

**PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE LA ESPECIE MADERABLE: BÁLSAMO
DE TOLÚ (*Myroxylon balsamum*) MEDIANTE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO***

**NORMA INES PEREZ HOYOS
ROGER EDUARDO VIERA ALMANZA**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2008**

PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE LA ESPECIE MADERABLE: BÁLSAMO DE TOLÚ (*Myroxylon balsamum*) MEDIANTE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

**NORMA INES PEREZ HOYOS
ROGER EDUARDO VIERA ALMANZA**

**Trabajo presentado como requisito para optar el título de
Biólogo con énfasis en Biotecnología**

**DIRECTOR:
JAVIER DARÍO BELTRAN Ph. D**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2008**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del Presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

**“Sólo los autores son responsables de las ideas expuestas en este
trabajo”**

(Artículo 12, Resolución 023 del 2000)

DEDICATORIA

Al Divino Creador por dejarme Ser y Existir.

A mis Padres Enith y Cesar, por haberme apoyado incondicionalmente.

A mi hermana Johanna, por su colaboración.

A mi esposo Oscar, por su apoyo y comprensión.

NORMA INES PEREZ HOYOS

DEDICATORIA

A Dios, por ser la fuente de mi inspiración y sabiduría.

A mis Padres Roger y Acacia, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

A mis Abuelos Lilia y Manuel Vicente, y a mi Tía Carlí quienes han sido mis segundos padres.

A mis hermanos Lina y Juan Guillermo, por su apoyo y comprensión.

ROGER EDUARDO VIERA ALMANZA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sucre por darnos todo el conocimiento y la formación adquirida.

Al Doctor Javier Darío Beltrán por su orientación y apoyo en el transcurso de la investigación.

Al profesor Kevin González por su colaboración en el procesamiento de los datos estadísticos.

Al biólogo Eduardo Hernández por su orientación y sugerencias en la elaboración del proyecto.

A Rochy, Carmen, Tania, Gina, Jose, Eden, Tovia, Beatriz, Ember, Katia, Shirley y Tous por su amistad incondicional y por darnos el ánimo que necesitábamos para continuar y culminar este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1. OBJETIVOS.....	18
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2. ESTADO DEL ARTE.....	19
2.1. SITUACIÓN FORESTAL EN COLOMBIA.....	19
2.2. CARACTERÍSTICAS Y ASPECTOS GENERALES DEL BALSAMO DE TOLÚ (<i>Myroxylon balsamum</i>).....	20
2.2.1. Bálsamo de Tolú: <i>Myroxylon balsamum</i>	20
2.2.2. Descripción Botánica.....	21
2.2.3. Ecología.....	21
2.2.4. Semilla.....	22
2.2.4.1. Propagación Forestal.....	22
2.2.4.2. Plantación.....	23
2.2.4.3. Manejo.....	23
2.2.4.4. Turno y Crecimiento.....	23
2.2.5. Fenología.....	24
2.2.6. Estudios Químicos y Obtención del Bálsamo de Tolú.....	25
2.2.6.1. Historia.....	25
2.2.6.2. Recolección.....	25
2.2.6.3. Caracteres.....	25
2.2.6.4. Componentes.....	26
2.2.7. Usos y Manejos en Finca.....	27
2.2.7.1. Maderable.....	27

2.2.7.2.	Medicinal.....	27
2.2.7.3.	Industrial (cosmético/higiene, saborizante).....	28
2.2.7.4.	Sistemas de finca.....	28
2.3.	GENERALIDADES SOBRE EL CULTIVO DE TEJIDOS	
	VEGETALES.....	29
2.3.1.	Micropropagación.....	29
2.3.2.	Ventajas de la micropropagación.....	31
2.3.3.	Desventajas de la micropropagación.....	31
2.3.4.	Etapas de la micropropagación.....	32
2.4.	APLICACIÓN.....	33
2.5.	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN.....	33
2.5.1.	Plantas madres.....	33
2.5.2.	El explante.....	33
2.5.3.	Factores físicos.....	34
2.5.4.	Medio de cultivo.....	34
2.5.4.1.	Soporte.....	34
2.5.4.2.	Componentes minerales.....	35
2.5.4.3.	Componentes orgánicos.....	36
2.5.4.3.1.	Azúcares.....	36
2.5.4.3.2.	Vitaminas.....	36
2.5.4.3.3.	Aminoácidos.....	37
2.5.4.3.4.	Productos orgánicos estimulantes.....	37
2.5.4.4.	Reguladores de crecimiento.....	38
2.5.4.4.1.	Auxinas.....	38
2.5.4.4.2.	Giberelinas.....	39
2.5.4.4.3.	Citoquininas.....	39

2.5.4.4.4.	Acido abscísico.....	40
2.5.4.4.5.	Etileno.....	40
2.6.	MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES	
	PROPAGACIÓN VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>	41
3.	METODOLOGÍA.....	45
3.1.	LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA.....	45
3.2.	CONDICIONES AMBIENTALES.....	45
3.3.	SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PROCEDENTE	
	DE CAMPO.....	45
3.4.	ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	46
3.5.	ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.....	47
3.6.	ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.....	48
3.7.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	49
3.7.1.	Población.....	50
3.7.2.	Número de repeticiones.....	50
3.7.3.	Indicadores.....	50
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1.	ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	52
4.2.	ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.....	55
4.3.	ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.....	58
5.	CONCLUSIONES.....	63
6.	RECOMENDACIONES.....	64
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	65
	ANEXOS.....	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones necesarias para el desarrollo del Bálsamo de Tolú.....	24
Cuadro 2. Calendario de la especie <i>M. balsamum</i>	25
Cuadro 3. Tratamientos ensayados durante la etapa de desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) en explantes de <i>M. balsamum</i>	47
Cuadro 4. Tratamientos ensayados en la etapa de iniciación de <i>M. balsamum</i> con diferentes concentraciones de BAP (μ M).....	48
Cuadro 5. Tratamientos ensayados en la etapa de multiplicación de <i>M. balsamum</i> con diferentes combinaciones de BAP e IBA (μ M).....	49
Cuadro 6. Indicadores de la etapa de desinfección.....	50
Cuadro 7. Indicadores de la etapa de establecimiento.....	50
Cuadro 8. Indicadores de la etapa de multiplicación.....	51
Cuadro 9. Porcentajes de contaminación fúngica, bacteriana y explantes necrosados en la etapa de desinfección de <i>M. balsamum</i>	52
Cuadro 10. Promedio de explantes iniciados de <i>M. balsamum</i> a los 60 días de evaluados.....	56
Cuadro 11. Número promedio de nudos, hojas y longitud del brote en medios con BAP e IBA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de <i>Myroxylon balsamum</i>	22
Figura 2. Porcentaje de explantes contaminados por hongos, bacterias y necrosados.....	54
Figura 3. Explantes de <i>M. balsamum</i> en etapa de desinfección.....	54
Figura 4. Explantes de <i>M. balsamum</i> sin necrosis y libres de contaminación.....	55
Figura 5. Longitud de los explantes en la etapa de establecimiento a los 60 días de evaluados.....	56
Figura 6. Número de nudos y hojas promedio en explantes de <i>M. balsamum</i> en la etapa de establecimiento.....	57
Figura 7. Explantes de <i>M. balsamum</i> en la etapa de establecimiento.....	58
Figura 8. Efecto de los reguladores BAP e IBA en el crecimiento de los explantes de <i>M balsamum</i>	60
Figura 9. Efecto de los reguladores BAP e IBA en el número de nudos y hojas en explantes de <i>M balsamum</i>	60
Figura 10. Efecto de diferentes combinaciones de BAP e IBA en explantes de <i>M. balsamum</i> en la etapa de multiplicación.....	61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Componentes básicos del medio Murashige y Skoog (1962) para preparar un litro (1L).....	69
Anexo 2. Análisis de varianza, variable longitud del brote (etapa de establecimiento).....	70
Anexo 3. Análisis de varianza, variable número de nudos (etapa de establecimiento).....	70
Anexo 4. Tabla de medias, variable número de nudos (etapa de establecimiento).....	70
Anexo 5. Análisis de varianza, variable número de hojas (etapa de establecimiento).....	71
Anexo 6. Análisis de varianza, variable longitud del brote (etapa de multiplicación).....	72
Anexo 7. Tabla de medias, variable longitud del brote (etapa de multiplicación).....	72
Anexo 8. Análisis de varianza, variable número de nudos (etapa de multiplicación).....	73
Anexo 9. Tabla de medias, variable número de nudos (etapa de multiplicación).....	73
Anexo 10. Análisis de varianza, variable número de hojas (etapa de multiplicación).....	74
Anexo 11. Tabla de medias, variable número de hojas (etapa de multiplicación).....	74

RESUMEN

El Bálsamo de Tolú es un recurso natural renovable que hace parte de nuestra flora sucreña y que se caracteriza por su gran valor y versatilidad para actividades como la ebanistería, la industria, como fuente potencial de productos químicos de origen vegetal, como planta ornamental y como barrera viva en cultivos agrícolas y sombra en la ganadería. Todo esto representa una importante solución a nivel socioeconómico para muchas personas que dependen de la comercialización de este recurso y que por lo general son de escasos recursos económicos; además, contribuye favorablemente en la problemática social del campo. Desafortunadamente, a raíz de su gran demanda, esta riqueza natural se encuentra en peligro de extinción; por lo cual, se hace necesario incursionar en el uso de métodos biotecnológicos de multiplicación rápida de plantas, como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con el fin de mejorar de la manera más rápida y eficaz la presión de deforestación que tienen muchas poblaciones naturales de nuestra región, pudiendo de esta manera evitar su extinción. Para este propósito se tomaron explantes de campo de árboles silvestres y se llevó a cabo el proceso de desinfección, utilizando un fungicida (Benoagro) durante 2 horas, detergente comercial, Tween 20 y etanol 70%. Se evaluaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl), siendo el más adecuado aquél en el cual el hipoclorito tenía una concentración de 3% durante 20 minutos. En la etapa de establecimiento se evaluaron diferentes concentraciones de BAP (bencilaminopurina), obteniéndose los mejores resultados en el tratamiento de 12 μM . Para la etapa de multiplicación se evaluaron varios tratamientos con diferentes combinaciones de BAP e IBA (ácido indolbutírico), permitiendo un mayor crecimiento y alto número de plántulas, el tratamiento de BAP 18 μM e IBA en un rango de 1.2 a 2.4 μM . Los anteriores resultados confirman la posibilidad y el potencial de la multiplicación *in vitro* del Bálsamo de Tolú en el departamento de Sucre.

