

**EVALUACION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PROPAGACION IN
VITRO DEL LAUREL DE CERA (*Myrica pubescens* H. & B. K. ex Willd).**

ERIKA ANDREA DE LA BARRERA JURADO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROFORESTAL
PASTO - COLOMBIA**

2003

**EVALUACION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PROPAGACION IN
VITRO DEL LAUREL DE CERA (*Myrica pubescens* H. & B. K. ex Willd).**

ERIKA ANDREA DE LA BARRERA JURADO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
INGENIERO AGROFORESTAL**

Presidente de Tesis

GERMAN CHAVES JURADO I. A. Esp. Ecología

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS

PROGRAMA DE INGENIERIA AGROFORESTAL

PASTO - COLOMBIA

2003

“Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado, son responsabilidad exclusiva de su autor”.

Artículo 1º del Acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Firma Comité Delegado Asesor

Firma Comité Asesor

Firma Comité Asesor

DEDICO A:

Mis padres, Max de la Barrera López y Ruth Victoria
Jurado Aguirre.

Mis hermanas Sandra y Katherine.

Sor Emilia.

A la memoria de mi abuelo, Dr. Nicolás Jurado
Benavides.

A la memoria de Herly Moncayo Pasos.

A todos mis amigos.

ERIKA ANDREA DE LA BARRERA JURADO

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a todos mis profesores del Programa de Ingeniería Agroforestal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño.

Germán Chaves Jurado, I. A. Esp. Ecología. Docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño.

Hernando Criollo Escobar, I. A. M.Sc. Docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño.

Carlos Mosquera Quijano, I. A. Director Departamento de Recursos Naturales y Sistemas Agroforestales y Docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño.

Jairo Muñoz Hoyos, I. A. M.Sc. Docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño.

Germán Arteaga Meneses, I. A. M.Sc. Decano de la Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño.

Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Nariño.

Personal de Laboratorios de la Universidad de Nariño.

Todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización y conclusión del presente trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	17
1. MARCO TEORICO	20
1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCION	20
1.2 CLASIFICACION TAXONOMICA	20
1.3 DESCRIPCION BOTANICA	21
1.4 REQUERIMIENTOS AMBIENTALES	24
1.5 PROPAGACION Y DESARROLLO	24
1.6 DEFINICION DE CULTIVO DE TEJIDOS	26
1.7 CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES FORESTALES	27
1.8 MEDIO DE CULTIVO A UTILIZAR	28
1.9 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO DE TEJIDOS	33
1.10 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA OXIDACION	40
1.11 CULTIVO DE MERISTEMOS	42
1.12 CULTIVO DE NUDOS	44
2. DISEÑO METODOLOGICO	45
2.1 LOCALIZACIÓN	45

2.2	SELECCION Y DESINFECCION DEL MATERIAL VEGETAL	45
2.3	SOLUCION STOCK Y MEDIO DE CULTIVO	49
2.4	ESTERILIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO, INSTRUMENTAL	52
Y CRISTALERIA		
2.5	SIEMBRA DE EXPLANTES	52
2.6	DISEÑO EXPERIMENTAL	54
2.7	VARIABLES EVALUADAS	59
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	61
3.1	RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE DEL ESTUDIO	61
3.2	RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SIEMBRA CON NUDOS	64
3.2.1	Porcentaje de oxidación, prendimiento y mortalidad	66
4.	CONCLUSIONES	77
5.	RECOMENDACIONES	78
	BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición del medio de cultivo de Murshige – Skoog (62).	29
Tabla 2. Cantidades empleadas para la preparación de la solución Stock con la composición salina de Murashige & Skoog (62).	50
Tabla 3. Tratamientos hormonales empleados en la primera fase del estudio.	55
Tabla 4. Porcentaje de contaminación, necrosamiento y formación de callo en la primera fase del estudio.	62
Tabla 5. Porcentaje de oxidación, prendimiento y mortalidad utilizando nudos como explantes.	67

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Morfología del laurel de Cera.	23
Figura 2. Plántulas de Laurel de Cera para la obtención de explantes.	46
Figura 3. Medio de cultivo con la composición salina de Murashige - Skoog (62), suplementado con carbón activado para el control de la oxidación.	60
Figura 4. Porcentaje de contaminación en siembra con nudos.	65
Figura 5. Nudo necrosado en medio de cultivo Murashige – Skoog (62), utilizando como antioxidante sistémico Polivinyl pirrolidona.	68
Figura 6. Nudo con la formación de brote presentando necrosamiento con emisión de sustancias de color castaño en el medio de cultivo Murashige Skoog (62).	70
Figura 7. Prendimiento de nudo, en medio Murashige – Skoog (62), suplementado con carbón activado al 1 %.	72
Figura 8. Nudo sin oxidación con yema latente.	73
Figura 9. Porcentaje de Oxidación presentada en siembra con nudos.	76

GLOSARIO

CALLO: masa desorganizada proliferativa de células no desarrolladas ni diferenciadas.

EMBRIOGENESIS SOMATICA: proceso de iniciación y desarrollo de un embrión. Puede ser sexual, por fusión de dos gametos (embrión cigótico), o asexual, formado a partir de células de tejido adulto (embrión somático); este último da lugar a un embrioide en una serie de pasos que semejan la formación de un embrión cigótico.

EXPLANTE: tejido que se toma de su sitio original y se transfiere a un medio artificial para su crecimiento o mantenimiento.

FITOREGULADOR: compuesto químico capaz de intervenir en el metabolismo; actúa en muy pequeñas concentraciones para activar o deprimir algún proceso de desarrollo, los fitoreguladores pueden ser endógenos (naturales), si se producen en la planta misma, o exógenos, si se aplican externamente (sintéticos).

HORMONA: es un fitoregulador natural que tiene acción en un lugar de la planta distinto de donde se produce.

IN VITRO: se designa a los procesos biológicos que se realizan a partir de un tejido u órgano aislado del organismo de que procede, llevándose a cabo en laboratorio y cuyas condiciones de incubación se realiza tradicionalmente en tubos de ensayo o recipientes de vidrio.

MERISTEMO: tejido vegetal indiferenciado cuyas células son capaces de activar la división celular y la diferenciación en tejidos especializados. Constituyen la zona de crecimiento de las plantas.

NECROSAMIENTO: muerte vegetal causada por la obstrucción de los vasos vasculares y muerte de tejidos.

NUDO: parte del tallo donde está o ha estado implantada una hoja o rama.

ORGANOGENESIS: formación de órganos (la caulogénesis es la iniciación de brotes y la rizogénesis es la iniciación de raíces).

PRIMORDIO: comienzo u origen de cualquier parte de un órgano.

PRIMORDIO FOLIAR: grupo de células destinado a transformarse en una estructura particular con crecimiento lateral externo del meristemo apical, que va a dar origen a las hojas.

RESUMEN

El estudio de la propagación in vitro del Laurel de Cera (*Myrica pubescens* H. y B. K. ex Willdenow) se realizó en el Laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad de Nariño, localizado a 2540 msnm presentando las siguientes condiciones ambientales: 25 °C de temperatura, 75% de humedad relativa y 2.000 lux de intensidad lumínica (sala de incubación).

