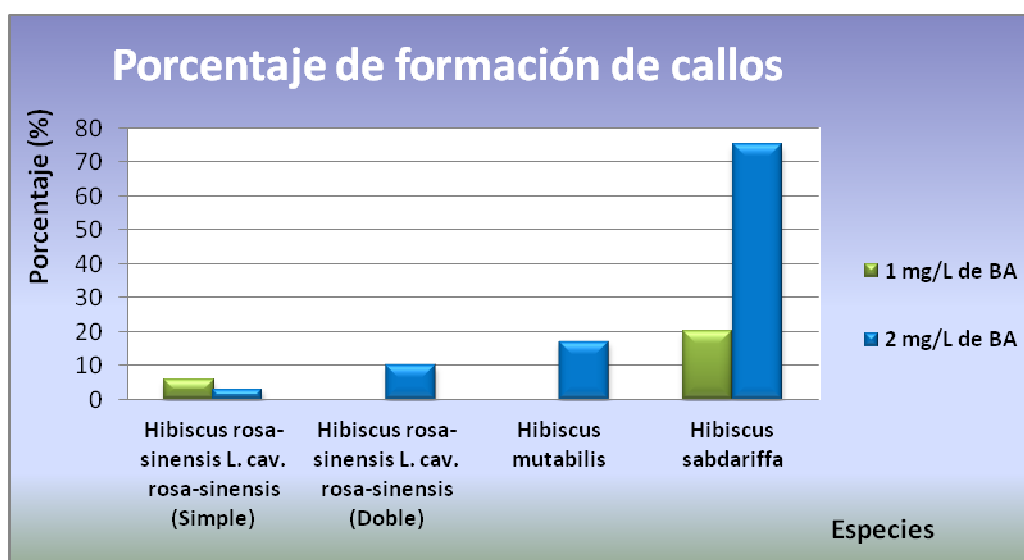


Figura N°17: Porcentaje de formación de callos por especie al primer mes de cultivo en los medios MS2 y MS3, en la etapa de inducción a la brotación.

Tabla N°7: Contratación del genotipo y medio de cultivo para la inducción de la brotación de diferentes especies de *Hibiscus*.

Genotipo(G)	Medio (M)	Genotipo vs. Medio
CS ^a	CS ^a	CS ^a
CD ^a	CD ^a	CD ^a
HM ^b	HM ^a	HM ^a

HS ^{a,b}	HS ^a	HS ^a
-------------------	-----------------	-----------------

(CS: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, CD: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, HM: *Hibiscus mutabilis*, HS: *Hibiscus sabdariffa*) (Letras iguales diferencias no significativas, letras diferentes diferencias significativas).

Tabla N°8: Contratación del genotipo y medio de cultivo para la formación de callo en la inducción de brotes de diferentes especies de *Hibiscus*.

Genotipo(G)	Medio (M)	Genotipo vs. Medio
CS ^a	CS ^a	CS ^a
CD ^a	CD ^a	CD ^a
HM ^a	HM ^a	HM ^a
HS ^a	HS ^a	HS ^a

(CS: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, CD: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, HM: *Hibiscus mutabilis*, HS: *Hibiscus sabdariffa*) (Letras iguales diferencias no significativas, letras diferentes diferencias significativas)



Figura N°18 Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 1 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.

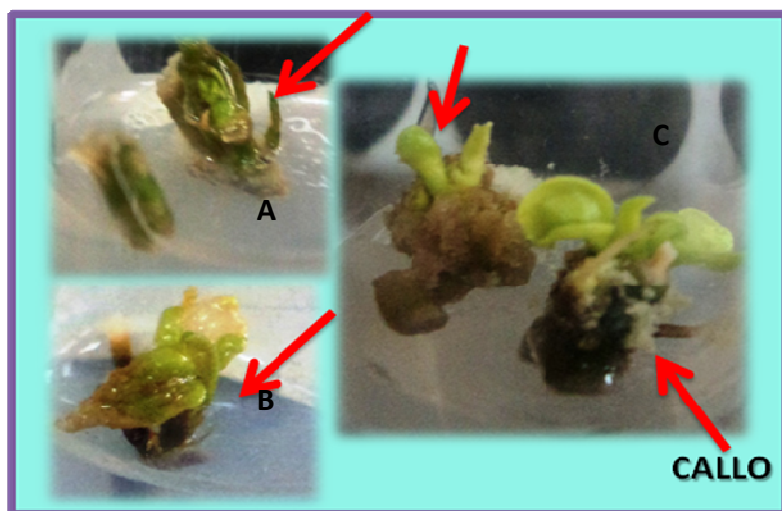


Figura N°19
Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 2 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.
. A-B. Explantes sin callo.
C. Explantes con callo.

Figura N°20
Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena doble) cultivados en 1 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.
. A-C. Explantes sin callo.
B. Explante con callo.

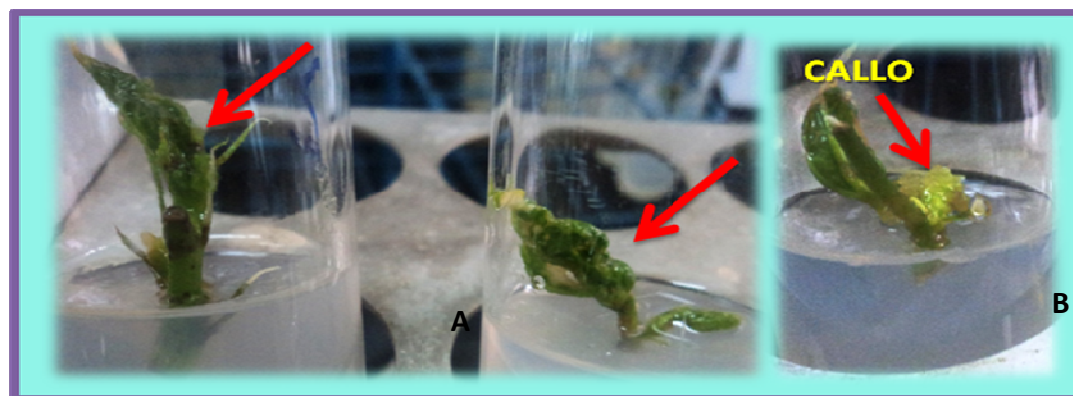
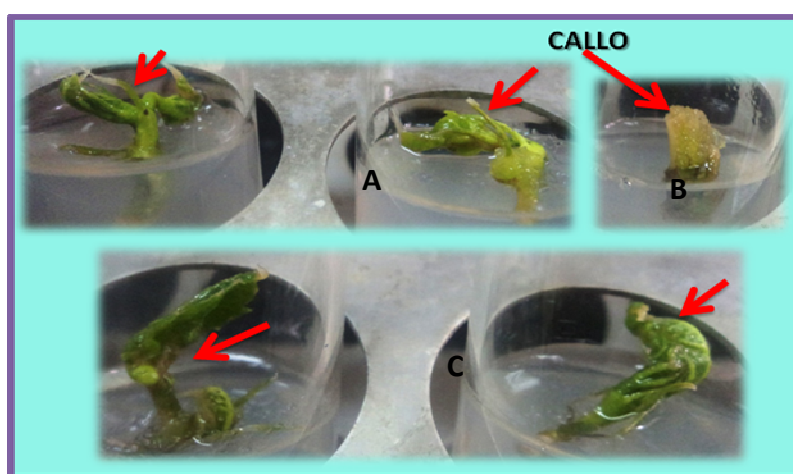


Figura N°21 Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena doble) cultivados en 2 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación. A. Explantes sin callo. B. Explante con callo.