ABSTRACT

The "Balm of Tolú" (*Myroxylum balsamum*) is a renewable natural resource that is part of our native plants and which is characterized by its great value and versatility for uses such as: woodwork, industry, a potential source of chemicals of plant origin, an ornamental plant, and as living barrier in agricultural crops and shade for livestock. All this represents a significant socioeconomic solution for many people who depend on the marketing of this resource. Unfortunately, because of its high demand, this natural wealth is in danger of extinction, and it is necessary to see the possibility to apply biotechnological methods to rescue it. The massive plant multiplication methods, such as *in vitro*, plant tissue culture could be the fastest and convenient to avoid complete deforestation and prevent their extinction. In order to evaluate these methods explants were taken from wild trees and disinfected in the lab, using a fungicide solution for 2 hours, a commercial detergent, Tween 20 and ethanol (70%). Different concentrations of sodium hypochlorite (NaOCl) were evaluated, getting the best results with a concentration of 3% during 20 minutes. Explants were inoculated in media with different concentrations of BAP (bencylaminopurine), obtaining the best results with a concentration of 12 μM . Later on, a multiplication media was evaluated with different combinations of BAP and IBA (indolebutyric acid). These gave us the best results with BAP 18 μM and IBA in a range from 1.2 to 2.4 μM . These results confirm the possibility to rescue this plant and the great potential of the *in vitro* propagation methods to avoid from extinction the Balm of Tolú in the Department of Sucre-Colombia.

INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las especies leñosas, las más estudiadas en los últimos años han sido los forestales, y dentro de ellos encontramos el Bálsamo de Tolú (*Myroxylon balsamum*), un árbol originario de los bosques de Venezuela, Perú, Nicaragua, El Salvador, Guatemala y Colombia; se encuentra desde las zonas subtropicales, secas a húmedas, hasta las zonas tropicales secas. Esta especie maderable hace parte de nuestra flora sucreña y se caracteriza por su gran valor en la ebanistería, en la industria, como fuente potencial de productos químicos de origen vegetal útiles para el hombre, como planta ornamental y como barreras vivas en cultivos agrícolas y sombra en la ganadería.

Desafortunadamente esta riqueza natural se encuentra en vía de extinción dentro de la jurisdicción de Carsucre y posiblemente dentro de nuestro departamento, debido a su excesiva explotación a causa del alto valor comercial de su madera en los mercados nacionales e internacionales y a los pocos sistemas de control de estas especies. Sumado a esto, la agricultura migratoria de subsistencia provocada por la pobreza rural y la escasez de tierra, junto con la baja tasa de crecimiento que presenta la especie, la carencia de programas de reforestación y técnicas en pro o en vía para elevar la producción de dicho cultivo, lo que agudiza aún más el problema, teniendo en cuenta que de la comercialización de su madera dependen muchas personas, por lo general de escasos recursos económicos, que seguirán con la explotación de este recurso para mantener el sustento diario (Min.ambiente, 2001). El bálsamo de Tolú está desapareciendo a un ritmo alarmante, mientras el hombre presencia la disminución de un recurso natural que se ha descrito como «central de energía de la evolución» y como fuente principal de la «medicina natural» (Zamora, 2000).

Por lo anterior es evidente la necesidad de recuperar y ampliar las áreas cubiertas con esta especie en la región, sin embargo, la dificultad en la obtención de plántulas, debido a la baja tasa de crecimiento, dificulta el

establecimiento de plantaciones comerciales y el desarrollo de programas de reforestación, constituyéndose en el principal motivo para incursionar en el uso de métodos biotecnológicos de multiplicación rápida de plantas como un apoyo a los programas de reforestación para aliviar la presión de deforestación que tienen las poblaciones naturales, pudiendo de esta manera evitar su extinción.

En este contexto, la micropropagación *in vitro* de cultivos de tejidos vegetales resulta una estrategia interesante, puesto que permite obtener, mantener y multiplicar masivamente las especies bajo condiciones controladas de laboratorio, posibilitando mejor su supervivencia, contribuye al establecimiento de bosques artificiales y repoblación natural de estas especies con los clones mas deseables (Roca y Mroginski,1991). Por otro lado el hecho de no existir reportes sobre estudios afines con micropropagación para esta especie maderable le da un carácter novedoso y útil para nuestra región.

Con este estudio se pretende determinar las condiciones óptimas para la reproducción vegetativa del Bálsamo de Tolú en condiciones *in vitro* como una metodología para la propagación masiva de este tipo de plantas.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo para la micropropagación “*in vitro*” del Bálsamo de Tolú (*Myroxylon balsamum*) a partir de explantes provenientes de árboles silvestres.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Establecer el proceso de desinfección de los explantes de Bálsamo de Tolú (procedentes de campo) mediante la estandarización de la concentración óptima de Hipoclorito de Sodio (NaOCl).
- * Determinar las concentraciones óptimas de los reguladores de crecimiento: auxinas (IBA) y citoquininas (BAP), que suplementarán el medio de cultivo en las etapas de establecimiento y multiplicación.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 SITUACIÓN FORESTAL EN COLOMBIA

Los bosques tienen características únicas que no se encuentran en otros tipos de comunidades vegetales. Además de proteger los suelos con alta eficacia, los árboles permiten el desarrollo de una fauna diversificada y proporcionan una serie de bienes y servicios que van desde la madera para ebanistería hasta sombra para el ganado. Un aprovechamiento racional de estas características proporciona automáticamente beneficios al hombre y a la sociedad, en términos de conservación de los recursos naturales renovables, calidad de vida y nivel económico (Min.ambiente, 2001).

Colombia es uno de los países que cuenta con una de las mayores reservas forestales, una rica biodiversidad y un potencial hídrico de una gran magnitud. Desafortunadamente, el proceso de ocupación del territorio y unos sistemas productivos depredadores, ha determinado que esta convicción de nuestra infancia vaya siendo cada vez menos cierta, a tal punto que estamos empezando a vivir una situación de pobreza ambiental, especialmente en materia forestal, pues en el transcurso de las últimas décadas se ha reducido este patrimonio en una forma alarmante (Min. Ambiente, 2001).

El 69% de la superficie continental es de aptitud forestal, pero solo el 46% de dicha área está cubierta por bosques. Un buen porcentaje de las tierras incorporadas a actividades agropecuarias son de aptitud forestal, y su inadecuado manejo ha llevado a la pérdida de los nutrientes del suelo, la erosión y la alteración de las cuencas. Aunque no existe información precisa sobre la magnitud de deforestación en el país, se estima que Colombia tiene una de las cinco mayores tasas de deforestación de bosque húmedo tropical en el mundo. Las causas a las cuales se atribuye la deforestación en el país son, en orden de incidencia: la expansión de la frontera agropecuaria, la colonización, la construcción de obras de infraestructura, los cultivos ilícitos, el consumo de leña, estragos causados por enfermedades, parásitos, incendios

forestales y a la presencia de extractores forestales nómadas, que aprovechan el bosque sin planes de manejo y que se desplazan permanentemente en busca de maderas valiosas con el objetivo de emplearlas para la industria y el comercio (Min.ambiente, 2001).

Desafortunadamente, los programas de mejoramiento genético en especies forestales no han tenido repercusiones trascendentales en esta problemática, debido principalmente al largo ciclo de estas especies desde la siembra de la semilla hasta la floración. Sin embargo, las técnicas de micropropagación prometen ser una importante alternativa para la solución de los problemas básicos y aplicados de la biotecnología de estas plantas (Roca y Mroginski, 1991).

2.2 CARACTERISTICAS Y ASPECTOS GENERALES DEL BÁLSAMO DE TOLÚ (*Myroxylon balsamum*)

2.2.1 BÁLSAMO DE TOLÚ: *Myroxylon balsamum*

El bálsamo de Tolú es un árbol originario de América tropical. Se encuentra desde México, Costa Rica, Panamá, Brasil, Paraguay, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia hasta Argentina. En Colombia se halla en los departamentos de Antioquia, Sucre, Magdalena, Meta, Valle y Chocó. Pertenece al reino plantae, filo magnoliophyta, clase magnoliopsida (DIC), orden fabales, familia fabaceae, sub-familia papilionoideae (Holdridge y Poveda, 1975).

En Colombia se conoce con los nombres de: Kokojuanicke, Bálsamo toluitano, Tacho, Olor. Crece en bosque seco tropical y bosques tropicales húmedos a muy húmedos, asociado con las especies Jugua (*Genipa americana*), Dinde (*Chlorophora tinctoria*), Pantano (*Hyeronima chocoensis*) y Tamarindo (*Uribea tamarindoides*) (Holdridge y Poveda, 1975).

2.2.2 Descripción Botánica

Árbol perennifolio, de 45 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1 m; posee una copa redondeada a veces abierta y de follaje denso, ramas ascendentes, glabras; las jóvenes de color pardo verdoso, con abundante indumento ferruginoso. La corteza externa es lisa a levemente áspera, de color pardo grisácea, con abundantes lenticelas protuberantes; la corteza interna es de color crema amarillento, granulosa, con un olor fragante peculiar, grosor total: 10 mm. Las hojas están dispuestas en espiral, imparipinnadas, de 8 a 20 cm de largo incluyendo el peciolo con 5 a 10 pares de folíolos alternos, de ápice acuminado y base redondeada, con numerosos puntos y líneas traslúcidas, cuando se estrujan producen un olor fragante (Holdridge y Poveda, 1975). Flores blancas zigomórficas, inflorescencia en racimos axilares de 10 a 20 cm de largo, pubescentes, cáliz de 6 a 8 mm de largo, anchamente tubular o cupular; pétalos insertos cerca de la base del tubo del cáliz. Fruto indehiscente (sámara), contienen 1-2 semillas reniformes, de 1.5 a 1.8 cm de largo, amarillentas con olor muy fragante. Su tamaño va de 1 a 11 cm de largo por 2 cm de ancho en el ápice, adelgazándose hacia la base; estipitado, amarillento y glabro, ápice abultado y rugoso, ala de 8 cm de largo, no abren en la madurez (Holdridge y Poveda, 1975).

2.2.3 Ecología

Es un árbol emergente característico de bosque primario inalterado. Posee una regeneración a veces abundante en algunas áreas, principalmente al pie del árbol madre; sin embargo necesita luz o espacios abiertos dentro del bosque para poder sobrevivir, por lo que existen muy pocos individuos en edades intermedias (Holdridge y Poveda, 1975).

Las zonas caracterizadas por poseer cultivos de esta especie en Sucre son: San Pedro, Sincé, Corozal, Betulia, Galeras.

2.2.4 Semilla



Fig. 1. Semillas de *Myroxylon balsamum*.

Los frutos pueden recolectarse del suelo o del árbol cuando cambian de color verde amarillento a amarillo claro. En algunas zonas de Costa Rica se observan frutos secos en el suelo en los meses de noviembre a enero. En el bosque se ha observado germinación abundante bajo la copa de los árboles, de hasta 80%. En vivero se han reportado porcentajes de germinación de 60-75%. La semilla almacenada a temperatura ambiente mantiene la viabilidad por 6-12 meses, mientras que en cámaras a 5°C y contenido de humedad de 6-8% pueden ser conservados hasta por 3 años. Un kilogramo contiene aproximadamente 1600 frutos (Holdridge y Poveda, 1975).

2.2.4.1 Propagación forestal

La extracción de la semilla no es práctica, de manera que los frutos pueden sembrarse en camas de arena para trasplante al término de 2-3 semanas, o directamente en los contenedores, ya sea bolsas o tubetes plásticos. La germinación normalmente es alta y rápida bajo temperatura de 25-35°C. En ocasiones se ha utilizado un pretratamiento de inmersión en agua durante 24 horas, o combinado con un corte longitudinal en el fruto. También se ha reportado satisfactorio al sumergir por cinco minutos en agua a 5°C. La

emergencia de las plántulas ocurre a los 15-30 días y pueden ser llevados al campo al término de 4-6 meses (Holdridge y Poveda, 1975).