Durante el desarrollo de la investigación, se aplicó un diseño DIA, que en su inicio se llevó a cabo con 20 repeticiones y cuatro tratamientos hormonales usando Acido Naftalenacético y Cinetina como reguladores de crecimiento, empleando para la propagación meristemos en dos siembras, aplicando dos soluciones antioxidantes en forma sistémica, que correspondían a ácido cítrico y ascórbico conjuntamente y Polivinyl pirrolidona.

La composición salina de Murashige Skoog (62) se empleó durante toda la investigación.

En esta fase los explantes manifestaron síntomas de ennegrecimiento que condujeron al necrosamiento, a excepción de algunas unidades experimentales en uno de los tratamientos, que llegaron hasta la fase de callo pero que luego se

oxidaron originando su pérdida.

También se emplearon nudos con los cuales se realizó la siembra definitiva para aplicar diferentes tratamientos antioxidantes como: ácido cítrico – ascórbico y Polivinyl pirrolidona en forma sistémica, Polivinyl pirrolidona suplementado al medio de cultivo, reducción de la concentración salina, carbón activado al 1% en oscuridad y posterior transferencia a medio Murashige Skoog (1962) MS con incubación bajo condiciones de luz y carbón activado al 1% con luz.

La mejor respuesta dada por los explantes se dio en el último tratamiento donde se controló efectivamente la oxidación permitiendo formación de brotes que no presentaron oxidación ni muerte de tejido.

ABSTRACT

The propagation in vitro study of the Laurel de Cera (*Myrica pubescens* H. y B. K. ex Willdenow) it was carried out inside laboratory of tissue culture of University of Nariño, located to 2450 msnm above sea level and which have the following environment conditions: temperature 25 °C, 75% relative humidity and light intensity 2000 lux (incubation room).

During the research development, it was applied the Completely at random design which, at the beginning, it was made with 20 repetitions and four hormonal treatment by using Naftalenacetic Acid and Cinetine as growing regulators. It was used meristems in two sowing in order to obtain the propagation. Two antioxidants solutions were applied in a systematical way, which belong to citric and ascorbic along with Polivinyll pirrolidone.

The Murashige Skoog's saline composition (1962) MS was employed during all the research.

Into this phase, the explants, showed blacken symptoms which led to tissue destruction, regardless some experimental units in one of treatments, which reached the corn phase but, then, then oxidized themselves and this causes its

losing.

At the same time, it was employed knots which was made the definitive sown in order to apply different antioxidants treatments such as: citrus acid with ascorbic acid in a systemical way, Polivinyll pirrolidone in a systematical way, Polivinyll pirrolidone supplemented to cultivation environment, decrease in saline concentration, activated charcoal to 1% in darkness and later transference to Murashige and Skoog's (62) MS medium with incubation under darkness condition and a posterior transfer to Murashige Skoog's (62) medium under light conditions and activated charcoal to 1% under darkness conditions.

The best response given by the explants was obtained in the last treatment where it was controlled, in an effective way, the oxidation, which allows the sprouts formation that showed neither oxidation nor tissue death.

INTRODUCCION

Myrica pubescens es una especie importante en los procesos de protección de suelos y como planta pionera para la reforestación de zonas erosionadas, tiene capacidad fijadora de nitrógeno, uniéndose a estas propiedades un potencial económico e industrial que se basa en la extracción y comercialización de su cera (Trejos, 1937).

A lo anterior, se puede agregar la adaptación de esta especie a una diversidad de suelos y temperaturas que oscilan entre los 8 y 20 °C, considerándose así, en un componente útil en arreglos agroforestales y silvopastoriles que se están estudiando, constituyéndose de esta manera en una fuente adicional de ingresos para el agricultor.

De acuerdo con Muñoz (1995), el Laurel es una especie promisoría que ofrece beneficios económicos, entre los que se encuentran la producción de cera, materia prima para la elaboración de jabones, velas, para dar punto a la panela, cera para pisos y proceso de fundición en bronce, convirtiéndose de esta manera, en un producto con buena acogida en el mercado nacional, en ciudades como Popayán, Cali, Medellín, Bogotá y en países de Europa y Japón.

Debido a su difícil reproducción y dada la importancia que representa esta especie para la región, se hace necesario adelantar investigaciones que conlleven a identificar técnicas que luego puedan ser aplicadas en procura de mejorar las condiciones en cuanto a propagación y estudio que a esta especie se refiera.

Una de esas técnicas la constituye la propagación in vitro, que tiene como propósito la obtención de plantas libres de contaminación mejorando su calidad, ya que las condiciones ambientales donde se desarrollan se encuentran bajo un estricto control.

Algunas especies leñosas se pueden considerar como organismos de complejidad fisiológica que da lugar a la formación de productos secundarios como en este caso, y que para la propagación in vitro se convierte muchas veces en un impedimento pero que si se logra superar se podría disfrutar de las ventajas que ofrece esta tecnología.

El presente trabajo se realizó teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

- Evaluar medios de cultivo para la propagación in vitro del laurel de Cera.
- Ensayar con diferentes tipos de antioxidantes para determinar su concentración y el método a emplear para prevenir el ennegrecimiento de los tejidos y posterior necrosamiento, logrando así el establecimiento del explante en el medio de cultivo.

- Determinar la concentración adecuada de Auxinas y Citoquininas en el medio de cultivo que puedan generar la formación de estructuras vegetativas para la obtención de plantas completas.
- Hacer el seguimiento del comportamiento en el desarrollo del explante.
- Identificar las fases del proceso de micropropagación del Laurel de Cera.

1. MARCO TEORICO

1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCION

El Laurel de Cera (*Myrica pubescens*) es un arbusto de origen holártico, es decir, de la parte norte del continente americano, aunque algunos autores indican que es originario del Mar Negro (Parra, 1998,184).

En Nariño se encuentra distribuido en la zona Norte del departamento, creciendo espontáneamente en los municipios de Buesaco, San José de Albán, San Bernardo, La Cruz y San Pablo (Muñoz, 1994, 21).

1.2 CLASIFICACION TAXONOMICA

Según Pérez (1956), citado por Muñoz (1994, 4), el Laurel de cera corresponde a la siguiente clasificación taxonómica:

División : *Spermatophita*

Subdivisión : *Angiosperma*

Clase: *Dicotiledonea*

Subclase: *Arquiclamídea*

Orden : *Myricales o Juglandales*

Familia : *Myricaceae o Amentacea*

Género : *Myrica o Morella*

Especie : *M. pubescens, M. Cerifera, M. Centeno*

Nombre vulgar: Laurel de Cera, Laurel, Roble, Olivo de Cera, Olivón.

1.3 DESCRIPCION BOTANICA

Muñoz (1993) citada por Muñoz (1994, 6) indica que en las fases iniciales de desarrollo, la raíz es de gran tamaño, pero cuando la planta alcanza una altura superior a los 30 cm se empiezan a desarrollar raíces laterales y superficiales en gran abundancia formando una red alrededor.