Fi

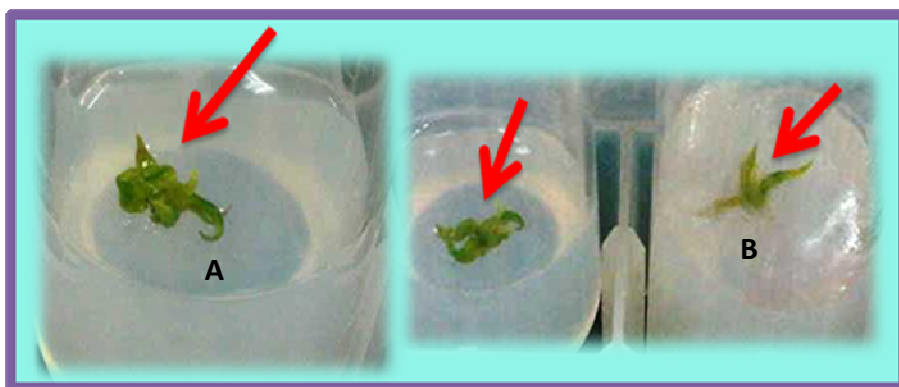


Figura N°22
Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* cultivados en 1 mg/L de BA. A. Explante al mes de cultivo. B. Explantes a los 15 días de cultivo.



Figura N°23 Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* cultivados en 2 mg/L de BA en la inducción a la brotación. A. Explante al mes de cultivo. B. Explante a los 15 días de cultivo.

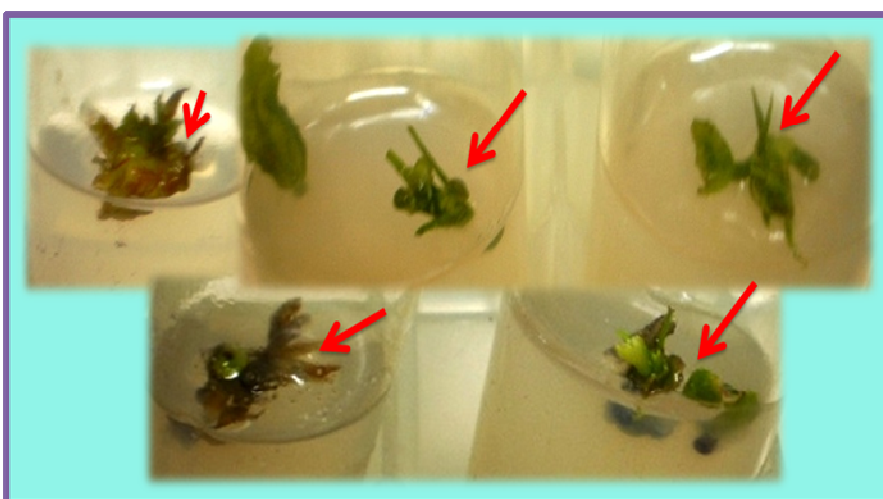


Figura N°24:
Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 1 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.



Figura N°25 Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 2 mg/L de BA al mes de cultivo en la inducción a la brotación.

Una vez que se ha logrado establecer la inducción de brotación de las yemas provenientes de plantas de tres especies de *Hibiscus* cultivadas en condiciones de vivero, se procedió a probar otros medios de cultivo para desarrollar la etapa de multiplicación del material vegetal. Pasados los 30 días de mantener los microesquejes de las tres especies de *Hibiscus*, en medios para la inducción de brotación de yemas con benciladenina (BA) con 1 mg/L y 2 mg/L, se repicaron en medios para la multiplicación de brotes (MS4 = 2 mg/L BA y 0.5 mg/L TDZ; MS5 = 1.5 mg/L BA y 0.01 mg/L AIA), con el objetivo de la producción de múltiples brotes a partir de microesquejes.

El promedio de brotes por explante obtenidos para cada especie de *Hibiscus* puede observarse en la tabla N°9 y figura N°26. El promedio de brotes por explante, mas alto se obtiene en los microesquejes multiplicados con el medio suplementado 1,5 mg/L de Benciladenina y 0.01 mg/L de acido indolacetico, si los comparamos con los medios suplementados con 2 mg/L de benciladenina mas 0,5 mg/L de thidiazuron, para las especies *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena Doble) un promedio de 2.31 brotes por explante, *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena Simple) un

promedio de 2.19 brotes y *Hibiscus mutabilis* un promedio de 2 brotes por explante; con la especie *Hibiscus sabdariffa* pasa lo contrario en el medio suplementado con BA y TDZ dió mayor porcentaje de brotes por explante siendo este 1.85. Si comparamos los medios de multiplicación por especie, podemos notar que el promedio de brotes por explantes es ± 2 , por ende no se nota una diferencia en la respuesta de los explantes por especie, ante los dos medios de multiplicación de brotes (Fig. N° 28-34).

Al aplicar el análisis estadístico se apreció que no hubo diferencias significativas en el promedio de brotes por explante, por especie y por medio de multiplicación (tabla N° 11 y 12).

Tabla N°9. Números de brotes por explante para cada una de las especies de *Hibiscus* al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.