2.2.4.2 Plantación

La especie se ha plantado mayormente como ornamental, o a espaciamientos amplios en sistemas agroforestales o como sombra para el café. En Brasil se ha probado en plantaciones más densas a 2 x 2, 1.5 x 3 o 3 x 3 m, sobre suelos fértiles. La germinación en el bosque es abundante, pero los hongos, insectos y otros patógenos causan la muerte de muchas de las plántulas. Las pocas que sobreviven sufren por falta de luz, por lo cual se ven pocos individuos de edades intermedias bajo el dosel (Zamora, 2000).

2.2.4.3 Manejo

Para el establecimiento por regeneración natural del bálsamo de Tolú es imprescindible abrir el dosel para permitir la entrada de luz y favorecer el establecimiento y crecimiento de las plantas (Zamora, 2000).

2.2.4.4 Turno y crecimiento

El árbol normalmente ha mostrado crecimiento lento en plantaciones. En Minas Gerais, Brasil, establecido a 1.5 x 3 m, los árboles alcanzaron alturas de 0.4-0.7 m a los 27 meses de edad. En esta misma localidad establecido a 3 x 3 m sobre suelos más fértiles alcanzó alturas de 2.3 m y dap (diámetro a la altura del pecho) de 1.4 cm a los 3 años de edad. En Sao Paulo, plantados a 2.2 m presentó alturas de 7.5 m y dap de 6.2 cm a los 14 años. Utilizado como sombra en cafetales ha alcanzado alturas de 10 m en 10-12 años y de 20 m en 25 años (Mayorga y Jiménez, 2000).

Árboles en el bosque utilizados para producción de bálsamo han logrado producir 1.5-2.5 Kg de bálsamo por año durante al menos 30 años (Holdridge y Poveda, 1975).

Cuadro 1: Condiciones necesarias para el desarrollo del Bálsamo de Tolú.

Clima y suelo en condiciones naturales				¿Dónde crece mejor?
Pluviometría	1300-4000 mm	Suelos	Calcáreos o derivados de materiales ígneos	En zonas muy húmedas con precipitaciones de 1300-4000 mm anuales, altitudes hasta los 700 msnm y temperaturas de 23 a 27 °C, sobre suelos calcáreos o derivados de materiales ígneos, en lomas o zonas planas bien drenadas.
Estación seca	0-6 meses	Textura	Ligera a pesada	
Altitud	100-700 msnm	pH	Alcalino	
Temperatura media anual	23-30 °C	Drenaje	Libre	
		Pendiente	Plana a moderada	

Fuente: Holdridge y Poveda, 1975.

2.2.5 Fenología

La floración se inicia a los cinco años de edad de los árboles, y la época varía con el sitio: marzo a mayo en Colombia, febrero a mayo en Costa Rica, o a junio en Panamá. La fructificación ocurre prácticamente todo el año dependiente de la zona, octubre a febrero en El Salvador, marzo a mayo en Colombia y Costa Rica, septiembre a marzo en Panamá (Mayorga y Jiménez, 2000).

Cuadro 2. Calendario de la especie *M.balsamum*

E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Hojas	Hojas	Hojas	Hojas								
		Flores	Flores	Flores	Flores						
					Frutos	Frutos	Frutos	Frutos			
								Siembra	Siembra	Siembra	Siembra

2.2.6. Estudios Químicos y Obtención del Bálsamo de Tolú

2.2.6.1 Historia

El Bálsamo de Tolú fue descrito por Monardes en 1574 y su recolección fue observada por Weir en 1863.

2.2.6.2 Recolección

La droga se recolecta haciendo incisiones en forma de V en la corteza y recogiendo la secreción en una situada en el ángulo de la V. Sobre cada árbol se fijan numerosos recipientes de dicho tipo, siendo el rendimiento por árbol de 8 a 10 kg. El bálsamo recogido se trasvasa periódicamente a recipientes mayores. Se exporta en latas por Cartagena, Sabanilla y Santa Marta.

2.2.6.3 Caracteres

El Bálsamo de Tolú recién importado es semisólido blando de color amarillo. Con la conservación se torna sólido, quebradizo y adquiere color pardo. Se ablanda por calentamiento y, si entonces, se aplasta un poco entre dos portaobjetos, se perciben al microscopio cristales de ácido cinámico, resina amorfa y restos vegetales. Olor aromático y fragante; sabor aromático, formando la droga una masa plástica cuando se mastica.

Es casi completamente soluble en alcohol; la solución, ácida al tomasol, da un color verde con cloruro férrico (debido posiblemente a la presencia de resinotanol). A semejanza de otras drogas que contienen ácido cinámico, produce olor a benzaldehído cuando un cocimiento filtrado se oxida con solución de permanganato potásico.

2.2.6.4 Componentes

El bálsamo de Tolú contiene un 80% de resina compuesta por alcoholes resínicos combinados con los ácidos cinámico y benzoico. La droga es rica en ácidos aromáticos libres y contiene del 12-15% de ácido cinámico y un 8% de ácido benzoico libre (índice de ácido, 100-160). Otros componentes son ésteres como el benzoato y el cinamato de bencilo y una pequeña cantidad de vainillina. Recientes investigaciones han demostrado la presencia de otros ésteres y de estireno, eugenol, vainillina, ácido ferúlico, 1,2-difeniletano, hidrocarburos y alcoholes mono- y sesquiterpénicos. También contiene el bálsamo de Tolú numerosos triterpenoides y 35-50% de ácidos balsámicos totales, calculados como materia seca soluble en alcohol. Hoy día la resina del bálsamo se usa como expectorante, en perfumería y para la fabricación de incienso y medicamentos.

La producción mundial (2000) de Bálsamo de Tolú es de unas 65 toneladas de las cuales El Salvador exporta 48 toneladas, o sea el 74%. En Colombia se producen grandes cantidades de Bálsamo en las proximidades de los ríos Magdalena y Cauca. El precio del Bálsamo de Tolú es de 2.60 a 4.80 dólares por kilo, y aproximadamente la mitad de la producción mundial se exporta a los Estados Unidos (Zamora, 2000).

2.2.7 Usos y Manejos en Finca

2.2.7.1 Maderable

El bálsamo de Tolú recibe considerable atención debido al alto valor de su madera y a su apariencia atractiva. Esto se caracteriza por ser resistente, dura, pesada a muy pesada (0.82-0.96). Con fuerte y agradable aroma. No hay distinción entre albura y duramen, siendo de color rojo rojizo oscuro, a veces con un tinte púrpura de apariencia agradable. La textura es fina por lo que recibe buen pulido. Tiene un parecido superficial con la caoba, pero es más rosado. El grano es entrelazado. Es una madera difícil de trabajar pero se consiguen buenos acabados. No contiene sílice y tiene una alta durabilidad natural respecto a insectos y hongos. En El Salvador se ha empleado la madera para cabos de herramientas y cachas de herramientas y utensilios de corte. También para durmientes, ejes de carreta e instrumentos de labranza, muebles ligeros (mesillas de noche, repisas, jugueteras, esquineras y estantes) y construcciones rurales. En Costa Rica, la madera de esta especie se ha usado tradicionalmente en ebanistería fina, muebles, pisos, tablilla y torneado. Actualmente existe una tendencia de cambio hacia otros usos como las chapas decorativas, parquet, souvenirs y en la fabricación de artesanías. El Bálsamo de Tolú produce leña de excelente calidad, aunque por la calidad de su madera, aún piezas pequeñas son aprovechables para otros usos.

En Costa Rica los precios de la madera del Bálsamo de Tolú se han incrementado como sigue: en 1985 -87¢ 3234/m³, 1988 ¢ 6930/m³, en 1989 ¢ 7854.00/m³ y en 1990 el precio llegó a ¢ 97902/m³. Actualmente se considera en peligro de extinción y su aprovechamiento ha sido vedado por el gobierno de Costa Rica (Zamora, 2000).

2.2.7.2 Medicinal

El bálsamo es una droga oficial de la farmacopea estadounidense y se le atribuyen las siguientes propiedades y acciones: antiséptica, antibacterial, antifúngica, anti-inflamatoria, antitusiva, cicatrizante, expectorante, respiratoria; antidisentérica, parasiticida (antihelmíntica), estomáquica, tónica,

antigonorréica, y antisifilítica. La resina se utiliza para la tos, asma, como inhalante para catarros y bronquitis, laringitis, tuberculosis, abscesos, heridas externas, torceduras, piojos, ácaros y en tratamientos de dismenorrea, diarrea, disentería, leucorrea, enfermedades venéreas y reumatismo. Se ha visto que el bálsamo promueve el crecimiento epitelial celular y se ha empleado para cicatrizar úlceras superficiales. Los frutos secos se utilizan para el tratamiento de la sarna, al igual, que contra dolores de cabeza y reumáticos (Zamora, 2000).

2.2.7.3 Industrial (Cosmético/ Higiene, Saborizante)

La resina del bálsamo se usa en la elaboración de lociones, perfumes, cremas y cosméticos. Componente de ungüentos, jabones de tocador que se creen poseen propiedades curativas, detergentes, desodorantes, tónicos para el cabello, atomizadores para la higiene femenina, preparaciones anti-caspa. Fue descubierto en El Salvador. Los indios del Chocó usan la corteza en polvo como desodorante personal (Zamora, 2000).

La resina también se utiliza como saborizante de chicle, alimentos, bebidas no alcohólicas y helados. La semilla puede servir para dar sabor a bebidas alcohólicas como el aguardiente (Zamora, 2000).

2.2.7.4 Sistemas de Finca

Puede usarse como ornamental por su copa frondosa y amplia. En México y El Salvador se emplea como sombra en las plantaciones de café y otros cultivos. Se ha utilizado para restauración de bosques de protección, ya sea mediante plantación o manejo de regeneración. También se recomienda para recuperación de suelos degradados, entre otras cualidades, por su capacidad de fijación de nitrógeno (Zamora, 2000).

2.3 GENERALIDADES SOBRE EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos es una técnica que consiste en aislar de la planta células, tejidos y órganos para cultivarlos en un medio artificial y aséptico. Este método se puede utilizar para estudios básicos de fisiología genética, al igual, que para enfocar soluciones a problemas prácticos en agricultura que de otra forma no sería posible (Roca W, 1989).

Los antecedentes del cultivo de tejidos se remontan a los años 1860 y 1861 donde Sacks y Knops descubrieron que las sustancias inorgánicas son los principales nutrientes de las plantas superiores. El resultado de estas investigaciones fue la elaboración de una sustancia nutritiva denominada solución Snops, empleada como componente básico de los medio de cultivo (Villalobos, 1993).

En 1902 Morgan propuso la teoría de la totipotencia donde las células vegetales pueden formar plantas completas; la cual fue comprobada por Krikorian en 1969 (Krikorian y Berguam, 1969).