Presenta un tallo de color grisáceo y alcanza una altura de 3 a 4 metros (Pérez, 1956). Las ramas son pardas, muy angulosas, esparcidas, de gruesas lenticelas blancuzcas muy salientes, circulares o elíptico alargadas con una fosita media longitudinal y ramitas fuertemente tomentosas con pelos blancos erectos (Bernal y Correa, 1998, 21).

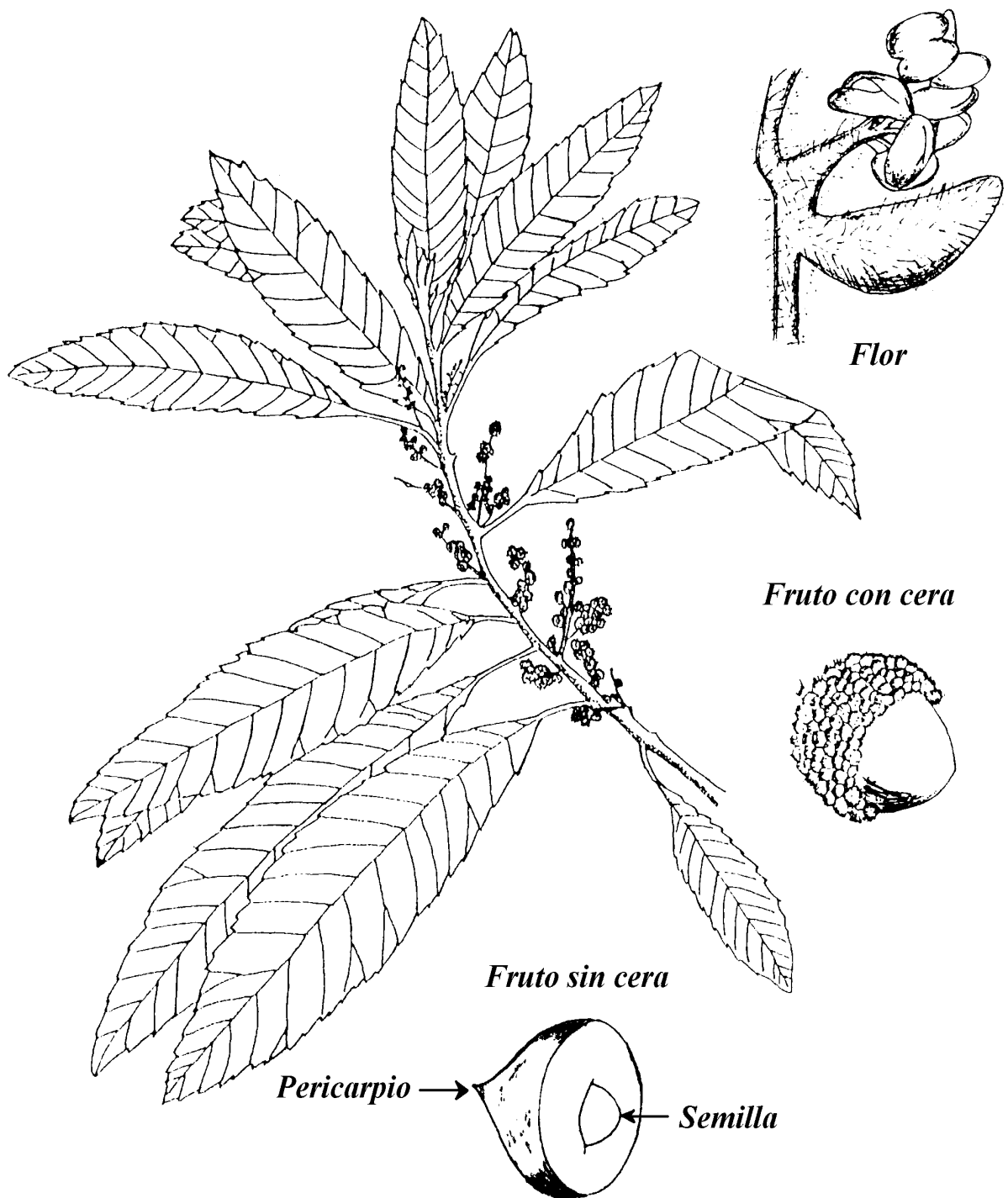
Sus hojas son de consistencia coriácea, lanceoladas, pubescentes por haz y envés, con borde dentado, limbo de color verde cenizo, base fuertemente cuneiforme, presenta glándulas vesiculares doradas llenas de un aceite esencial (Bernal y Correa, 1998, 21).

Las flores son unisexuales, muy pequeñas y dispuestas en amentos axilares sobre diferentes ramas de la misma planta. Las flores femeninas se disponen en el ápice del amento, en un número variado, carentes de corola y protegidas individualmente por una a tres bracteadas, ovario supero, pubescente, bicarpelar, unilocular, de color verde amarillento. Las flores masculinas se disponen en la base del amento en un número inferior a las flores femeninas, con cuatro a nueve estambres en un mismo verticilo, y protegidos individualmente por una bráctea triangular, las anteras presentan una coloración amarilla (Muñoz Lasso, 2000, 22).

La semilla presenta la radícula en forma triangular muy pequeña en la parte superior de esta y los cotiledones se observan en forma acorazonada. La cubierta de la semilla presenta una nerviación longitudinal acentuada de color café. Por no presentar endospermo, se considera una semilla no endospermatiza. Cuando alcanza el punto máximo de madurez fisiológica presenta en su superficie una capa granular de cera de color cenizo claro, de forma ovoide, coloración marrón y superficie rugosa. El diámetro promedio del fruto con cera es de 4,72 mm (Muñoz Lasso, 2000, 34, 81). (Figura 1).

El número de frutos por kg. es de 32.019, de los cuales el 40% es cera, 23% impurezas y 37% semillas (Mosquera y Muñoz, 1997).

Figura 1. Morfología del Laurel de Cera.



Fuente: Cuayal y Ramírez (1993, 265).

1.4 REQUERIMIENTOS AMBIENTALES

Herrera (1935) citado por Muñoz (1994, 5) anota que el Laurel de cera se desarrolla desde el bosque montano alto hasta el montano bajo, en altitudes comprendidas entre 1700 y 2900 msnm, es decir, entre clima cafetero y clima frío con temperaturas que oscilan desde los 16 a los 20 grados centígrados, obteniéndose los mejores rendimientos a temperaturas de 18 a 20 grados centígrados, siendo los suelos más apropiados para el cultivo del Laurel, los arcillo arenosos, sin exceso de humedad y con un subsuelo fácil para el crecimiento de la raíz.

1.5 PROPAGACION Y DESARROLLO

La propagación del Laurel de Cera se hace por semillas o brotes originados a partir de las raíces para plantarlos en grupos más o menos densos (Cuayal y Ramírez, 1993, 266).