	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cv. <i>rosa-sinensis</i> (Simple) (n=20)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. cv. <i>rosa-sinensis</i> (Doble) (n=20)	<i>Hibiscus mutabilis</i> (n=20)	<i>Hibiscus sabdariffa</i> (n=20)
Respuesta	Numero de brotes por explante			
Medios				
MS4	2.11	1.67	1.33	1.85
MS5	2.19	2.31	2	1.7

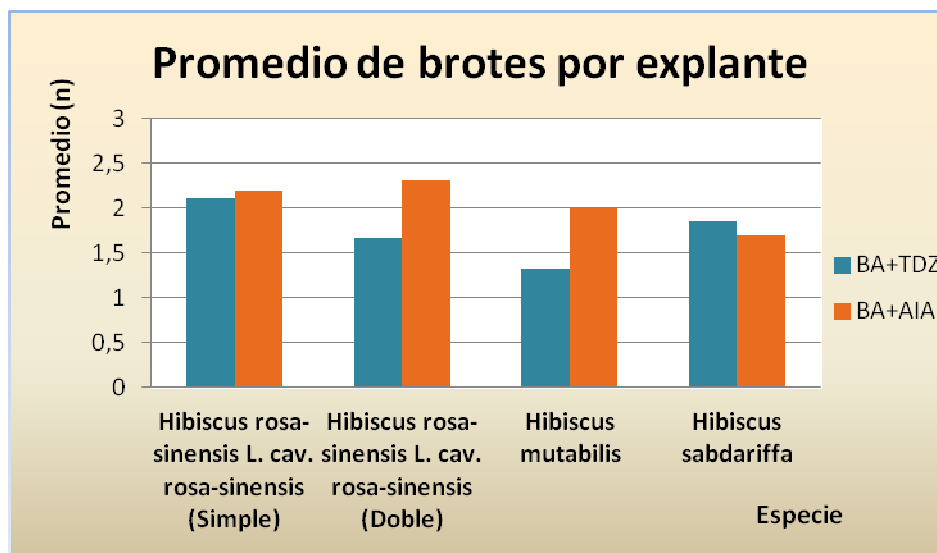


Figura N°26: Promedio de brotes por explante para cada una de las especies de *Hibiscus* al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.

En la tabla N° 10, podemos apreciar el porcentaje de la formación de callo en la etapa de multiplicación para cada especie de *Hibiscus*. El mayor porcentaje se da con el medio suplementado con 2 mg/L de benciladenina mas 0.5 mg /L de thidiazuron con un 66% *Hibiscus mutabilis* y un 33% *Hibiscus rosa-sinensis cv. rosa-sinensis*. Sin embargo, a pesar de que varía la formación de callo en la etapa de multiplicación de brotes para cada una de las especies *Hibiscus* de acuerdo al medio empleado y el genotipo, estadísticamente no hay una diferencia significativa si tomamos en cuenta el medio y el genotipo (Tabla N° 10 y 12). En las figuras N° 36, 37 y 38 se puede observar que el callo es granular de color verde blanquecino y se forma en la periferia de yema, emergiendo del nudo del explante.

	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> <i>L. cav. rosa-sinensis</i> (Simple) (n=20)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> <i>L. cav. rosa-sinensis</i> (Doble) (n=20)	<i>Hibiscus mutabilis</i> (n=20)	<i>Hibiscus sabdariffa</i> (n=20)
--	--	---	-------------------------------------	--------------------------------------

Respuestas	Porcentaje de explantes con callo (%)	Porcentaje de explantes con callo (%)	Porcentaje de explantes con callo (%)	Porcentaje de explantes con callo (%)
Medios				
MS4	11	33	66	0
MS5	0	19	0	0

Tabla N°10: Porcentaje de explantes con callos en la etapa de multiplicación al mes de cultivo de las diferentes especies de *Hibiscus*.

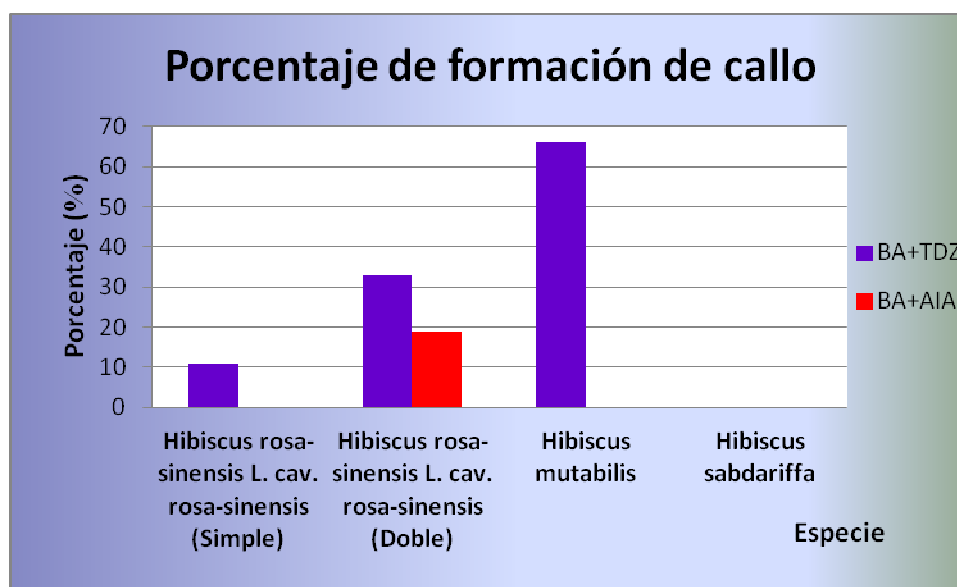


Figura N°27: Porcentaje de formación de callos por especie al primer mes de cultivo en los medios MS4 y MS5 de las diferentes especies de *Hibiscus*.

En la etapa de inducción a la brotación, se evidenció que concentraciones de 1 y 2 mg/L de benciladenina promovieron la inducción de brotes. Sin embargo, con 2 mg/L de BA, también hubo formación de callo. La benciladenina reprograma el desarrollo del ápice del brote, causando una acelerada división de las células que se mantienen en reposo (Herath, 2004). Pero también una alta concentración de BA posee efectos inhibitorios en el desarrollo y regeneración en la inducción y multiplicación de brotes, que a su vez puede formar callo (Chen, 2010). Asimismo, tenemos que tener en cuenta que una buena respuesta a la regeneración de brotes, se presentara si hay un balance adecuado de citoquininas y auxinas (endógenas, exógenas) en el explante lo que favorece la inducción del proceso (Pierik, 1990).