En 1934 White pudo cultivar raíces de tomates "*in vitro*" suministrándole extracto de levadura y tiamina. Nobercourt y Gautheret en Francia y White en Estados Unidos reportaron en forma independiente el cultivo indefinido de tejido de callo vegetal en un medio sintético. El descubrimiento de citoquininas y el control hormonal de la regeneración de tallos y raíces logrados de callos de tabaco por Skoog y sus colaboradores en 1948, estableció las bases para la manipulación de órganos y proporcionó la información fundamental en que se basa el proceso de micropropagación (Hartman y Kester, 1989).

2.3.1 Micropropagación

El cultivo de tejidos y células de plantas *in vitro* es definido como la capacidad para regenerar y propagar plantas a partir de células simples, tejidos y órganos bajo condiciones estériles y condiciones ambientales controladas (Bridg, 2000). El cultivo *in vitro* es a menudo usado como un sistema modelo en el estudio de varios problemas fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales

relacionados a las plantas. Existen varias formas para promover la regeneración *in vitro* de un material de plantas seleccionado, entre las cuales tenemos:

- Cultivo de plantas a partir de plantas de semillero o plantas adultas.
- Cultivo de embriones a partir de embriones aislados maduros o inmaduros.
- Cultivo de órganos a partir de órganos aislados de la planta.
- Cultivo de tejidos o cultivo de callos a partir de tejidos originarios de explantes de órganos de la planta.
- Cultivo de células en suspensión a partir de cultivo de células aisladas o agregados muy pequeños dispersos en medio líquido.
- Cultivo de protoplastos.
- Cultivo de anteras (Perea y Navarro, 1988).

Algunos usos de la técnica de cultivo *in vitro* son:

Mejoramiento genético, obtención de plantas libres de virus u otros patógenos, conservación de germoplasma y micropropagación.

La micropropagación es una técnica que busca reproducir los factores que se dan en el campo a través de la clonación, la cual permite que las plantas manejen su misma información genética y se conserve su material vegetal.

En la actualidad se aplica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y mas recientemente en especies leñosas y frutales (Perea y Navarro, 1988).

2.3.2 Ventajas de la micropropagación

- Propagación de un gran número de especies difíciles de multiplicar.
- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, y reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente grandes cantidades de plantas y de una variedad de la que existan pocos individuos en un espacio pequeño, a bajo costo y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control de contaminación sobre el material que se propaga.
- Facilidad para transportar material *in vitro* de un país a otro, con menos restricción aduanera.
- La reproducción vegetativa del material vegetal por vía *in vitro* puede frecuentemente ser almacenado por largos períodos de tiempo (George, 1993).
- Puede ser posible la producción de clones de algunas clases de plantas que son de otra manera pocas y difíciles para propagar vegetativamente o aún imposible (George, 1993).

2.3.3 Desventajas de la micropropagación

- Las instalaciones necesarias son muy costosas.
- En muchas especies de plantas las consideraciones económicas son tales que no justifican su empleo comercial.
- Para efectuar las operaciones se necesita adiestramiento específico (Hartmann & Kester, 1989).

2.3.4 Etapas de la micropropagación

Según Prehn *et. al*, (1999) se han desarrollado protocolos específicos de micropropagación en muchas especies vegetales, las cuales poseen etapas claramente diferenciadas que son comunes entre estos. Por esta razón, en forma general, se ha dividido el proceso en cinco etapas, las cuales son:

FASE 0: Se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *in vitro* comience. Esto implica el pretratamiento correcto del material inicial, manteniéndolo en la medida de lo posible, libre de enfermedades.

FASE 1: Involucra el diseño del medio de cultivo para estimular la formación de yemas o la iniciación de los brotes y su desarrollo, o para estimular la ruptura precoz de las yemas axilares y su desarrollo. En esta etapa se utilizan reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas. Ambos reguladores son necesarios para la formación de brotes y raíces en los explantes utilizados, dependiendo de la relación entre estas en el medio de cultivo. Ocasionalmente, bajos niveles de ácido giberélico pueden ser usados, lo cual permite una extensión de la fase de crecimiento.

FASE 2: Involucra el incremento del nivel de producción de yemas o brotes laterales. Esto último se produce generalmente por un aumento en el nivel de citoquininas. Sin embargo, muchas veces es preferible optar por realizar una multiplicación lenta y usar bajos niveles de citoquininas. Además, el uso de altas concentraciones de citoquininas favorece el proceso de vitrificación del explante, donde este toma un aspecto vidrioso e hiperhidratado con baja sobrevivencia *ex vitro*.

FASE 3 : Involucra el uso de auxinas para estimular la formación de raíces y la formación de una planta completa.

FASE 4: Se denomina también “aclimatación”, y consiste en el establecimiento de la plántula *ex vitro* en condiciones de invernadero.

2.4 APLICACIÓN

La micropropagación ha sido útil para la rápida liberación inicial de nuevas variedades previa a la multiplicación por métodos convencionales. También es usada para promover el almacenamiento de germoplasma para el mantenimiento de plantas libres de enfermedades bajo condiciones ambientales semicontroladas y a largo plazo a través de la crioconservación (Bridg, 2000).

Mundialmente existe mucho interés para promover el desarrollo de una tecnología *in vitro* que permita la micropropagación y producción de plantas leñosas, semileñosas, ornamentales, comestibles, industriales y medicinales de alto valor comercial. Aquellas especies que están en peligro de extinción, pueden tener prioridad en término de conservación de germoplasma (Bridg, 2000).

2.5 FACTORES DETERMINANTES PARA LA MICROPROPAGACIÓN

Existen diferentes factores que determinan el éxito de los sistemas de micropropagación entre los cuales tenemos:

2.5.1 Plantas madres

Son las plantas de las que se extraen los segmentos necesarios para el cultivo *in vitro*. El estado fisiológico de estas plantas influye significativamente, en el establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.2 El explante

Deben seleccionarse explantes saludables, de tejido meristemático u órganos no muy especializados, no se deben utilizar explantes ni muy viejos ni muy jóvenes (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.3 Factores físicos

Existen dos factores fundamentales como la temperatura y la luz. La temperatura de incubación depende de la especie, aunque en la mayoría de las plantas la temperatura oscila entre $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La luz es importante en la morfogénesis y su papel en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.4 Medio de cultivo

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo *in vitro* de células, tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, embrioides, la organogénesis, la micropropagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Así, los medios de cultivo pueden ser líquidos o tener un soporte sólido, tienen sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, fitohormonas, azúcares, etc. También pueden contener por ejemplo extractos naturales, según su finalidad y debe quedar claro que no todos llevan un complemento completo de todos los factores (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.4.1 Soporte

Los medios de cultivo pueden ser sólidos y líquidos. En este último caso también puede utilizarse como soporte papel de filtro o perlas de cristal.

Los medios sólidos o semisólidos según la concentración del soporte, llevaron distintos componentes que tienden a solidificar y mantener el material cultivado en la superficie. Entre las sustancias más utilizadas se encuentra el agar, este solidifica el medio y forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica (Perea y Navarro ,1988).

El agar presenta algunos inconvenientes; el principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos.

Por otra parte, la composición del agar es variable y, a veces, mal definida y podría aportar oligoelementos que actúan favorablemente sobre el crecimiento (Perea y Navarro, 1988).

La concentración óptima de agar es variable con el origen comercial del agar utilizado y el objetivo del cultivo. En algunos medios de cultivo se añade al soporte una cantidad de carbón activado en dosis variables entre 0.5 – 5.0 g/l. Normalmente el aporte del carbón al medio favorece el crecimiento de los tejidos, sobre todo, en el cultivo de ápices y anteras (Perea y Navarro, 1988).

2.5.4.2 Componentes minerales

Los componentes esenciales para la vida de las plantas se dividen en:

- **Macroelementos:** se utilizan en grandes cantidades: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio.
- **Oligoelementos o microelementos:** aunque son necesarios en menor cantidad, juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales microelementos son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cobalto y boro.

Las exigencias minerales varían con la especie, la naturaleza del tejido y su estado fisiológico, pero, además, también varían con el método de cultivo y el tipo de organogénesis estudiado. Por ejemplo, los meristemas y, en forma general, los tejidos con actividad metabólica elevada, pueden presentar importantes necesidades en potasio (Roca y Mroginski, 1991).

El medio MS se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo *in vitro*. Además, puede afirmarse que ha sido la utilización del medio MS junto con el empleo de fitohormonas apropiadas (citoquininas y auxinas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre organogénesis en cultivo *in vitro*. El medio MS está caracterizado, principalmente, por un contenido muy fuerte de nitrógeno (60 mg/l aprox) del cual 1/3 está aportado en forma reducida

(NH₄⁺) y por una concentración igualmente elevada en potasio (Roca y Mroginski, 1991).

Los microelementos resultan indispensables para el crecimiento, intervienen como activadores de sistemas enzimáticos. Se suministran al medio de cultivo bien con el objetivo de evitar cualquier carencia o se suministran a concentraciones más elevadas con el objetivo de provocar una activación del crecimiento. El medio MS emplea (Mn, Zn y B) en concentraciones elevadas sin toxicidad aparente, otros resultan tóxicos a bajas concentraciones (Cu, Ni) (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.4.3 Componentes orgánicos

Dentro de los componentes orgánicos de los medios de cultivo tenemos azúcares, vitaminas, aminoácidos, productos orgánicos, estimulantes y reguladores del crecimiento.

2.5.4.3.1 Azúcares

Los tejidos y células cultivadas "*in vitro*" son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego, resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo, siendo los dos más utilizados la sacarosa y la glucosa (Roca y Mroginski, 1991).

La concentración óptima del azúcar en los medios de cultivo varía entre 20 – 80 g/l, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.4.3.2. Vitaminas

Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos "*in vitro*" y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis (Perea y Navarro, 1988).

La Tiamina (0.1 – 1.0 mg/l) tiene un efecto claro en los medios de cultivo. También se han señalado efectos favorables para el ácido nicotínico, la

piridoxina y la riboflavina sobre el crecimiento de los cultivos (Perea y Navarro, 1988).

El compuesto que más frecuentemente se añade a los medios de cultivo es meso-inositol (Myo-inositol), se emplea en concentraciones entre 50 – 500 mg/l y su efecto es evidencia sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis (Perea y Navarro, 1988).

El ácido ascórbico (1 – 10 mg/l) y el ácido cítrico (50 – 100 mg/l) se utilizan en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos (Perea y Navarro, 1988).

2.5.4.3.3 Aminoácidos

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa *in vitro*. Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general (Perea y Navarro, 1988).

2.5.4.3.4 Productos orgánicos estimulantes

En los medios de cultivo con frecuencia se han utilizado numerosos productos o extractos naturales de composición variable y no bien definida, con distintos resultados. Entre estos productos pueden citarse:

- Extracto de levadura (0.5 – 1.0 g/L)
- Hidrolizado de caseína (0.5 – 3.0 g/L)
- Peptona
- Agua de coco (5 – 15%)
- Albumen inmaduro de maíz

- Jugo de plátano, tomate y de naranja
- Extractos de diversos hongos
- Savia de la vid o de abedul, etc. (Perea y Navarro, 1988).

2.5.4.4 Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de las plantas actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales (reguladores endógenos) existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro* (Perea y Navarro, 1988).