Rodríguez y Peña (1984, 130) establecen que la fructificación es abundante y sus frutos son consumidos por aves silvestres como la torcaza (*Columba fasciata*), que diseminan las semillas activadas por endozoocría.

El mismo autor determina que el porcentaje de germinación en la propagación por semilla es muy bajo llegando hasta el 15 %, se inicia a los 35 días con un punto

máximo de energía germinativa a los 40 días para un periodo total de germinación de 60 días. El crecimiento de las plántulas es de un cm por mes.

Bravo, *et al.* (1987, 64), en un estudio que realizaron para evaluar la pregerminación de las semillas de Laurel, encontraron que a mayor período de inmersión en agua destilada es más rápida la velocidad de germinación, obteniéndose mayores porcentajes de emergencia a los 15 y 30 días.

En cuanto a la propagación vegetativa por estacas, en otro estudio realizado en la Universidad de Nariño, los resultados de prendimiento obtenidos fueron muy bajos encontrándose que para un total de 420 estacas, seis presentaron hojas (yemas brotadas) (1,4%), cinco estacas enraizadas (1,2%) y 378 estacas muertas que correspondieron al 90 % del material evaluado y las 31 estacas restantes (7,4%) no presentaron estructuras vegetativas, ni de crecimiento (Benavides y Rosero, 1999, 32).

Herrera y Tovar (2002, 54), en una evaluación para propagar esta especie por acodo aéreo, encontraron que se obtenía un alto porcentaje de prendimiento en árboles de 12 meses de edad en ramas secundarias y terciarias con una aplicación de AIB y ANA, utilizando Benomyl para evitar daños ocasionados por hongos y etanol para contrarrestar el efecto oxidante en el sitio de la herida, dándose mayor formación de follaje en un 57,5% y un prendimiento del 100% de las plantas endurecidas.

1.6 DEFINICION DE CULTIVO DE TEJIDOS

Se da por definición con el nombre genérico de “cultivo in vitro de tejidos vegetales”, al grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órganos) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski, 1993, 20).

La micropropagación se realiza a partir de porciones muy pequeñas de plantas tales como embriones, semillas, tallos, puntas de ramas, puntas de raíces, callo, células individuales y granos de polen (Hartman y Kester, 1981, 639).

Toda la metodología usada en el cultivo de tejidos vegetales se fundamenta en dos principios básicos: la “totipotencialidad celular”, propuesta por Gottlieb Haberland en 1902 y que se refiere a la capacidad que tienen las células vegetales de formar el cuerpo entero de la planta y la hipótesis del “balance hormonal”, sugerida por Skoog y Miller (1957), la cual señala la importancia del equilibrio entre las hormonas que regulan las actividades fisiológicas en cada órgano y en cada vegetal (Lindarte y Corzo, 1997, 18).

El tipo de patrón de crecimiento que se presenta depende del potencial genético de la planta así cultivada y del ambiente químico y físico a que está sometida la parte del vegetal (Hartman y Kester, 1981, 639).

1.7 CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES FORESTALES

El desarrollo práctico de programas de mejora genética en el campo forestal es considerablemente más complicado que su homólogo en el ámbito agrícola. Las características biológicas de los seres vivos con los que se trata, fundamentalmente su gran tamaño y su largo ciclo vital, condicionan en gran medida dichos desarrollos. Por otra parte, la tardanza en la aparición del sistema reproductivo del árbol y la vecería en la fructificación, presentan inconvenientes añadidos (Toribio, 1988, 321).

López (1993, 24) indica la dificultad que presentan las especies leñosas para ser propagadas in vitro por las siguientes razones:

- Las especies leñosas tienen una capacidad regenerativa relativamente débil.
- La investigación con árboles y arbustos fue iniciada más tarde.
- La intensidad de multiplicación es mucho más baja en especies leñosas.
- Las especies leñosas están más expuestas para ser afectadas por la excreción de sustancias tóxicas en el medio de cultivo.
- La esterilización es más difícil con plantas leñosas.
- La variación genética en árboles es generalmente mayor que en plantas agrícolas o cultivos hortícolas, dando muchos resultados variables.

1.8 MEDIO DE CULTIVO A UTILIZAR

El medio de cultivo es una base nutritiva que contiene macro y micro nutrientes inorgánicos, fuentes de carbono y nitrógeno y varios reguladores del crecimiento de plantas, solidificada con agar (Bu'lock y Kristiansen, 1991, 530), para iniciar, desarrollar o enraizar diferentes inóculos (López, 1993, 17).

Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en:

➤ **Sales inorgánicas.** Con el fin de optimizar las necesidades de plantas específicas, ha traído como consecuencia la formulación de varias mezclas salinas, de las cuales las de Murashige y Skoog (1962), han demostrado ser el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta. Esta fórmula contiene una gran cantidad de macronutrientes y una alta concentración de Nitrógeno (Hurtado y Merino, 1987, 67). (Tabla 1).

Los anteriores autores también indican que para una optimización de los requerimientos de sales se deben tener en cuenta las interacciones como las formas iónicas. Los requerimientos de un ion puede ser dependiente de la disponibilidad de otro. El nitrógeno puede ser agregado como NH_4^+ o NO_3 , aparentemente, la forma en que se suministra estimula la organogénesis, incluyendo la embriogénesis somática. El hierro se suministra en forma secuestrada, pues así se prolonga su disponibilidad.

TABLA 1. Composición del medio de cultivo de Murashige – Skoog (62).

MACRONUT.	mg/l	MICRONUT.	mg/l	VITAMINAS	mg/l
KNO ₃	1900	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	A. Nicotínico	1
NH ₄ NO ₃	1650	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	Piridoxina	1
KH ₂ PO ₄	170	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	Tiamina	10
KCl ₂ .2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6.2	Mio Inositol	100
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	KI	0.83		
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		
		Na ₂ EDTA	37.3		

Fuente: Hurtado y Merino (1987, 68) y SIGMA (1991, 62).

Bu'lock y Kristiansen (1991, 534) ponen de manifiesto que dentro de los macro y micronutrientes muchos pueden ser identificados como importantes cofactores en reacciones enzimáticas, por ejemplo el Mo para la nitrato reductasa o el Mg para muchas de las kinasas; otros son importantes en los procesos de transporte de

electrones, por ejemplo el hierro. Variaciones en el nivel de fosfato tienen un efecto marcado sobre el crecimiento y la productividad de los cultivos, pero existe poca información disponible sobre las interacciones precisas.

➤ **Fuente de Carbono.** La sacarosa es la fuente más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2 a 3 %. En ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12 %) (Hurtado y Merino, 1987, 70).

Está establecido que el azúcar es necesario para la formación de raíces adventicias, especialmente en el caso de plantas leñosas, con excepción de *Pseudotsuga menziesii*, que requiere bajas concentraciones de azúcar (López, 1993, 39).

Bu'lock y Kristiansen (1991, 534) precisan que las células de las plantas poseen invertasa en la pared celular, que juega un papel en la hidrólisis de la sacarosa a sus dos monómeros, glucosa y fructuosa, antes de entrar a la célula a través del plasmalema. El grado de hidrólisis varía dependiendo del origen de la línea celular, la velocidad de crecimiento y las condiciones generales del cultivo.