De hecho una cantidad de autores han reportado la influencia que ejerce la benciladenina en la formación de múltiples brotes. Christensen et al., 2008 obtuvieron la mayor tasa de multiplicación (4,6 brotes/explante) con 0,5 mg/L de BA, mientras que al emplear concentraciones mayores a 5 mg/L de BA, observaron efectos inhibitorios, aparte de que disminuye la longitud del tallo. Herath et al., en el 2004, regeneraron *Hibiscus cannabinus* obteniendo el mayor número de brotes (11 brotes/explante) y un alto porcentaje de regeneración (76,5%) con 2 mg/L de BA. Concentraciones mayores a 2 mg/L de benciladenina reduce el promedio de brotes por explante. Ayadi et al., en el 2011 obtuvieron la más alta tasa de multiplicación con 1 y 2 mg/L de BA, siendo 3,22 y 3,66 brotes por explante, pero también deducen que concentraciones de 2 mg/L de BA aumenta la inducción de callo y suprime completamente el crecimiento de los brotes. Bhalla et al., en el 2009 obtuvo 1,94 brotes por explante al cultivarlos en medio MS mas 3,4 mg/L de BA siendo esta la tasa más alta de multiplicación, pero también observaron que altas concentraciones de BA formaban callos en los extremos de los microesquejes. Govinden et al., en el 2009, de la misma manera, nos comenta que concentraciones mayores a 1,98 mg/L tiene resultados negativos en la regeneración y multiplicación de brotes de *Hibiscus sabdariffa*.

Ahora bien, se debe tomar en cuenta los efectos y las interacciones entre las sustancias de crecimiento como la benciladenina, el ácido indolacético y thidiazuron en la etapa de multiplicación al cultivar microesquejes. Es por ello que muchos investigadores han estudiado este efecto. Como se mencionó anteriormente, la interacción entre auxinas y citoquininas tanto endógenas como exógenas en el medio de cultivo y/o en el explante, pueden generar respuestas favorables o no para el desarrollo

o multiplicación del brote, suponiendo que los niveles de citoquininas son altos, es lógico pensar que se favorece la formación del callo.

Scoville et al., 2006, trabajando con varios cultivares de *Hibiscus rosa-sinensis* al agregar thidiazuron en bajas concentraciones a los medios de multiplicación, observó gran número de brotes por explante, lo que es debido a que este regulador de crecimiento, en muchas especies de plantas, promueve la diferenciación y regeneración de brotes con mayor eficiencia que otras citoquininas. Srivatanakul et al., en el 2000, llega a una conclusión parecida, trabajando con *Hibiscus cannabinus*, en un medio MS suplementado con 1 mg/L de TDZ, generando un alto número de brotes por explante, pero también deduce que las tasas de multiplicación dependerán de varios factores como el explante, el clon, la especie, la juventud y el origen.

Sylvère et al., en el 2010 trabajó con varios cultivares de *Hibiscus sabdariffa*, al inducir explantes a diferentes concentraciones de TDZ (0,01-1 mg/L), señalaron que esta sustancia tiene un efecto importante en la iniciación del callo, donde los porcentajes de inducción de callo variaron entre 88,93 a 100 %. Sin embargo, ellos comentan que este regulador de crecimiento puede inducir a la multiplicación de brotes. Govinden et al., en el 2009, propagó vegetativamente explantes de *Hibiscus sabdariffa*, indicado que los reguladores de crecimiento pueden tener varios efectos, tales como: el alargamiento, la regeneración, el crecimiento y/o el retraso de la inducción de los brotes, y que a su vez, puede existir la formación de callo. Por otro lado, al agregarle al medio 1.5 mg/L de TDZ los explantes mostraron una mayor respuesta en la formación del callo (80%), mientras que concentraciones menores a 0,5 mg/L disminuyen la formación de callos en los explantes.

Son escasos los trabajos de investigación que emplean ácido indolacético (AIA) en la etapa de multiplicación de brotes para el género de *Hibiscus*. Sin embargo, Chen et al., en el 2010 regenerando plantas de *Hibiscus cannabinus* a través de la organogénesis directa probaron varias concentraciones de AIA en interacción con BA, llegando a la conclusión que concentraciones menores a 0,5 mg/L de AIA con 5 mg/L de BA inducen un mayor número de brotes (11,88/explante), pero cuando se aumenta la concentración de benciladenina, se reduce el número de brotes con la formación de callo (5,27/explante). En conclusión, la tasa de multiplicación más alta se obtuvo con un medio MS suplementado con 5 mg/L de BA y 0,5 mg/L de AIA.

Tabla N°11: Contrastación del genotipo y medio para la multiplicación de brotes de diferentes especies de *Hibiscus*.

Genotipo(G)	Medio (M)	Genotipo vs. Medio
CS ^a	CS ^a	CS ^a
CD ^a	CD ^a	CD ^a
HM ^b	HM ^a	HM ^a
HS ^a	HS ^a	HS ^a

(CS: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, CD: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, HM: *Hibiscus mutabilis*, HS: *Hibiscus sabdariffa*) (Letras iguales diferencias no significativas, letras diferentes diferencias significativas)

Tabla N°12: Contrastación del genotipo y medio para la multiplicación (formación de callo) de diferentes especies de *Hibiscus*.

Genotipo(G)	Medio (M)	Genotipo vs. Medio
CS ^a	CS ^a	CS ^a
CD ^a	CD ^a	CD ^a
HM ^a	HM ^a	HM ^a
HS ^a	HS ^a	HS ^a

(CS: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, CD: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, HM: *Hibiscus mutabilis*, HS: *Hibiscus sabdariffa*) (Letras iguales diferencias no significativas, letras diferentes diferencias significativas)

Tabla N°13: Contrastación del genotipo y medio para la multiplicación (brotes por explante) de diferentes especies de *Hibiscus*

Genotipo(G)	Medio (M)	Genotipo vs. Medio
CS ^a	CS ^a	CS ^a
CD ^a	CD ^a	CD ^a
HM ^a	HM ^a	HM ^a
HS ^a	HS ^a	HS ^a

(CS: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, CD: *Hibiscus rosa-sinensis* var. *rosa-sinensis*, HM: *Hibiscus mutabilis*, HS: *Hibiscus sabdariffa*) (Letras iguales diferencias no significativas, letras diferentes diferencias significativas)

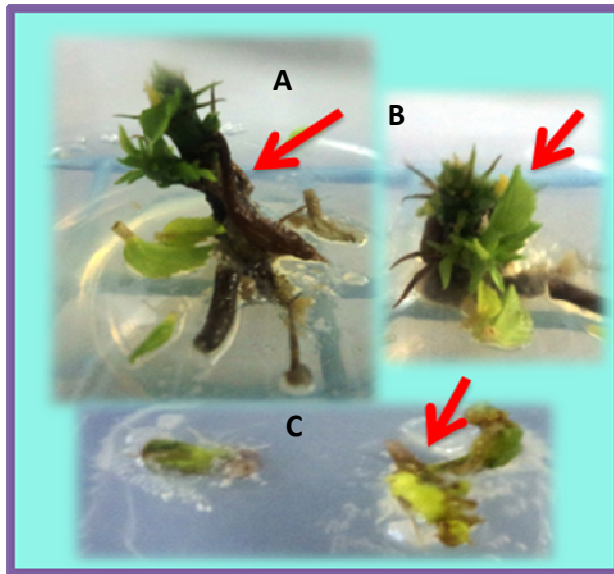


Figura N°28: Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA en la etapa de multiplicación. A-B. Explantes al mes de cultivo. C. Explantes a los 15 días de