En los métodos de propagación *in vitro* se emplean ampliamente las auxinas, en la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta de auxinas y citoquininas. La importancia de las giberelinas en cultivo *in vitro* está mucho más restringida. El ABA (ácido abscísico) y los compuestos que desprenden etileno se utilizan con menor frecuencia en casos más específicos (Perea y Navarro, 1988).

2.5.4.4.1 Auxinas

Son compuestos que tienen un núcleo indólico, este se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. La principal auxina es el ácido 3- indolacético (AIA) y el ácido 3- indolbutírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles. Otros compuestos sintéticos pueden comportarse como auxinas muy débiles (ácido fenilacético) o fuertes: ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3- naftoxiacético (NOA), etc. El 2.4 D (ácido 2.4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte (Perea y Navarro, 1988).

El efecto de las auxinas está estrechamente ligado al alargamiento celular, que se explica por sus efectos sobre la celulosa-sintetasa, el aumento de la plasticidad parietal y el aumento de la absorción de agua. Las auxinas también tienen un efecto marcado sobre la división celular (citocinesis) (Brumel y May, 1987).

Otros efectos auxínicos son: inducen la rizogénesis, pero a su vez indirectamente inhiben el crecimiento de las raíces; intervienen en la dominancia apical de las yemas, en el desarrollo del fruto (transformación de las paredes del ovario para formar las paredes del fruto) (Brumel y May, 1987).

2.5.4.4.2 Giberelinas

Las giberelinas provocan el alargamiento celular; eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la inducción de la producción de la α -amilasa; inducen la floración de plantas de días largos; eliminan la dormancia de las yemas y semillas; intervienen en la tuberización (Perea y Navarro, 1988).

2.5.4.4.3 Citoquininas

Las citoquininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina. En cultivos de tejidos, el BAP y las citoquininas sintéticas kinetinas y TDZ (thidiazuron) son las más frecuentemente usadas (Roca y Mroginski, 1991).

Las citoquininas estimulan la división celular (cariocinesis) en cultivo de tejidos vegetales y tienen un efecto sinérgico en este sentido con las auxinas. Se han reportado otros efectos de las citoquininas, por ejemplo: estimulan el alargamiento celular de discos de hojas etioladas; inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos *in vitro* (morfogénesis); controlan la formación de proplastidios en cloroplastos; mantienen la maquinaria de síntesis de proteínas mediante la regulación de la síntesis del RNA; retrasan la senescencia, entre otros (González, 2002).

2.5.4.4.4 Ácido abscísico (ABA)

El ABA es un inhibidor de crecimiento y desarrollo; en el cultivo *in vitro* especialmente en las plantas leñosas, inhibe la producción de fenoles evitando oxidación (Perea y Navarro, 1988).

El ácido abscísico se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis de ciertos cultivos (Rodríguez *et. al*, 1995).

También es esencial para el desarrollo de embriones somáticos y cigóticos, al manipular sus concentraciones se puede lograr su maduración y en algunas plantas es esencial para su desarrollo (Rodríguez *et. al*, 1995).

2.5.4.4.5 Etileno

Es un hidrocarburo gaseoso y se considera como un producto de degradación metabólica que acompaña la maduración de los frutos.

Los estudios realizados han detectado los siguientes efectos del etileno en las plantas:

1. Estimulación del crecimiento de las raíces.
2. Inhibición del transporte de auxinas en el interior de la planta.
3. Estimulación de la síntesis de algunas enzimas o la liberación de alfa –amilasa ya formada, por ejemplo, en granos de cereales durante la germinación.
4. Inducción de la maduración de los llamados frutos climatéricos. Maduración anticipada de algunos frutos (plátano, tomate, cítricos, etc.) mediante la aplicación de etilenos.
5. Eliminación de la dormición de las yemas y de algunos órganos vegetativos, tales como bulbos y tubérculos (Rodríguez *et. al*,1995).

2.6 MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES

PROPAGACIÓN VEGETATIVA *IN VITRO*

Generalidades

La multiplicación asexual de coníferas y árboles usando cultivo de tejidos puede ser logrado por tres metodologías:

1. Alargamiento de los brotes axilares
2. Producción de brotes adventicios
3. Embriogénesis somática (Thorpe *et. al*, 1991).

Los primeros dos métodos permiten la formación vía organogénesis de brotes unipolares, que tendrán que ser enraizados en un proceso de múltiples pasos (Thorpe *et. al*, 1991). En el caso del alargamiento de las yemas axilares, éste método utiliza ápices principales, brotes laterales y segmentos nodales, e involucra la multiplicación de brotes preformados, generalmente sin la formación de algún callo, produciendo en general cultivos genéticamente estables. Este método genera el menor número de plantas, ya que el número de brotes producido es limitado por el número de brotes axilares sembrados en el medio de cultivo (Thorpe *et. al*, 1991).

Con respecto a la producción de brotes adventicios, el proceso involucra la inducción de tejido meristemático localizado por tratamiento con reguladores de crecimiento, determinándose la diferenciación del primordio y el desarrollo de los brotes. Usualmente involucra la formación de un callo, respondiendo al efecto de las citoquininas en tejido meristemático como el cambium (Thorpe *et. al*, 1991). Es posible la producción de brotes adventicios en especie leñosa a partir de callos, pero es extremadamente difícil en las coníferas (Thorpe *et. al*, 1991).

La ruta mayormente utilizada para la regeneración *in vitro* de especies arbóreas, es un proceso que consiste en 4 pasos:

Establecimiento del cultivo y/o inducción de brotes, desarrollo y multiplicación de los brotes, enraizamiento de los brotes desarrollados, y establecimiento en vivero (Thorpe y Patel, 1984/cit. Por Thorpe *et. al*, 1991).

Las gimnospermas son especies cuyo ciclo de desarrollo es muy largo, requiriéndose la mayoría de las veces entre 15 y 20 años para poder ver la planta florecer. Es por esto, que dichas especies son objeto de investigación por parte de áreas biotecnológicas como el cultivo de tejidos. Los primeros estudios fueron realizados por Schidt y Bronner entre los años 1924 y 1932 sobre el cultivo y crecimiento de embriones de coníferas (Roses y Villalobos, 1990).

Posteriormente, durante un período de 20 años se realizaron varios estudios con resultados favorables para la investigación. Goutheret (1934-1935) estudió la proliferación de callos a partir de cambium de *Pinus pinaster* y *Abías pectinola* en diferentes medios de cultivo. La Rue (1948-1950) publicó la regeneración de brotes de raíces haploides derivadas del megagametofito *Zamia* y *Cicas* y Tuleck (1953) estableció el primer cultivo continuo de callos haploides derivados del polen maduro de *Gingko* (Roca y Mroginski, 1991).

Por la década de 1960-1970 las investigaciones se encaminaron al estudio de los requerimientos nutricionales en cultivos de callosidades de *Pínea* y *Pinus*, seguidamente en el año 1974 Brown obtuvo yemas adventicias sobre cotiledones de *Pinus palustris* y a partir de éstos la regeneración completa por primera vez de una planta conífera (Biondi y Thorpe, 1981). Desde esta fecha en adelante ha aumentado el número de especies con regeneración completa, es así como alrededor de 95 especies de gimnospermas fueron cultivadas *in vitro* con éxito. De éste total, 87 especies son pertenecientes a coníferas, siendo el 40% de éstas del género *Pinus* (Biondi y Thorpe, 1981).

A partir de 1996 los estudios se basaron en determinar cuales eran las hormonas y medios de cultivo más favorables, para la propagación de las especies.

Es así como Chung y Carrasco (1996) utilizaron las técnicas de cultivo *in vitro* para propagar *Sáliz sp* en 3 etapas (desinfección, multiplicación y aclimatación) utilizando un medio de cultivo MS en donde observaron el desarrollo de brotes foliares.

Mackay, *et. al*, 1996, logra desarrollar un sistema de propagación clonal para la Agarita (*Berberis trifoliata*) examinando variable como proliferación de brotes, efecto de la edad del cultivo, efecto en el período de tratamiento en el crecimiento de los brotes, raíces que afectan la proliferación del tallo, crecimiento del tallo y raíz. Además, determinó que la especie *Texas madrone* podría ser propagada exitosamente mediante cultivo de tejidos utilizando el medio basal que consistía en sales de medio para plantas leñosas (WPM), vitaminas y sucrosa suplementado con BA.

En 1997 Barrueta *et. al*, logra la micropropagación de *Miconia sp* usando un medio MS1 suplementado con concentraciones de thidiazuron (TDZ) y observaron un alto rango de regeneración a los 60 días.

Por su parte, Mondal, *et. al*, (1998) en la micropropagación de la *Tea (Camelia sinensis)* observó que el efecto del thidiazuron (TDZ), la cual fue comparada con el efecto del BAP, usando segmentos nodales *in vitro*, analizaron, que las bajas concentraciones de TDZ solo fueron efectivas en la proliferación de brotes y que mantienen alta tasa de multiplicación en medios libres de hormonas.

Acosta *et. al*, (1999) determinó las vías para el establecimiento y multiplicación *in vitro* en la micropropagación de la Guana (*Hildegardia cubensis urb*). El experimento consistió en el estudio de diferentes dosis de BAP (0.0; 1.5; 2.0 y 2.5 mg/l) en el medio de cultivo como suplemento para la multiplicación de ápices y yemas axilares.

Niella P, *et. al*, (2002) desarrollaron un protocolo para la micropropagación de dos especies nativas, Guatambú y Cedro utilizando medios MS y WPM suplementado con diferentes concentraciones de BAP y ANA, observaron que el establecimiento *in vitro* de Guatambú se obtuvo en el medio MS, mientras

que el establecimiento de Cedro no arroja diferencias significativas entre los medios utilizados.

3. METODOLOGÍA

3.1 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

Esta investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre sede Puerta Roja, Sincelejo (Sucre), cuya posición geográfica en Colombia es 9° 18' de latitud norte y 75° 26' de longitud oeste del meridiano de Greenwich, con una temperatura promedio de 28° c, humedad relativa del 75%, pluviosidad media mensual de 1100 mm y con una altitud de 200 msnm (Rodríguez, C. 2002).

3.2 CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales que presenta el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales son:

- Temperatura: 26±3° c
- Intensidad lumínica: 50±5µmol/m²s¹
- Foto período: 12 horas luz.
- Humedad relativa: 45-60%

3.3 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PROCEDENTE DE CAMPO

Los explantes de la especie maderable Bálsamo de Tolú (*Myroxylon balsamum*) fueron tomados de árboles silvestres ubicados en el área rural del municipio de Sincelejo (Sucre), específicamente en el corregimiento de Chochó, debido a su fácil acceso.

Se colectaron explantes con un tamaño de 1.0 a 1.5 cms de longitud aproximadamente tomados directamente de los árboles silvestres, ya que fue difícil su obtención a partir de estacas y semillas.