➤ **Vitaminas.** Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los

medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria, por conveniencia (Roca y Mroginski, 1993, 60) .

Steward et al., (1955) y otros autores citados por Roca y Mroginski (1993, 46) señalan que el uso frecuente del inositol en cantidades bastante altas (100 mg/l) se explica ampliamente por su presencia en gran cantidad en el suplemento del agua de coco que por sí sola o en combinación con otros compuestos estimula la división Celular.

➤ **Reguladores de crecimiento.** Rojas y Rovalo (1984, 205 - 216), afirman que las hormonas estimulan el desarrollo, pero este es uno de sus efectos y no su acción fundamental, la cual consiste en actuar sobre los ácidos nucleicos para reprimir o desreprimir genes.

Los mismos autores dicen que en cuanto a la auxina, su acción se fundamenta en la inducción del alargamiento de las células a bajas concentraciones pero a concentraciones que pasan del óptimo deprimen estos procesos, mientras que la citocinina produce una mayor actividad en la división celular, pero esta característica no es absoluta, pues así como la auxina tiene cierto efecto en la división, también la citocinina promueve un poco el alargamiento.

También anotan que estos efectos fundamentales determinan otros que son los realmente notorios en la práctica agrícola como son: la inducción de iniciación del crecimiento en los tallos y ramas y un efecto sobre la dominancia.

Según Hurtado y Merino (1987, 77, 96), en cultivo in vitro las auxinas son particularmente importantes para estimular la iniciación de raíces, y las citocininas promueven la formación de brotes. Frecuentemente los efectos entre auxinas y citocininas son antagónicos, una de las dos sustancias inhibe la acción de la otra. La eficiencia de ellas también depende de la auxina o citocinina de que se trate.

También afirman que puede ser requisito para una especie el suplemento de una auxina o un regulador de crecimiento relacionado; o requerir solo una citocinina o un suplemento, tanto de auxina como de citocinina, o bien, sólo responder en presencia de extractos de complejos naturales en el medio.

De acuerdo con Yeoman (1977), citado por los anteriores autores para obtener respuestas del explante en la propagación in vitro, estas dependen del tipo de auxina o regulador del crecimiento y de su concentración.

Skoog Snoww, Vasil y Hildebrandt, citados por Hartman y Kester (1978), en segmentos de tallo de tabaco demostraron que cuando la concentración de auxina es relativamente alta se favorece la formación de raíces adventicias, pero se impide la formación de yemas. De igual manera cuando otros constituyentes de la planta, adenina o cinetina, se encuentran a un nivel relativamente alto, se efectúa la formación de yemas, pero se suprime la de raíces (Benavides y Rosero, 1999, 37).

Los compuestos más frecuentemente usados son 2,4 – D (ácido 2,4 dicloro fenoxiacético) y ANA (ácido naftalenacético) en concentraciones molares de 10^{-7} M a 5×10^{-5} M. Estos compuestos son muy poco degradados por las células vegetales y son estables al autoclavaje (López, 1993, 68).

Las citocininas, como la cinetina o benziladenina (BA), usados en concentraciones de 10^{-7} a 10^{-5} M, son requeridas ocasionalmente con el 2,4 – D o ANA, para obtener buena formación de callos (López, 1993, 68).

El conjunto de efectos varía dramáticamente, pero el entendimiento es extremadamente limitado en lo que se refiera a la bioquímica y fisiología de estas sustancias por lo que su uso es esencialmente empírico (Bu'lock y Kristiansen, 1991, 534).

1.9 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO DE TEJIDOS

Dentro de los factores que se deben tener en cuenta al momento de establecer especies mediante la propagación in vitro están:

➤ **La edad del explante.** Es un factor crítico en las especies maderables (Bonga, 1982); en general la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles, y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes y maduros.

Sin embargo, aunque se haya delimitado la edad del material, el mejor explante se tiene que determinar experimentalmente (Roca y Mroginski, 1993, 137).

Según Toribio (1988, 326), la planta donante inicial juega un papel primordial, y en concordancia con el anterior autor, considera que la edad ontogénica del explante es decisiva, cuanto más próximo en el desarrollo se encuentre un tejido al embrión, mayor capacidad morfogénica exhibirá, añadiendo, que el estado fisiológico en el que se encuentra, puede variar las respuestas dependiendo de la época del año, e incluso el momento del día en el que se efectúe la recogida y también se debe tener en cuenta su genotipo pues se ha comprobado que determinadas líneas dentro de una especie pueden mostrar un mayor potencial regenerativo y que dicho potencial es heredable.

➤ **Balance hormonal.** El aporte hormonal externo en muchas ocasiones no conduce a la respuesta deseada. Esto es posible debido a una falta de acoplamiento óptimo con los niveles endógenos de reguladores de crecimiento, así como a una alteración en sus gradientes de distribución (Toribio, 1988, 331).

➤ **Condiciones de asepsia.** Bu'lock y Kristiansen (1991, 530) determinan que la superficie de los tejidos de las plantas encubren una abundante microflora y por ser el medio nutritivo un buen substrato para los microorganismos y que sobrepasan en crecimiento a las células de la planta, el proceso entero debe ser llevado a cabo bajo condiciones asépticas y antes de que la pieza de tejido del

explante sea transferida al agar, su superficie debe ser cuidadosamente esterilizada.

Recomiendan no insistir demasiado en la necesidad de la buena práctica aséptica y tener precaución en no exponer excesivamente los tejidos a los agentes esterilizantes, lo que puede resultar en efectos perjudiciales, particularmente para las superficies de las células y tejidos, y a su vez puede resultar en un descenso de viabilidad de las células y en dificultad de establecer un cultivo.

Dicen además, que una alternativa que se puede tener en cuenta para realizar el procedimiento, es incorporar antibióticos como estreptomycin y nistatina en el medio nutritivo, pero tales sustancias no sólo impiden la infección microbiana sino que también afectan el crecimiento y el metabolismo de los cultivos celulares.

En la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico y también resulta útil el uso de algún agente tensoactivo (tween – 20, del 0.01% al 0.1%) (Roca y Mroginski, 1993, 27).

De acuerdo con Pinzón (1984), citado por Castro y López (2000, 43), la inmersión del explante en hipoclorito de sodio al 2,5% durante 20 minutos no presenta oxidación ni muerte del tejido.

➤ **Condiciones de incubación.** Hughes (1981) citado por Toribio (1988, 328) manifiesta que los factores físicos como la luz (intensidad, longitud de onda y fotoperíodo), la temperatura (intensidad y termoperíodo), y el tamaño y forma de cierre de los envases de cultivo (que condiciona la presión parcial de los componentes de su fase gaseosa), intervienen en el tipo de crecimiento y desarrollo de los cultivos. En general, los cultivos in vitro se someten a bajas intensidades de luz (1000 – 2000 lux); éstas son suficientes para estimular la síntesis de carbohidratos (almidón).