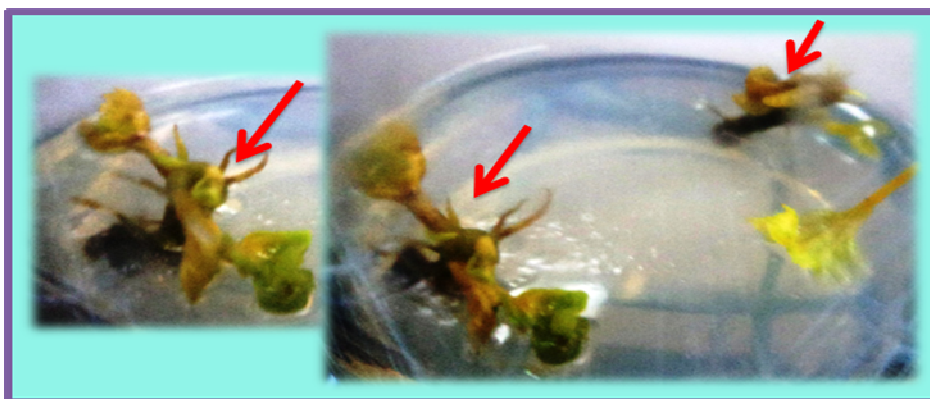


Figura N°29 Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 2 mg/L de BA y 0.5 mg/L TDZ al mes de cultivo en la etapa de multiplicación

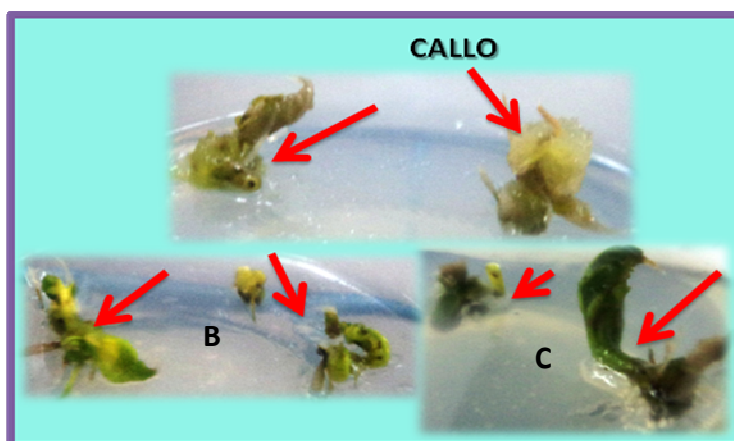


Figura N°30: Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv *rosa-sinensis* (cayena doble) cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA al mes de cultivo en la etapa de multiplicación. A. Explantes con brotes y callos. B-C. Explantes con brotes.

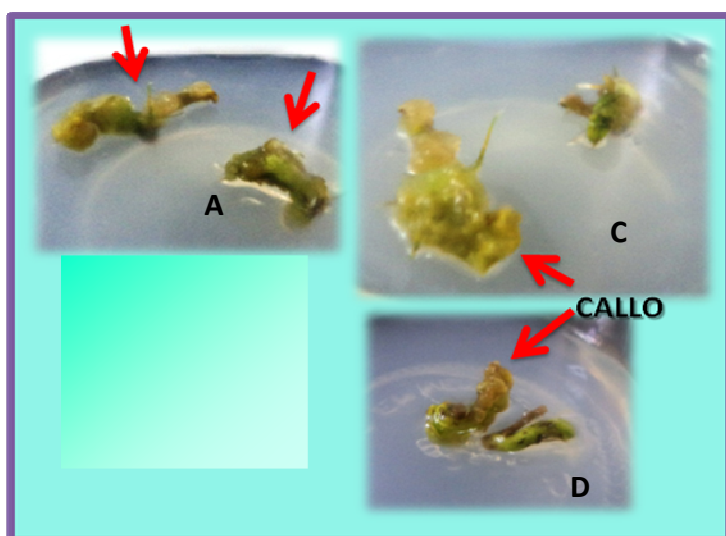


Figura N°31 Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv *rosa-sinensis* (cayena doble) cultivados en 2 mg/L de BA y 0.5 mg/L TDZ al mes de cultivo en la etapa de multiplicación. A. Explantes con brotes. C-D. Explantes con brotes y callos.

Figura N°32: Microesquejes de *Hibiscus mutabilis* cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA al mes de cultivo con brotes y callos, en la etapa de multiplicación.



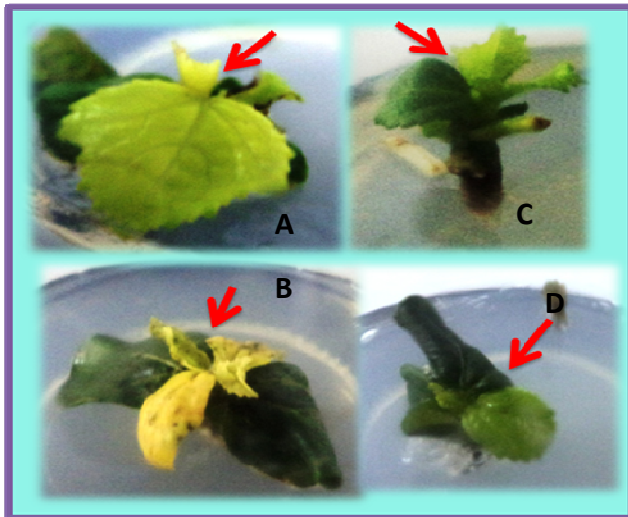


Figura N°33 Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 1.5 mg/L de BA y 0.01 mg/L AIA en la etapa de multiplicación. A-B. Explantes con brotes al mes de cultivo. C-D. Explantes con brotes a los 15 días del cultivo.

Figura N°34 Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 2 mg/L de BA y 0.5 mg/L TDZ al mes de cultivo en la etapa de multiplicación.