3.4 ETAPA DE DESINFECCIÓN

Luego de obtener y seleccionar los explantes procedentes de campo, fueron sumergidos en una solución fungicida con benoagro 2 gramos durante 2 horas, luego se les realizó un lavado con detergente comercial (1 gr/100 ml) durante 5 minutos, posterior a ello se enjuagaron de 3 a 5 veces con suficiente agua destilada estéril con el fin de retirar restos de detergente adheridos a los explantes. Posteriormente se le adicionó 3 gotas de Tween 20 y se mantuvo en constante agitación hasta observar la presencia de espuma en la superficie, se enjuagó de nuevo con agua destilada estéril para retirar restos del líquido surfactante (Suárez y Tovío, 2005).

Terminado este pretratamiento de desinfección con los explantes de campo, se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se sumergieron en etanol al 70% por 3 minutos, seguido por 3 lavados con agua destilada estéril. Luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones 1,2, 3 y 4% (v/v) durante 10 y 20 minutos (cuadro 3), para un total de 8 tratamientos y un control sin hipoclorito de sodio, de nuevo se enjuagaron con agua destilada 3 veces y se sembraron en medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento.

En esta etapa se evaluó semanalmente el número de explantes contaminados por bacterias, hongos y necrozamiento.

Cuadro 3. Tratamientos ensayados durante la etapa de desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) en explantes de *M.balsamum*

TRATAMIENTOS	CONCENTRACION DE NaOCl (%)	TIEMPO (min)
Mo	0	0
M1	1	10
M2	1	20
M3	2	10
M4	2	20
M5	3	10
M6	3	20
M7	4	10
M8	4	20

3.5 ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

En esta etapa los explantes previamente desinfectados se sembraron en medio MS (anexo 1), suplementado con el regulador de crecimiento BAP (Bencilaminopurina) en concentraciones de 0.0 μ M, 6.0 μ M, 12 μ M y 18 μ M para un total de 4 tratamientos (cuadro 4).

Posteriormente se sellaron los frascos con papel aluminio y cristaflex, y se almacenaron en el cuarto de crecimiento por un período de 60 días durante el cual se realizaron las evaluaciones respectivas cada 8 días.

Los criterios de evaluación fueron: número de nudos, longitud del explante y número de hojas.

Cuadro 4. Tratamientos ensayados en la etapa de iniciación de *M.balsamum* con diferentes concentraciones de BAP (μM).

TRATAMIENTOS	CONCENTRACION DE BAP (μM)
To	0
T1	6
T2	12
T3	18

3.6 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

En esta fase las plántulas obtenidas se sembraron en medio MS suplementado con una combinación entre los reguladores de crecimiento BAP (0.0, 6.0, 12.0 y 18.0 μM) e IBA (0.0, 1.2, 2.4 y 4.8 μM) para un total de 10 tratamientos (cuadro 5).

Luego los explantes se llevaron al cuarto de crecimiento por un período de 60 días mediante el cual se realizaron las evaluaciones respectivas.

Los parámetros a evaluar fueron: número de nudos, número de hojas y longitud del explante.

Cuadro 5. Tratamientos ensayados en la etapa de multiplicación de *M.balsamum* con diferentes combinaciones de BAP e IBA (μM)

TRATAMIENTOS	CONCENTRACION DE BAP (μM)	CONCENTRACION DE IBA (μM)
Co	0	0
C1	6	1.2
C2	6	2.4
C3	6	4.8
C4	12	1.2
C5	12	2.4
C6	12	4.8
C7	18	1.2
C8	18	2.4
C9	18	4.8

3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta investigación se utilizó un diseño experimental enteramente al azar en todas las etapas, a los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias para determinar cual de los tratamientos fue el mejor.

3.7.1 Población

El número de explantes utilizados en este trabajo fue de 218, distribuidos así:

- Etapa de desinfección: 110 explantes
- Etapa de establecimiento: 48 explantes
- Etapa de multiplicación: 60 explantes

3.7.2 Número de repeticiones

Para la etapa de desinfección se utilizaron diferentes repeticiones por tratamiento, en la etapa de iniciación se utilizaron 12 repeticiones por tratamiento y en la de multiplicación se emplearon 6 repeticiones por tratamiento.

3.7.3 Indicadores

Cuadro 6. Indicadores de la etapa de desinfección

Indicadores/variable dependiente	Variable independiente
No de explantes cont. por hongos	Concentración de NaOCl Tiempo de exposición de los explantes
No de explantes cont. por bacterias	
No de explantes necrosados	

Cuadro 7. Indicadores de la etapa de establecimiento

Indicadores/variable dependiente	Variable independiente
No de nudos por explante	Concentración de BAP (μ M)
Longitud del brote (cm)	
No de hojas	

Cuadro 8. Indicadores de la etapa de multiplicación

Indicadores/variable dependiente	Variable independiente
No de nudos por explante	Concentración de BAP e IBA (μM)
Longitud del brote (cm)	
No de hojas	

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ETAPA DE DESINFECCIÓN

En esta etapa fue indispensable el pretratamiento de desinfección llevado a cabo con los explantes de campo, ya que en cierta forma facilitó disminuir los porcentajes de contaminación fúngica presente en los explantes y así mantener un alto grado de asepsia, teniendo en cuenta que los explantes fueron tomados directamente de árboles silvestres de *M. balsamum* y por ello presentan alta contaminación fúngica y bacteriana.

Las variables de porcentajes de contaminación por hongos, bacterias y el porcentaje de necrosis con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) e intervalos de tiempo arrojaron los siguientes resultados:

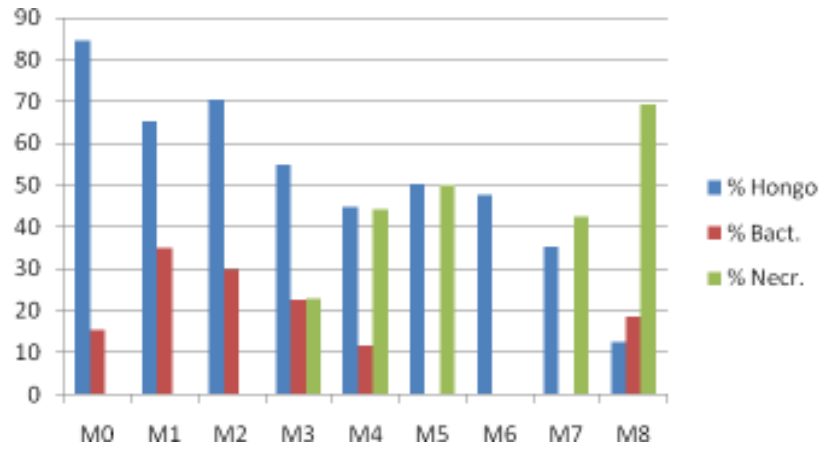
Cuadro 9. Porcentajes de contaminación fúngica, bacteriana y explantes necrosados en la etapa de desinfección de *M. balsamum*

Tratamientos	[]%NaOCl	Tiempo min	% Cont. Hongos	% Cont. Bacteria	% Expl. Necrosados
M0	0	0	84.6	15.4	0
M1	1	10	65.2	34.8	0
M2	1	20	70.4	29.6	0
M3	2	10	54.7	22.6	22.7
M4	2	20	44.6	11.4	44.0
M5	3	10	50.1	0	49.9
M6	3	20	47.5	0	0
M7	4	10	35.2	0	42.4
M8	4	20	12.3	18.5	69.2

Para la especie forestal *Myroxilon balsamum* las bajas concentraciones de hipoclorito de sodio y los cortos tiempos de inmersión, produjo porcentajes de contaminación por hongos y bacterias elevados, posiblemente debido a que se evita la entrada del hipoclorito de sodio (NaOCl) a los tejidos mas profundos del explante, lo que impide una efectiva desinfección y se permite la proliferación de los patógenos en el medio de cultivo. De igual manera estos altos porcentajes de contaminación se deben a las bajas concentraciones de NaOCl y a la posible presencia de patógenos endógenos en el tejido, teniendo en cuenta que son explantes tomados de árboles silvestres donde las condiciones fitosanitarias no son controladas y la presencia de contaminantes es mayor.

Los mejores resultados en la etapa de desinfección se obtuvo con los tratamientos M4, M5 y M6, con concentraciones de hipoclorito de sodio de 2, 3 y 3%, y con tiempos de exposición de 20, 10 y 20 minutos respectivamente, obteniéndose porcentajes de contaminación por hongos de 44.6, 50.1 y 47.5% respectivamente. Mientras que por bacterias se presentaron porcentajes de contaminación de 11.4 y 0 para los 3 tratamientos, sin embargo, las altas concentraciones aumentan el nivel de necrosis como sucedió con los tratamientos M5, M7 y M8, donde la penetración excesiva de hipoclorito de sodio daña las células y se ve limitada la supervivencia de los explantes (fig.2 y 3).

El proceso de desinfección en los explantes de *M. balsamum* se facilita con el empleo de agentes químicos para lavado como la solución de detergente comercial, solución de Tween 20 y etanol al 70% los cuales actúan como agentes surfactantes que rompen la tensión superficial del explante, y así el hipoclorito de sodio actúa eficazmente y con mayor facilidad (fig.4).



TRATAMIENTOS

Fig. 2. Porcentajes de explantes contaminados por hongos, bacterias y necrosados



Fig. 3. Explantes de *M. balsamum* en etapa de desinfección.

Para la especie *M. balsamum* no se encontraron reportes en la etapa de desinfección, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se sugiere que la eficiencia en esta etapa depende de la presencia o ausencia de patógenos endógenos que son resistentes a las concentraciones elevadas de hipoclorito, de igual forma también depende de las condiciones asépticas que se manejan en el laboratorio (fig.4).



Fig. 4. Explantes de *M. balsamum* sin necrosis y libres de contaminación.

4.2 ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

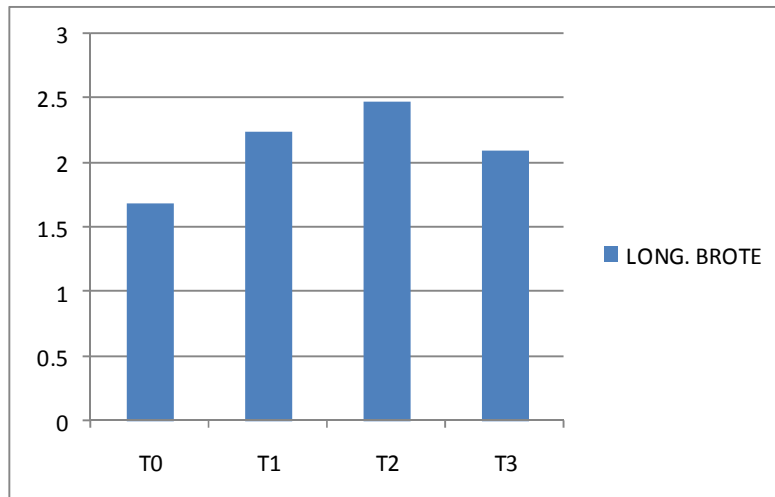
Para el desarrollo de esta etapa se tomaron explantes previamente desinfectados y se establecieron en medio MS suplementado con el regulador de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) a diferentes concentraciones, ensayándose diferentes tratamientos.

Durante 60 días se realizaron las evaluaciones respectivas y se recopilaron los resultados que se encuentran promediados en el cuadro 10.