En la mayoría de las especies estudiadas, las condiciones de luz continua inhiben la morfogénesis, utilizándose habitualmente fotoperíodos de 15 – 18 h. de luz y en cuanto a la temperatura, la óptima para producir morfogénesis varía con la especie. En plantas leñosas se ha descrito que para favorecer la rizogénesis se precisan temperaturas más bajas que para la inducción de caulogénesis, situándose las primeras entre los 15 y 20 °C y sobre los 25 °C las segundas (Toribio, 1988, 329).

Bu'lock y Kristiansen (1991, 535) también señalan que las células de las plantas muestran una baja tolerancia a las altas temperaturas. Por encima de 32 °C la viabilidad de los cultivos es muy reducida y la productividad decae marcadamente. La temperatura óptima para crecimiento parece ser aproximadamente 27 °C, aunque los cultivos crecen generalmente a una temperatura de 25 °C. Con las

células de plantas puede ser necesario proporcionar calor para mantener una temperatura óptima de operación.

➤ **pH del medio.** Los cultivos de tejidos de plantas pueden sobrevivir en un amplio rango de pH. Los pH iniciales de la mayoría de los medios son generalmente de 4 a 5,5; en ausencia de varios suplementos de crecimiento. En la mayoría de los casos se requiere ajustar el pH con una solución 0,01 ó 0,1 N de hidróxido de sodio. Normalmente, el ajuste del pH se hace a 5,5; 5,8; ó 6,3 (Roca y Mroginski, 1993, 27).

➤ **Liberación de etileno.** El etileno es uno de los posibles componentes que puede intervenir en los procesos de morfogénesis. Se ha constatado que se desprende por los tejidos vegetales como respuesta a la producción de alguna lesión, hecho frecuente por los cortes precisos para formar el explante inicial. El etileno favorece la formación de callo, y en cuanto a la inducción de tallos y raíces su papel es contradictorio (Toribio, 1988, 329).

El etileno se produce de modo natural por las plantas y tiene efectos hormonales en el curso normal del desarrollo; sin embargo, es un hecho que muchos tejidos que normalmente forman muy poco etileno, elevan la síntesis en 3 a 10 veces más si se les lacera, quema con ácidos o bases o se les sujeta a otra forma de estrés.

➤ **Taninos.** El nombre genérico tanino, se aplica a varios productos vegetales, tanto amorfos como cristalinos, obtenidos de diversas plantas, cuya fórmula molecular $C_{14}H_{14}O_{11}$, se considera por lo general como la del tanino común, siendo tan solo una aproximación.

Los distintos taninos tienen composiciones diferentes. Algunos, también llamados taninos condensados, son fenoles con una estructura moderadamente compleja, mientras que otros se componen de ésteres de glucosa, o de algún otro azúcar y ácidos trihidroxibenzoicos.

Estos compuestos se encuentran en muchos árboles, tienen un ligero olor característico y un color que va desde el amarillo al castaño oscuro. Presentan como propiedad química la rápida precipitación que se produce al mezclarlos con albúmina, con gelatina y con un buen número de sales alcaloideas y metálicas, además tienen la capacidad de transformar las proteínas en productos resistentes a la descomposición (Encarta, 2001).

➤ **Oxidación.** Algunas plantas, cuando se efectúa un corte, presentan el fenómeno conocido como “oxidación”, que consiste en la exudación de pigmentos de color castaño o negro, usualmente polifenoles y taninos, que a menudo impiden el crecimiento y desarrollo del explante (López, 1993,79).

La oxidación o fenómeno conocido como “browning”, consiste en una pérdida de clorofila, oscurecimiento de los tejidos y descenso brusco de su capacidad

organogénica, pudiéndose incluso producir su muerte. Se debe fundamentalmente a la emisión de sustancias fenólicas, que se liberan como consecuencia de los brotes (Toribio, 1988, 331).

Según Nair et al. (1999), el oscurecimiento de los tejidos del explante se debe a que la oxidación de polifenoles conduce a la formación de quinonas altamente tóxicas.

Rojas y Rovalo (1984, 220) indican que las plantas sintetizan muchos productos secundarios; estos compuestos son tratados en muchos textos bajo el rubro común de “inhibidores fenólicos”. Sin embargo, no todos tienen el anillo fenólico en su molécula y deben separarse en dos grupos bien caracterizados: química y fisiológicamente; los inhibidores fenólicos y terpenlactónicos. Es posible que en la planta existan ligados a moléculas proteicas o bien encerrados en vacuolillas, pero sin ser entonces funcionales en el metabolismo normal.

Además, determinan que la acción fundamental de los inhibidores fenólicos es, al parecer, disminuir la biosíntesis del AIA, tanto porque hay competencia enzimática en las vías de síntesis, como porque activan la AIA – oxidasa inactivando a la auxina. Como un efecto presentan síntomas de depresión de la respiración y del contenido hormonal de la planta.

Bu'lock y Kristiansen (1991, 527) ponen en claro que no todas las plantas tienen los mismos constituyentes y es normal encontrar metabolitos secundarios confinados a una familia particular de plantas o únicos a una especie particular.

Este fenómeno se logra apreciar al momento de realizar la propagación in vitro de especies leñosas de importancia económica como las realizadas en frutales caducifolios Ciruelo (*Prunus domestica*), Durazno blanco común (*Prunus persica*), en palmas como la conocida en nuestro medio con el nombre de Chontaduro (*Bactris gasipaes*), Palma de Coco (*Cocus nucifera*), en estudios realizados por sus respectivos autores (Pacheco, 1989), (Pachón, G. y Bridg. H., 1993), (Stein y Stephens, 1991), (Nair *et al*, 1999).

En general, las plantas bajo estrés muestran una mayor concentración del ácido abscísico y etileno y menor de citocinina que la planta normal (Rojas y Rovalo, 1984, 216).

1.10 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA OXIDACION

Para evitar la oxidación se han usado agentes adsorbentes de fenoles como el Polivinyl pirrolidona, antioxidantes como el ácido ascórbico, dietil ditiocarbamato sódico, etc. (Toribio, 1988, 331).

López (1993, 80) recomienda usar el ácido cítrico en 150 mg/l y ácido ascórbico en 100 mg/l, tiourea y á – cistina para prevenir la acción de fenoles; carbón activado de 0.2 a 3 % (p/v); Polivinyll pirrolidona, polímero que absorbe sustancias parecidas al fenol, de 250 a 1000 mg/l, y propone también reducir la concentración de sales en el medio de cultivo.

Fridborg et al. (1978) citado por Hurtado y Merino (1987) expresa que el carbón activado se ha usado para superar problemas específicos de oxidación. La adición de esta sustancia a los cultivos embriogénicos promueve su desarrollo cuando este ha sido inhibido, ya que al parecer absorbe del medio los compuestos fenólicos y con relación a la cantidad que se debe incorporar al medio, Roca y Mroginski (1993, 33), proponen usar de 0.1% a 5% resultando también ser útil incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz.