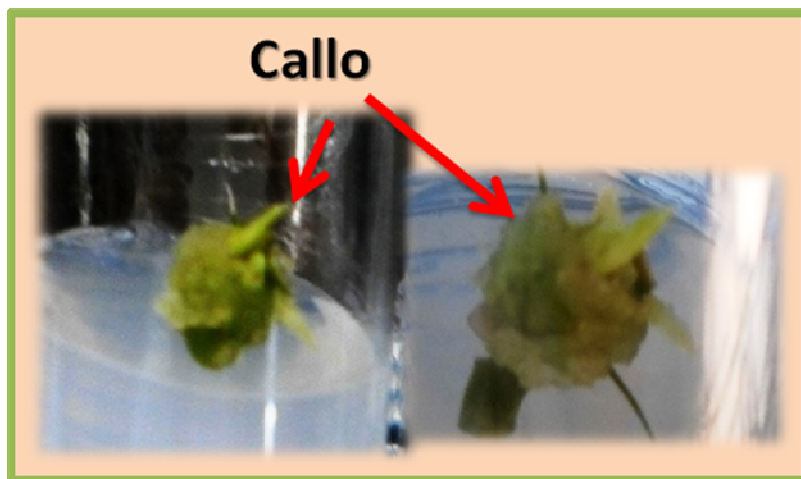
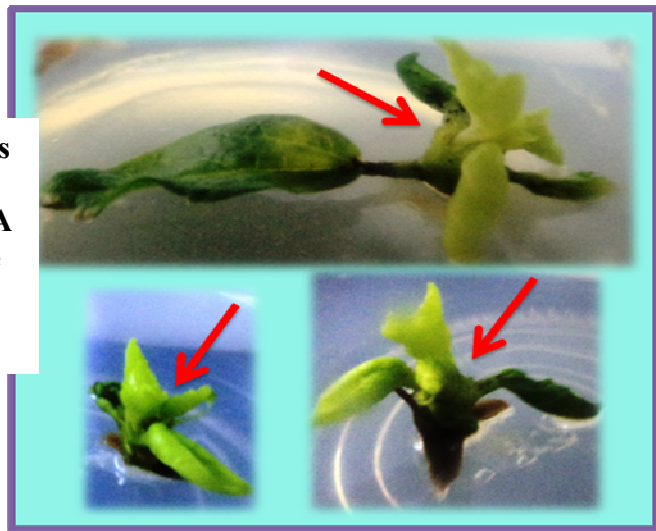


Figura N° 35: Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 2 mg/L de BA con callo al mes de cultivo.

Figura N° 36: Microesquejes de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* (cayena simple) cultivados en 1, mg/L de BA+0,01 mg/L de AIA con callo al mes de cultivo. A.

Corte transversal del explante. B. Callo en el nudo del explante. (Ver

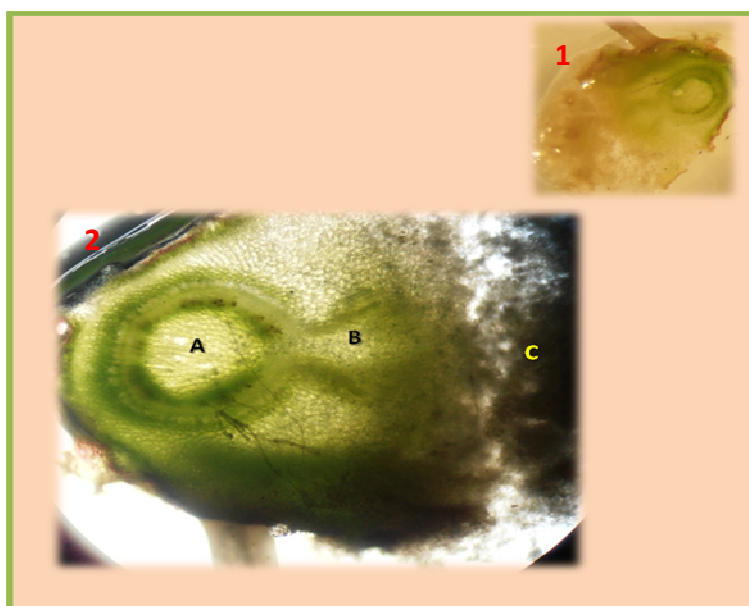
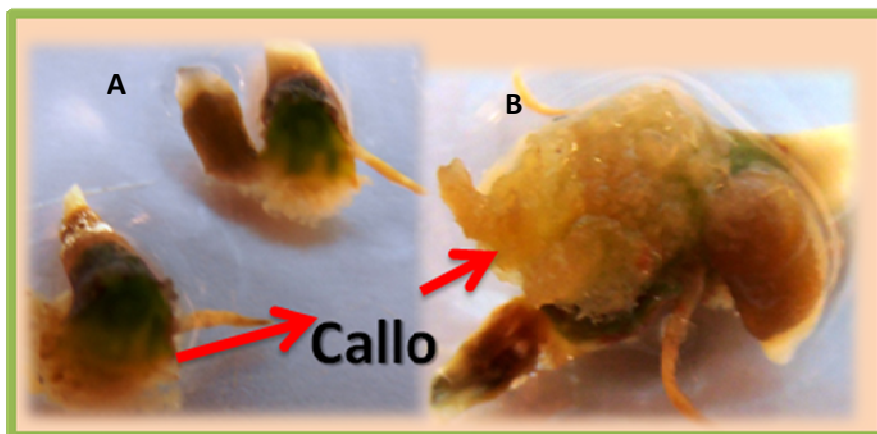


Figura N°37: Corte transversal del explante con callo de *Hibiscus rosa-sinensis* cv. *rosa-sinensis* en la etapa de multiplicación. 1. Fotografía tomada con un microscopio estereoscópico. 2. Fotografía tomada con un microscopio óptico 10X (A) Tejido vascular. (B) Yema. (C) Callo.

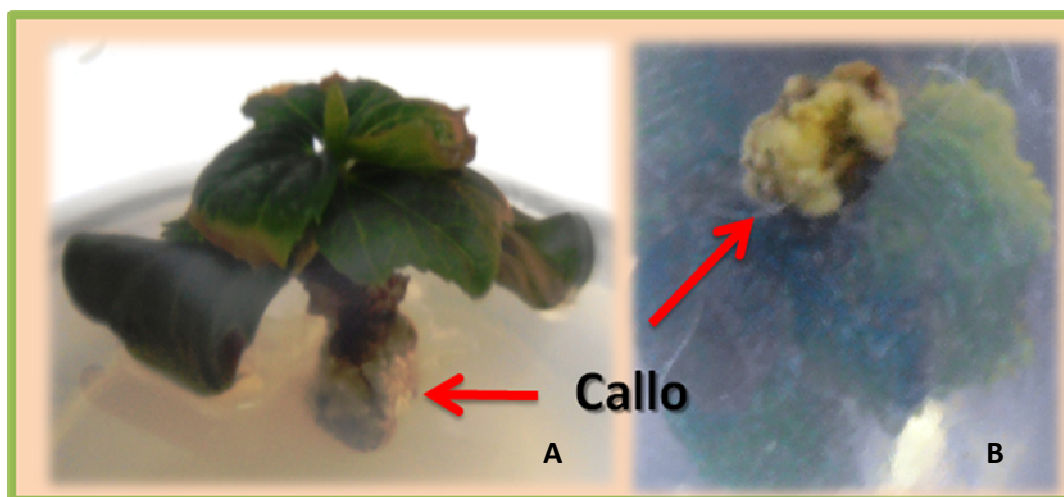


Figura N°38: Microesquejes de *Hibiscus sabdariffa* cultivados en 2 mg/L de BA mas 0,5 mg/L de TDZ con callo al mes de cultivo. A. Plántula con callo. B. Callo en el extremo del explante.