Cuadro 10. Promedio de explantes iniciados de *Myroxylon balsamum* a los 60 días de evaluados.

Tratamientos	Conc. De BAP (μM)	No de nudos	No de hojas	Long. del brote (cms)
T0	0	2.3	1.8	1.69
T1	6	3.4	2.5	2.24
T2	12	3.7	2.3	2.48
T3	18	3.27	2.1	2.1

Durante esta etapa se encontró que hubo mayor longitud del brote en el tratamiento T2 (fig.5) y también se registró el mayor número de nudos, pero con respecto a la variable número de hojas, los mejores resultados se dieron en el tratamiento T1 y el tratamiento control T0 presentó la mas baja respuesta en estas variables (cuadro 10,fig.6 y 7).



TRATAMIENTOS

Fig. 5. Longitud de los explantes en la etapa de establecimiento a los 60 días de evaluados

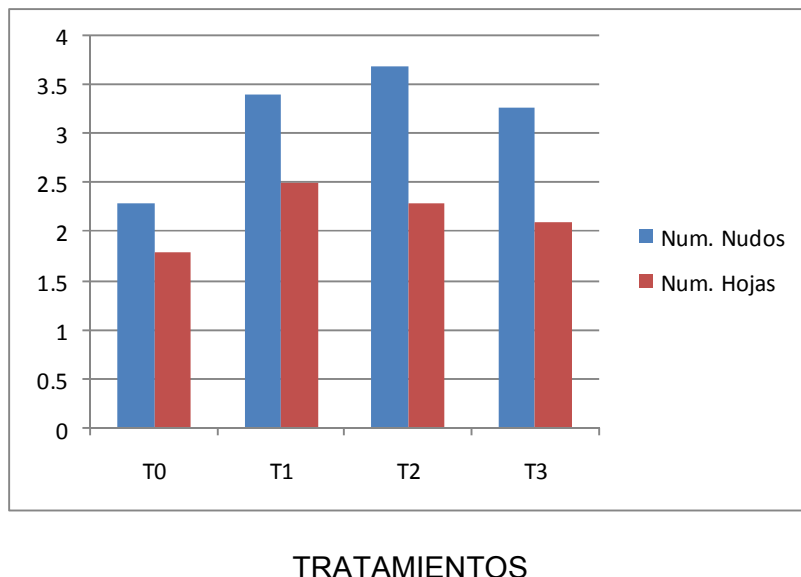


Fig.6. Numero de nudos y hojas promedio en explantes de *M.balsamum* en la etapa de establecimiento

El análisis estadístico realizado no mostró diferencias significativas entre los tratamientos empleados para las variables dependientes longitud del brote y número de hojas, presentando un coeficiente de variabilidad (C.V.) de 44.10 y 53.64 respectivamente (anexo 2 y 5) , esos coeficientes de variación son relativamente altos, lo que indica que la inducción de brotes puede no depender exclusivamente de la presencia del BAP en el medio, sino que puede estar afectados por otras variables entre las que se encuentra la presencia de reguladores de crecimientos o diferentes condiciones ambientales como la temperatura, el fotoperiodo o las condiciones de dióxido de carbono (CO₂) en el medio. Para la variable dependiente número de nudos el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos, con un C.V. de 46.42 y un nivel de significancia (α) de 0.05 (anexo 3).

Al realizarse la prueba de comparación de medias para esta variable, los tratamientos T2, T3 y T1, presentaron las medias más altas y son estadísticamente iguales, por lo que se recomienda cualquiera de éstos en el establecimiento de explantes de *M. balsamum* (anexo 4).



Fig. 7. Explantes de *M. balsamum* en la etapa de establecimiento.

4.3 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

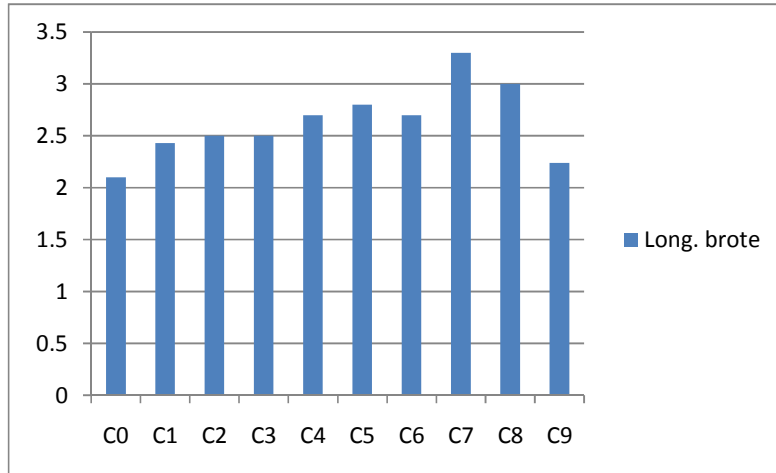
En la etapa de multiplicación se evaluaron las variables número de nudos, longitud del brote y número de hojas en explantes de *M. balsamum* por un período de 60 días, los promedios obtenidos para cada una de éstas variables se resume en el cuadro 11.

Cuadro 11. Número promedio de nudos, hojas y longitud del brote en medios con BAP e IBA

Trat.	[] de BAP (μ M)	[] de IBA (μ M)	No de nudos	No de hojas	Long. del brote (cm)
C0	0	0	3.1	2.1	2.1
C1	6	1.2	3.1	2.8	2.43
C2	6	2.4	4.3	3.1	2.5
C3	6	4.8	5.1	3.3	2.5
C4	12	1.2	4.3	3.3	2.7
C5	12	2.4	5.7	4.3	2.8
C6	12	4.8	5.6	3.8	2.7
C7	18	1.2	5.5	4.3	3.3
C8	18	2.4	5.5	4.8	3
C9	18	4.8	3.8	3.2	2.24

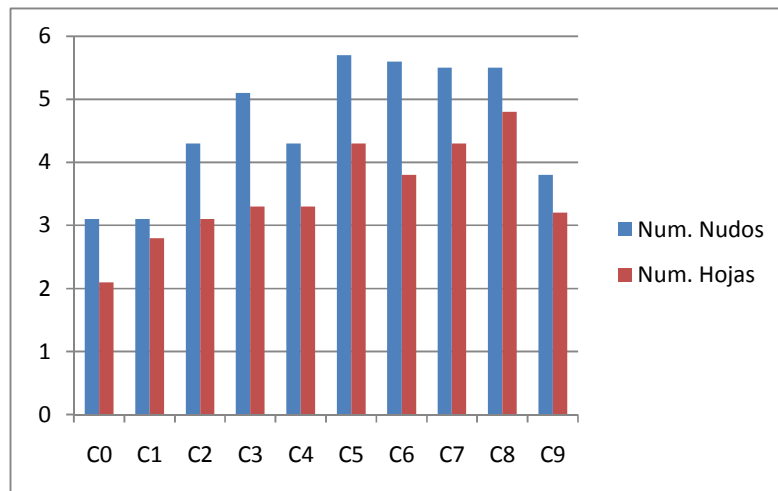
En el desarrollo de esta etapa se observó que en la variable número de nudos los tratamientos C5, C6, C7 y C8 arrojan los mas altos resultados, mientras que en la variable número de hojas los tratamientos C8, C5 y C7 presentan el índice de hojas mas alto con un promedio de 4.8 y 4.3 hojas por planta respectivamente (cuadro 11, fig.9 y 10).

Para la variable longitud del brote los mejores tratamientos con los índices mas altos fueron C7 y C8, con promedios de 3.3 y 3 cms. respectivamente (cuadro 11 , fig. 8).



TRATAMIENTOS

Fig. 8 Efecto de los reguladores BAP e IBA en el crecimiento de los explantes de *M.balsamum*



TRATAMIENTOS

Fig.9 Efecto de los reguladores BAP e IBA en el número de nudos y hojas en explantes de *M.balsamum*



Fig. 10. Efecto de diferentes combinaciones de BAP e IBA en explantes de *M. balsamum* en la etapa de multiplicación.

El análisis de varianza realizado mostró diferencias significativas entre los tratamientos, registrándose valores de C.V. (coeficiente de variabilidad) de 26.33 para la variable longitud del brote, 30.33 para número de nudos y 35.27 con un nivel de significancia de 0.05, lo que indica que el estudio fue bien conducido (anexo 6, 8 y 10) . Según la prueba de comparación de medias se encontró que para la variable longitud del brote los tratamientos con las medias mas altas fueron C7, C8, C5 y C4 siendo estadísticamente iguales, ya que se encuentran dentro de un mismo grupo y muestran diferencias con el resto de tratamientos (anexo 7).

Al analizar los resultados para la variable número de nudos, la prueba de comparación de medias mostró que los tratamientos C5, C7, C8, C3, C6, C2 y C5 no presentaron diferencias significativas, pero sí con los tratamientos C0, C1 y C9 (anexo 9).

Mientras que para la variable número de hojas los tratamientos C8, C7 y C5 presentan las medias más altas, y muestran diferencias con el resto de tratamientos (anexo 11).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede afirmar que los tratamientos C7 y C8 respondieron mejor en el desarrollo de esta etapa, por lo que la concentración de estas hormonas en estos tratamientos facilitó la multiplicación de los explantes de *M. balsamum*.

El empleo de los reguladores de crecimiento BAP (Bencilaminopurina) e IBA (ácido indolbutírico) facilitó la elongación de las plántulas de *M. balsamum* y aumentó el número de nudos y hojas, por lo que su empleo es de vital importancia para el desarrollo de los explantes.

5. CONCLUSIONES

- El proceso de desinfección llevado a cabo con los explantes de campo de *Myroxylon balsamum* tomados de árboles silvestres, es indispensable para disminuir los niveles de contaminación fúngica y bacteriana presente en los explantes.
- El empleo de fungicidas como el Benoagro, agentes de lavado, Tween 20, etanol y NaOCl favorece en forma eficiente la desinfección de los explantes.
- El tratamiento de los explantes de *M.balsamum* con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3 % durante 20 minutos fue eficiente en la desinfección de los explantes procedentes de campo, ya que se disminuye el porcentaje de necrozamiento favoreciendo la supervivencia de estos.
- En la etapa de establecimiento la concentración de BAP en 12 μM , permitió la obtención de un mayor número de nudos y el desarrollo de plántulas de mayor tamaño con respecto a los otros tratamientos.
- La combinación de los reguladores BAP 18 μM e IBA en un rango de concentraciones de 1.2 y 2.4 μM en la fase de multiplicación, permite un mayor crecimiento y garantiza un mayor número de plántulas de *M.balsamum*.
- La metodología llevada a cabo facilita una alta producción de explantes para la micropropagación de esta especie.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que permitan caracterizar e identificar microorganismos presentes en los explantes de *M.balsamum* para un mejor control con fungicidas o antibióticos específicos, y así disminuir los niveles de contaminación al realizarse el cultivo *in vitro*.
- Evaluar la acción de otros reguladores de crecimiento en las distintas etapas de la propagación *in vitro*, y así evaluar nuevos potenciales de esta especie forestal.
- Estandarizar una metodología que posibilite la realización de las etapas de enraizamiento y aclimatación de plántulas de *M.balsamum*, y así completar la técnica de propagación *in vitro* con un sistema de establecimiento exitoso a nivel de campo.

7. BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, E.; BANGO, J., BARRANCO, L Y PEÑA, P. Establecimiento y multiplicación *in vitro* en la micropropagación de la Guana (*Hildegardia cubensis*). Cuba. 1999.

BARRUETA, L.; BATISTA, J Y DA COSTA, S. Micropropagation of *Miconia* sp, A Woody, Melastomaceae from Brasil, using TDZ as plant growth regulator. Brasilia: Embrapol cenargen. Brasil, 1977.

BIONDI, S Y THORPE, T. Clonal propagation of forest tree species. COSTER symp on tissue culture of economically important plants. Ed. A.N.Rao. Singapore. P 197-202. 1981

BRIDG, H. Micropropagation and determination of the *in vitro* stability of *Annona cherimolla* and *Annona muricata*. Humboldt University of Berlin. P 1-100.2000.

BRUMEL, D Y MAY, J. Rapid cellular responses to auxin and the regulation of the growth. En: plant cell and env. N° 10. P 528-542. 1987.

CHUNG, P Y CARRASCO, B. Micropropagation de sáliz sp a través de meristemas foliares. Instituto forestal. 1996.

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, the technology exogetics Lta. Edington. England. 1993.

GONZÁLEZ, S. Medios de cultivo. Facultad de Biología. Departamento de Biología Vegetal, Universidad de La Habana. Cuba. P 67-88. 2002.

HARTMANN, H Y KESTER, D. Propagación de plantas. México, Editorial Continental. 1989.

HOLDRIDGE, L Y POVEDA, A. Árboles de Costa Rica. Centro científico tropical, San José, Costa Rica. Vol 1. P 371. 1975.

KRIKORIAN, A Y BERGUAM, D. Plant all and tissue cultures: The role of Haberlandt. Rev No 28. P 59-76. 1969.

MAYORGA, O Y JIMÉNEZ Q. Bálsamo. Revista forestal centroamericana No 28. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 2000.

MACKAY, W. Micropropagation of agarita (*Berberis trifoliata*). USA: Texas A & M University hortscience. 31 (6)-1030-1032. P 1-5. 1996.

MONDAL, T. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis*) Kuntzes using thidiazuron (TDZ). Institute of Himalaya. Bioresource technology 26 (1). P57-61. 1998.

MURASHIGE, T Y SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology plantarum 15: 473-497. 1962.

MIN AMBIENTE- DNP. Política de bosques. Documento CONPES No 2834. República de Colombia. Bogotá. 2001.

NIELLA, P. ; KESTER, A Y NEMER, D. Cultivo *in vitro* de guatambú blanco (*Balfourodendron riedelianon*) y cedro misionero (*Cedrela físilis*). Universidad Nacional de Misiones. 2002.

PEREA, M Y NAVARRO, W. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. Universidad Nacional, CONICIT. Bogotá, Colombia. 1988.

PREHN, D. ; SERRANO, C Y ARCE- JHONSON, P. Propagación vegetativa en especies forestales (segunda parte): La vía genética. Chile forestal. Año 24 No 272. P 38-40. 1999.

ROCA,W. Aplicaciones de los métodos de cultivo de tejidos en frutales. Resumen de una conferencia presentada en el curso de fruticultura. Federación nacional de cafeteros. CIAT, Cali, Colombia. 1989.

ROCA, W Y MROGINSKI, L. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. P 970. 1991.

RODRÍGUEZ, C. Cultivo *in vitro* de ñame (*Dioscoria alata*) C. V. "Pico de botella" a partir de segmentos nodales. Universidad de Sucre. Programa de Biología. Sincelejo, Colombia. 2002.

RODRÍGUEZ, C. ; PERZ, J Y FUCKS, A. Mejora de plantas. La Habana (Cuba): Félix Varela. P 456. 1995.

ROSSES, C Y VILLALOBOS, B. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. P 107-112. 1990.

SUAREZ, E Y TOVÍO, L. Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* var. Bicolor a partir de microestacas. Trabajo de grado. Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología. Sincelejo, Colombia. 2005.

THORPE, T. ; HARRY, I Y KUMAR, P. Application of micropropagation to forestry. Micropropagation technology and application debergh. Zimmerman, H. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. P 311-336. 1991.

VILLALOBOS, V. Fundamentos de cultivos vegetales. La Habana. 1993.

ZAMORA, V. Árboles de la Mosquitia Hondureña. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Serie técnica No 43. P 44-45. 2000.

ANEXOS

ANEXO 1. Componentes básicos del medio Murashige y Skoog (1962) para preparar un litro (1 L)

Componente	Mg.L ⁻¹	Concentración (molar)
NH ₄ NO ₃	1650	20.61 μM
KNO ₃	1900	18.79 μM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332.2	2.99 μM
MgSO ₄ ·H ₂ O	180.7	1.50 μM
KH ₂ PO ₄	170	1.25 μM
KI	0.83	5.00 μM
H ₃ BO ₃	6.2	100 μM
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	100 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	29.91 μM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10 μM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11 μM
Na ₂ EDTA	37.26	100 μM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	100 μM

Fuente: Hartmann y Kester, 1992

ANEXO 2. Análisis de Varianza, variable longitud del brote (etapa de establecimiento)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	4.562286	1.520762	2.2393	0.096 Ns
ERROR	44	29.880829	0.679110		
TOTAL	47	34.443115			

C.V. = 44.10 %

Tabla de medias

TRATA.	REP.	MEDIA
0	12	1.408333
1	12	1.866667
2	12	2.275000
3	12	1.925000

ANEXO 3. Análisis de varianza, variable número de nudos (etapa de establecimiento)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	18.729156	6.243052	3.5559	0.021 *
ERROR	44	77.250000	1.755682		
TOTAL	47	95.979156			

C.V. = 46.42 %

ANEXO 4. Tabla de medias, variable número de nudos (etapa de establecimiento)

TRATA.	REP.	MEDIA
1	12	1.916667
2	12	2.833333
3	12	3.666667
4	12	3.000000

RESULTADOS DE LA COMPARACION DE MEDIAS

TRATAMIENTO	MEDIA
3	3.6667 A
4	3.0000 AB
2	2.8333 AB
1	1.9167 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

VALORES DE DMS

dms(3 4) =	1.0917
dms(3 2) =	1.0917
dms(3 1) =	1.0917
dms(4 3) =	1.0917
dms(4 2) =	1.0917
dms(4 1) =	1.0917
dms(2 3) =	1.0917
dms(2 4) =	1.0917
dms(2 1) =	1.0917
dms(1 3) =	1.0917
dms(1 4) =	1.0917
dms(1 2) =	1.0917

ANEXO 5. Análisis de varianza, variable número de hojas (etapa de establecimiento)

	FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3		3.166672	1.055557	0.9988	0.596 nS
ERROR	44		46.500000	1.056818		
TOTAL	47		49.666672			

C.V. = 53.64 %

TABLA DE MEDIAS

TRATA.	REP.	MEDIA
1	12	1.500000
2	12	2.083333
3	12	2.166667
4	12	1.916667

ANEXO 6. Análisis de varianza, variable longitud del brote (etapa de multiplicación)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	9	9.614227	1.068247	2.3538	0.026 *
ERROR	50	22.691681	0.453834		
TOTAL	59	32.305908			

C.V. = 26.33 %

ANEXO 7. Tabla de medias, variable longitud del brote (etapa de multiplicación)

TRATA.	REP.	MEDIA
1	6	2.100000
2	6	2.433333
3	6	2.516667
4	6	2.500000
5	6	2.583333
6	6	2.783334
7	6	2.433333
8	6	3.333333
9	6	3.033334
10	6	1.866666

TRATAMIENTO	MEDIA
8	3.3333 A
9	3.0333 AB
6	2.7833 ABC
5	2.5833 ABCD
3	2.5167 BCD
4	2.5000 BCD
7	2.4333 BCD
2	2.4333 BCD
1	2.1000 CD
10	1.8667 D

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05
 $dms(2, 10) = 0.7818$

dms(1 8) = 0.7818
 dms(1 9) = 0.7818
 dms(1 6) = 0.7818
 dms(1 5) = 0.7818
 dms(1 3) = 0.7818
 dms(1 4) = 0.7818
 dms(1 7) = 0.7818
 dms(1 2) = 0.7818
 dms(1 10) = 0.7818
 dms(10 8) = 0.7818
 dms(10 9) = 0.7818
 dms(10 6) = 0.7818
 dms(10 5) = 0.7818
 dms(10 3) = 0.7818
 dms(10 4) = 0.7818
 dms(10 7) = 0.7818

ANEXO 8. Análisis de varianza, variable número de nudos (etapa de multiplicación)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	9	55.266724	6.140747	3.3495	0.003 **
ERROR	50	91.666626	1.833333		
TOTAL	59	146.933350			

C.V. = 30.31 %

ANEXO 9. Tabla de medias, variable número de nudos (etapa de multiplicación)

TRATAMIENTO	MEDIA
6	5.6667 A
8	5.5000 A
9	5.5000 A
4	5.1667 A
7	4.6667 AB
3	4.3333 AB
5	4.3333 AB
2	3.1667 B
1	3.1667 B
10	3.1667 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

dms(2 10) = 1.5714
 dms(1 6) = 1.5714

dms(1 8) = 1.5714
 dms(1 9) = 1.5714
 dms(1 4) = 1.5714
 dms(1 7) = 1.5714
 dms(1 3) = 1.5714
 dms(1 5) = 1.5714
 dms(1 2) = 1.5714
 dms(1 10) = 1.5714
 dms(10 6) = 1.5714
 dms(10 8) = 1.5714
 dms(10 9) = 1.5714
 dms(10 4) = 1.5714
 dms(10 7) = 1.5714
 dms(10 3) = 1.5714
 dms(10 5) = 1.5714

ANEXO 10. Análisis de varianza, variable número de hojas (etapa de multiplicación)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	9	35.400024	3.933336	2.6818	0.013*
ERROR	50	73.333313	1.466666		
TOTAL	59	108.733337			

C.V. = 35.27 %

ANEXO 11. Tabla de medias, variable número de hojas (etapa de multiplicación)

TRATAMIENTO	MEDIA
9	4.8333 A
8	4.3333 AB
6	4.3333 AB
5	3.3333 BC
4	3.3333 BC
3	3.1667 BC
7	3.1667 BC
2	2.8333 C
10	2.6667 C
1	2.3333 C

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

dms(2 1) = 1.4055

dms(10 9) = 1.4055
dms(10 8) = 1.4055
dms(10 6) = 1.4055
dms(10 5) = 1.4055
dms(10 4) = 1.4055
dms(10 3) = 1.4055
dms(10 7) = 1.4055
dms(10 2) = 1.4055
dms(10 1) = 1.4055
dms(1 9) = 1.4055
dms(1 8) = 1.4055
dms(1 6) = 1.4055
dms(1 5) = 1.4055
dms(1 4) = 1.4055
dms(1 3) = 1.4055
dms(1 7) = 1.4055
dms(1 2) = 1.4055
dms(1 10) = 1.4055