El carbón activado por presentar la propiedad anteriormente mencionada, tiene como inconveniente de acuerdo con López (1993, 40) la absorción de todos los compuestos orgánicos con excepción de azúcares lo que es confirmado por Weatherhead et al. (1978), citados por Stein y Stephens (1991, 198) quienes sostienen que este compuesto puede absorber auxinas del medio de cultivo, disminuyendo de esta manera su efectividad en la iniciación del callo, y en algunos casos haciéndolas completamente indisponibles.

Nair *et al.* (1999) consideran que la adición de carbón activado en el medio nutritivo resulta ser beneficioso, pero solo eso no es suficiente por lo que sugieren los siguientes procedimientos para reducir la oxidación:

- Pretratamiento de los explantes en agua destilada con medio antioxidante.
- Precultivo de explantes en un medio que contenga adsorbentes de fenoles como el Polivinyl pirrolidona.

1.11 CULTIVO DE MERISTEMOS

La gran importancia de los meristemas de la planta, se encuentra en las células, pues éstas son altamente diferenciadas, además que el meristemo da origen a diversos tipos de células, tejidos y órganos para formar una planta completa (Hurtado y Merino, 1987, 133).

También afirman, que en los primeros estadios del desarrollo embrionario vegetal, la división celular tiene lugar en todo el organismo, pero a medida que el embrión se desarrolla y se transforma en una planta adulta, la adición de nuevas células se restringe a ciertas partes de la misma, mientras que el resto de la planta se especializa en otras actividades específicas. Estos grupos de células que retienen su actividad embrionaria durante toda la vida de la planta, son los meristemas.

Según Toribio (1988, 323), todos los materiales que se introducen “In vitro”, quedan libres de organismos que pudieran existir en su superficie. Si además se parte de meristemos en los cultivos iniciales, se pueden obtener células o tejidos cultivados, libres de toda posible contaminación interna. La controversia de por qué los meristemos no se encuentren contaminados, aún permanece, pero la idea más generalizada parece ser que el hecho de que estos tejidos estén libres fundamentalmente de virus, radica en que no se encuentran conectados vascularmente con el resto de la planta, siendo por esa vía por la que se propagarían los microorganismos.

De acuerdo con Lindarte y Corzo (1997, 20), los explantes de yemas terminales o axilares, pueden proceder de:

- El domo apical, es decir, del extremo superior del meristema apical del vástago, túnica, sin primordios foliares.
- Apice meristemático (Meristem tip), que incluye la región meristemática subapical o corpus con dos primordios foliares.
- Apice del retoño (Shoot tip) o zona meristemática con varios primordios foliares hasta dos centímetros de longitud. En algunas ocasiones se puede llamar yema al “ápice del retoño”.

Lindsey y Jones (1989, 18) describen que cuando un tejido sufre un daño físico, las células viables de la zona de la lesión comenzarán a dividirse como respuesta a la lesión y cuando ésta se cierre, las divisiones cesarán. Si se aíslan los tejidos lesionados del resto de la planta y se mantienen en un medio nutritivo artificial, los mecanismos reguladores naturales que limitan el número de divisiones celulares se desbordan y la proliferación del callo continuará mientras se aporten los nutrientes y reguladores del crecimiento adecuados.

1.12 CULTIVO DE NUDOS

El cultivo de nudos es el aislamiento de una yema junto con un pedazo de tallo, se utiliza con el propósito de formar un tallo, permitiendo a la yema que se desarrolle. La yema puede ser axilar o terminal. Cuando a la yema, junto con el nudo, se la coloca en un medio nutritivo en condiciones asépticas y se le permite desarrollarse, produce yemas axilares que se forman en las nuevas hojas (López, 1993, 45).

2. DISEÑO METODOLOGICO

2.1 LOCALIZACION

El presente estudio se realizó, en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Nariño, adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas, en la ciudad de Pasto, localizado a una altura de 2.540 msnm, presentando condiciones ambientales como: 25 °C de temperatura, 75% de humedad relativa y 2.000 lux de intensidad lumínica (sala de incubación).

2.2 SELECCION Y DESINFECCION DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas germinadas de vivero procedentes de la Corporación Regional de Nariño CORPONARIÑO situada en la Finca Lope en el municipio de Pasto, reunían condiciones como: presentar un tamaño de 10 cm de altura, que no tuvieran síntomas de enfermedad, buen estado nutricional, características fenotípicas aceptables, es decir que no mostraran deformaciones de tallo y hojas, y sin presencia de daños mecánicos, ni ocasionados por plagas (Figura 2).

Este material se seleccionó cuidadosamente en el laboratorio después de ser traído del vivero, efectuando una limpieza por medio de lavado con abundante

agua de grifo para eliminar las partículas de polvo que pudiera contener.

Figura 2. Plántulas de Laurel de Cera para la obtención de explantes.



Se ensayaron dos métodos de desinfección en concentraciones y tiempos que determinaran cual era el más eficiente y que a su vez no causara toxicidad ni contribuyera de algún modo a la oxidación que se presenta en esta especie.

Uno de los métodos de desinfección empleado, se basó en investigaciones realizadas en propagación in vitro de especies forestales como el que se llevó a

cabo en la Universidad de Nariño, en Pino Colombiano (*Podocarpus oleifolius* var. *Macrostachyus*) y en el otro método se cambio el producto bactericida – fungicida para probar con una solución que emplea una menor concentración para prevenir la contaminación sin afectar el material vegetal.

Las concentraciones de las soluciones desinfectantes se ensayaron de la siguiente manera:

➤ Método de Desinfección A:

- Jabón tipo hospitalario al 2,5%.
- Cloruro de Benzalconio al 2,5%.
- BENLATE al 0,2%.
- Etanol 70%.
- Hipoclorito de sodio al 2,5%.

Los tiempos de inmersión del material vegetal se ensayaron de igual manera para ambos métodos de desinfección como se describirá a continuación.

➤ Método de Desinfección B:

Se utilizaron las soluciones en las mismas concentraciones que en el método de desinfección A, probando esta vez con una solución concentrada de yodo

AGRODINE que se aplicó en una concentración de 0,15% durante cinco minutos, al que finalmente se le hizo cinco enjuagues con agua destilada.

Este producto bactericida - fungicida AGRODINE corresponde a una solución concentrada de yodo Polietoxi, Polipropoxi, Polietoxi Etanol, recomendado para este tipo de labores, la cual causa la oxidorreducción de la pared celular de los organismos patógenos, controlando las formas perfectas e imperfectas de hongos y bacterias, destruyendo las estructuras reproductivas con las que entra en contacto y cuyo modo de acción no crea resistencia.

De acuerdo a estos métodos se siguió el proceso eliminando las hojas, cortando los pecíolos cerca de las yemas sin dañarlas, dividiendo el tallo en secciones. Estas secciones se sumergieron en la solución jabonosa al 2,5%, con tres gotas de Tween 20 que se utiliza para bajar la tensión superficial de los agentes esterilizantes y permitir una mayor superficie de contacto, durante un período de 10 minutos, con agitaciones periódicas, pasado este tiempo se realizaron cinco lavados con agua destilada.