CONCLUSIONES

-  El protocolo de desinfección N°4, el medio de cultivo 2 mg/L de fungicida Carbendazim fue apropiado para disminuir el alto porcentaje de contaminación de yemas y microesquejes en la etapa del establecimiento del cultivo de las tres especies en estudio.
-  Los microesquejes resultaron ser mejores explantes que las yemas, en el momento del establecimiento del cultivo para las tres especies en estudio.
-  En la etapa de establecimiento de cultivo *in vitro*, los mayores porcentajes de brotación de yemas para las tres especies estudiadas se obtuvieron en el medio donde se le adiciono BA, con respecto al medio control, donde no se le adiciono ninguna sustancia de crecimiento.
-  *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple) es la especie que responde en un tiempo más corto a la inducción de la brotación, a los 4 días luego de repicada con un medio MS suplementado con benciladenina.
-  En la etapa de inducción a la brotación, en los medios suplementados con 1 y 2 mg/L de BA para las tres especies de Hibiscus no presentan diferencias significativas en el porcentaje en la inducción de brotes.

 Con el uso de 2 mg/L de BA se indujo la formación de callo en los explantes en las tres especies de *Hibiscus*. Este fenómeno no sucede en la mayoría de las plantas, por lo que podría ser un rasgo característico de la especie.

 Hay diferencias significativas en el genotipo de las especies con respecto a la respuesta de inducción de la brotación, siendo diferentes *Hibiscus mutabilis* con *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena simple) y *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble), *Hibiscus sabdariffa* con *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble).

 A pesar de que varia el proceso de multiplicación de brotes para cada una de las especies *Hibiscus* de acuerdo al medio empleado y el genotipo, estadísticamente se encontró una diferencia significativa si tomamos en cuenta el medio y el genotipo, solo hubo una diferencia en el genotipo en las especies *Hibiscus rosa-sinensis* L. cv. *rosa-sinensis* (Cayena doble) y *Hibiscus mutabilis*.

 Los mayores porcentajes de formación de callo en la etapa de multiplicación de brotes, lo presenta el medio suplementado con 2 mg/L de benciladenina mas 0,5 mg /L de thidiazuron.

 El promedio de número de brotes más alto se obtiene en los microesquejes multiplicados con el medio suplementado 2 mg/L de benciladenina y 0.5 mg/L de ácido indolacético.

 La eficiencia y el desenvolvimiento de las diferentes etapas de la micropropagación al trabajar con especies *Hibiscus*, dependerá de un adecuado método de desinfección en los explantes que se cultivaran.

 La especie *Hibiscus* es una planta medicinal, industrial y alimenticia, con un gran potencial para su manejo biotecnológico, en virtud de tener células capaces de regenerar una planta a través de la micropropagación como herramienta del cultivo *in vitro*. Se podría multiplicar la planta a través de la organogénesis, tomándose como alternativa para el establecimiento de células en suspensión para la producción de metabolitos.

 Es de suma importancia señalar que las tres especies de *Hibiscus*, se utilizan en Venezuela como planta medicinal, ornamental y alimenticia, pero tenemos que destacar que plantas de *Hibiscus sabdariffa* no son cultivadas en el país, por lo que a través de la micropropagación, estaríamos generando miles de plantas para el mercado venezolano. De igual manera, pasa con *Hibiscus mutabilis* y *Hibiscus rosa-sinensis*, donde estas especies no se encuentran fácilmente en los viveros.

 Debemos destacar que a nivel nacional ni internacional, ningún ente se ha dedicado al estudio de la multiplicación *in vitro* de estas especies, debido a su alto porcentaje de contaminación en el establecimiento del cultivo y la difícil propagación, ya que es una especie leñosa.

BIBLIOGRAFÍA

-  Acosta, M., Alvarado, Y., Cruz, M., Leiva, M. Micobiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento in vitro de cinco especies forestales. *Biotecnología Vegetal* **9(2)**: 99-103
-  Airó, M., Giardina, C., Farruggia, C., Zizzo, C. 2007. In vitro propagation of *Hibiscus rosa-sinensis* (L.). *Acta Horti* **812**: III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants.

-  Ayadi, R., Hamrouni, L., Hanana, M., Bouzid, S., Trifi, M., Khouja, M. 2011. In vitro propagation and regeneration of an industrial plant kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Ind Crop Prod* **33**: 474-480.
-  Bhalla, S., Abdullah, O., Sreeramanan, S., Karuthan, C. 2009. Shoots Induction from *Hibiscus Rosa-sinensis* Nodal Explant Using N⁶-benzylaminopurine (BAP). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. **5(4)**: 403-410.
-  Carrazana, G., Herrera, I., León, A., 1997. El uso de fungicidas comerciales en el control de hongos contaminantes en biofabricas. *Centro Agrícola*. **24 (01)**: 61-68.
-  Chen, P., Li, R., Zhou, R., Zhao, Y. 2010. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledonary node of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Afr J biotechnol* **9(50)**: 8693-8697.
-  Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek., M., Müller, R. 2008. In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. *Plant Cell Tiss Org* **93**: 151-161.
-  Cruz, M., Acosta, M., Capote, A., Leiva, M y Yelenis Alvarado. 2003. Efectos del carbendazim para el control de *Colletotrichum* sp., contaminante del establecimiento in vitro de callos de café. *Biotechnologia vegetal* **3(2)**: 111-113.

-  Dasuki, U., Valkenburg, J., Bunyaphratharsa, N., (2001). *Hibiscus*. . Plant Resources of South-East Asia: Medicinal and poisonous plants 2. Backhuys Publisher, Leiden, Netherlands, **12(2)**:297–303.
-  Flores, O., Ma Bolivar, D., Botero, J., Ibrahim, M. 1998. Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas con potencial forrajera para la suplementación de rumiantes en el trópico. *Livestock Research for Rural Development* **10(1)**.
-  Galicia, L., Salinas, Y., Espinoza, B., Sánchez, C. 2007. Caracterización físicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* **14(2)**: 121-129.
-  Gómez-Leyva, J., Martínez, L., López, I., Silos, H., Ramírez-Cervantes, F., Andrade-González, I. 2008. Multiple shoot regeneration of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from shoot apex cultura system. *International Journal of Botany* **4 (3)**: 326-330
-  Govinden-Soulange, J., Boodia, N., Dussooa, C., Gunowa, R., Deensah, S., Facknath, S., Rajkomar, B. 2009. Vegetative propagation and tissue culture regeneration of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle). *World Journal of Agricultural Sciences* **5 (5)**: 651-661.

-  Herath, S., Suzuki, T., Hattori, K. 2004. Multiple shoot regeneration from young shoots of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Plant Cell Tiss Org* **77**: 49-53.
-  Hoyos, J. 1978. Flora Tropical Ornamental. *Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, Monografía N°24. Caracas, Venezuela.
-  Hoyos, J. 1990. Los Arboles de Caracas. *Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, 3^{era} Edicion, monografía N°24. Caracas, Venezuela.
-  Isea, F., Escalante, M., Urdaneta, J y M. Ramirez.2004. Presencia de hongos contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mago (*Mangifera indica* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. **21 Supl. (1)**: 193-199.
-  Krapovickas, A., Fryxell, P. 2004. Las especies sudamericanas de *Hibiscus secc. Furcaria* DC. (*Malvaceae-Hibisceae*). *Bonplandia* **13(1-4)**: 35-115.
-  Lezama, J., Dávila, M., Mondragón, A., Castillo, M., Ramírez, Luis. 2007. Registro y centro etnobotánica de plantas medicinales por expendedores de Barquisimeto, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* **41(4)**: 531-544.
-  Lichtnerová, H., Dragúnová, M., Dokupil, T., Jakábová, A. 2005. Micropropagation of *Hibicus* Genus. *VÚRV* **12**: 125-126.

-  Lindorf, H., De Parisca, L., Rodriguez, P. 2006. Botanica: Clasificación, estructura y reproducción. Segunda Edición: Ediciones de las Biblioteca-UCV. 569.
-  Marín, Juan. 1997. La micropropagación y la mejora de especies frutales. Academia de ciencias exactas físicas, químicas y naturales de Zaragoza. 1-35.
-  Martin, M., Acosta, M., Capote, A., Leiva, M., Alvarado, Y. (2003). Efecto del carbendazim para el control de *Colletotrichum* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de callos de café. *Comunicación Corta Biotecnología vegetal*. **3(2)**: 111 – 113.
-  Medina, M., García, D., Cova, L., Soca, M., Domínguez, C., Baldizán, A., Pizzani, Pablo. 2008. Preferencia de rumiantes por el follaje de árboles, arbustos y herbáceas en la zona baja del estado Trujillo. *Zootecnia Trop*. **26(3)**: 1-5.
-  Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. **15**: 473-497.
-  Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev. Plant. Physiol*. **25**: 135-166.

-  Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid.
-  Pliego, F., Barcelo, A., Simon, E y G de la Viña. 1999. La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill.): Problemas y limitaciones. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 239-244.
-  Ramírez, M., Santos, R y F. Isea. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. **17**: 217-225.
-  Ricardi., M. 1992. Familias de dicotiledóneas venezolanas I. *Universidad de los Andes* 152-154.
-  Ruiz, D., Lara, P., Sierra, A., Aguilar, E., Magaña, M., Sanginés, J. 2006. Evaluación nutritiva y productiva de ovinos alimentados con heno de *Hibiscus rosa-sinensis*. *Zootecnia Trop.* **24**(4).
-  Sáyago, S., Goñi, I. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.* **60: (1)** 79-84.
-  Scoville., R, West., T, (2006) Effects of nutrient salt formulations and PGR on axillary shoot proliferation of tropical hibiscus. *Hortscience* **41**:1024

-  Segretín., M. 2008. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (Cultivo de células vegetales). *Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología*. 1-6.
-  Sivanesan, I., Ryong, B. 2007. Direct shoot regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* Linn. *In Vitro Cell.Dev.Biol-Plant*.**43**: 436-441
-  Srivatanakul, M., Park, S., Sander, J., Salas ., M and R.H. Smith. 2000. Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from shoot apex culture. *Plant Cell*. **19**: 1165-1170.
-  Sylvère, R., Charles, G., Sakhanokho, H., Toueix, Y., Djé, Y., Sangaré, A., Branchard., M. 2010. Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (*Malvaceae*): Influence of explant type, sugar, and plant growth regulators. *AJCS* **4(2)**: 98-105.
-  Vargas, T., De Garcia, E., 1989. Regeneracion *in vitro* de *Rosa var. miniatura* a partir de microesquejes. *ACEVIV* **2(1)**.
-  Vargas, E., Oropeza, M y Eva de Garcia. 2006. Propagación *in vitro* de *Hippeastrum* sp. *Agronomía Trop*. 56(4): 621-626.

 Vieira, S., Pereira, T., Luz, E. 1988. Propagação do Guaraná *in vitro*. I. Seleção de fungicidas. *Fitopatologia brasileira*. **13(3)**: 183-185

 Villalobos, V., Thorpe, T. 2001. Micropropagación: conceptos, metodología y resultado. *Biotecnología Vegetal* **1(2)**: 65-67

Consultas en línea:

 ⁽¹⁾ Sánchez, J., 2003. Las especies del genero *Hibiscus* cultivadas en España. <http://www.arrakis.es/~jmanuel/Hibiscus.pdf>. [consulta 2 de febrero 2011].

 ⁽²⁾ *Hibiscus* L [en línea]. Trópicos Org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/40025797>. [consulta 29 de Abril 2011].

 ⁽³⁾ *Hibiscus rosa-sinensis* L. [en línea]. Trópicos Org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/19600046>. [consulta 29 de Abril 2011].

 ⁽⁴⁾ *Hibiscus sabdariffa* L. [en línea]. Trópicos Org . Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/19600047>. [consulta 29 de Abril 2011].

 ⁽⁵⁾ *Hibiscus sabdariffa* L. [en línea]. Trópicos Org . Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/19600047?tab=synonyms>. [consulta 29 de Abril 2011].

 ⁽⁶⁾ *Hibiscus mutabilis* L. [en línea]. Trópicos Org . Missouri Botanical Garden.
<http://www.tropicos.org/Name/19600166>. [consulta 29 de Abril 2011].

 ⁽⁷⁾ *Hibiscus mutabilis* L. [en línea]. Trópicos Org . Missouri Botanical Garden.
<http://www.tropicos.org/Name/19600166?tab=synonyms>. [consulta 29 de
Abril 2011].

 ⁽⁸⁾ Lista Roja. Especies en peligro de extinción [en línea]. Unión para la
Conservación de la Naturaleza. **<http://www.iucn.org/es/>**. [consulta 2 de Julio
2012].