En la solución de Cloruro de Benzalconio al 2,5%, con cinco gotas de Tween 20, durante cinco minutos, tiempo de acción suficiente para eliminar muchos agentes patógenos, se introdujo nuevamente el material vegetal con agitaciones periódicas, haciendo posteriormente cinco enjuagues con agua destilada, dejándolo con el último lavado.

En la sala de disección y siembra, bajo condiciones asépticas se completó el proceso de desinfección del material vegetal preparándolo para efectuar la siembra. En este proceso se utilizó primero alcohol de 70% durante 20 segundos, realizando cinco lavados con agua destilada estéril, luego se pasó a una solución de Hipoclorito de Sodio al 2,5%, más 3 gotas de dispersante Tween 20, durante 20 minutos tiempo necesario para asegurar la desinfección del material vegetal y sin causar oxidación ni daño a los tejidos vegetales; al cual finalmente se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril para retirar el Hipoclorito sobrante, dejándolos con el último lavado.

2.3 SOLUCION STOCK Y MEDIO DE CULTIVO

Se preparó una solución stock con la composición salina de Murashige Skoog (62), la cual se llevó a una mayor concentración, con el fin de tener una buena cantidad y así disponer de ella cada vez que se necesitara repetir los ensayos y elaborar así el medio de cultivo de acuerdo con el volumen que se requería para el propósito del estudio.

Para distinguir cada una de las soluciones, las cuales correspondieron a solución de macronutrientes, micronutrientes, solución de yodo y solución de hierro, se designaron con las letras A, B, C, D, respectivamente y se almacenaron en recipientes que no permitieran el paso de la luz, rotulándolos para anotar la fecha

de preparación y finalmente mantenerlas bajo refrigeración para su conservación (Tabla 2).

TABLA 2. Cantidades empleadas para la preparación de la solución stock con la composición salina de Murashige & Skoog (62).

SOLUCION	A	B	C	D
CONCENTRACION	10 X	100 X	200 X	10 X
VOLUMEN (ml.)	1000	100	100	100
COMPONENTES	KNO ₃	MnSO ₄ .4H ₂ O	KI	FeSO ₄ .7H ₂ O
	NH ₄ NO ₃	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Na ₂ EDTA	
	KH ₂ PO ₄	H ₃ BO ₃		
	KCl ₂ .2H ₂ O	CuSO ₄ .5H ₂ O		
	MgSO ₄ .7H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O		
		Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O		

Fuente: SIGMA (1991, 62).

De las soluciones stock de macro y micronutrientes, se tomaron las cantidades necesarias de acuerdo al volumen de medio que se fuera a preparar, las cuales se mezclaron con vitaminas como Acido nicotínico (1 mg/l), Piridoxina (1 mg/l), Tiamina (10 mg/l) y Mio inositol (100 mg/l), las cuales se diluyeron en agua destilada, proceso que se llevó a cabo en una plancha de agitación magnética con calentamiento.

Todos los materiales se pasaron a través de papel filtro y luego se agregó directamente la sacarosa al 3%, para finalmente llevar al volumen deseado con agua destilada.

Como uno de los objetivos era tratar de superar el fenómeno de oxidación, para la preparación del medio de cultivo se tomó de la Solución Stock las cantidades necesarias de acuerdo al volumen que se iba a preparar agregando de acuerdo al tratamiento, el tipo de antioxidante que se fuera a suplementar, adicionando también hormonas para observar las respuestas dadas por el explante para determinar las cantidades y tipos de reguladores que se fueran a utilizar.

El pH se ajustó a 5.7 con NaOH 0,5 – 1 N o en su defecto con HCl 0,5 N – 1 N.

Terminado el procedimiento, se puso el medio en una olla a presión para disolver el agar (material de soporte), al 0,6%, para que por calentamiento se mezcle homogéneamente.

Se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 125 ml, previamente lavados, esterilizados en autoclave y rotulados con el tipo de tratamiento, en los que se dispensaron alícuotas de 10 ml de medio que luego se taparon con papel aluminio.

2.4 ESTERILIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO, INSTRUMENTAL Y CRISTALERIA

El proceso de esterilización del medio de cultivo, se realizó en autoclave a una presión de 15 psi., a 121 °C, durante 15 minutos, quedando listos para realizar la siembra de los explantes o almacenarlos en condiciones ambientales adecuadas para su mantenimiento.

De igual manera se realizó la esterilización de instrumental como pinzas, mangos de bisturí, que se envolvieron en papel aluminio, agua destilada, beakers, pipetas, y todo aquello que se fuera a utilizar al momento de realizar las operaciones en la cámara de flujo laminar de la sala de siembra.

2.5 SIEMBRA DE EXPLANTES

El estudio se llevó a cabo con dos tipos de explantes; en primera instancia se sembraron ápices meristemáticos de yemas axilares con dos primordios foliares, que se tomaron con escalpelo, colocándolos en todo el centro de la unidad experimental, haciendo coincidir la base del explante con la superficie del medio.

Este tipo de explante se usó para observar la respuesta de estos a la aplicación de soluciones antioxidantes de ácido cítrico y ascórbico y con Polivinyl pirrolidona.

Dentro del estudio también se consideró trabajar con otro tipo de explante, eligiendo nudos para poder apreciar con más detalle el fenómeno de oxidación por el cual no se puede obtener resultados de organogénesis, ya que el tamaño y desarrollo de sus tejidos permiten observar este proceso y las respuestas expresadas por el explante de acuerdo a las condiciones del medio de cultivo.

La preparación de los explantes, se realizó en la sala de siembra que cuenta con una cámara de flujo laminar dotada de extractores y de una lámpara de luz ultravioleta que se encendió 24 horas antes para mantener esterilizada el área de trabajo.

Transcurrido este tiempo, se apagó la luz ultravioleta y esperó por quince minutos antes de ingresar a la sala.

A la cámara de flujo laminar se le realizó una desinfección con hipoclorito de sodio y etanol al 90% que se recomienda por no dejar películas de agua en las superficies a limpiar, de esta manera quedó completamente esterilizado el lugar.

Para la extracción de los meristemas, la disección se llevó a cabo con ayuda de un estereoscopio, que también debía reunir las condiciones de asepsia, dentro de la

cámara de flujo laminar para luego llevarse a cabo la siembra.

De la misma forma se siguió este procedimiento para la obtención de nudos, los cuales se prepararon eliminando las hojas sobrantes dejando expuesta la yema, haciendo un corte en forma de bisel en la base del explante para asegurar el establecimiento de estos en el medio, colocándolos en forma perpendicular.

Se tuvieron en cuenta las normas de asepsia, para evitar cualquier tipo de contaminación, como mantener las manos limpias con alcohol de 90%, después de lavarse con jabón tipo hospitalario, usar bata y tapabocas limpios, flamear las bocas de los frascos y las tapas antes de realizar la siembra al igual que el instrumental metálico a utilizar, sellando finalmente, los frascos con plástico adhesivo para finalmente ser llevados a la sala de incubación.

2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Debido a que el Laurel de Cera es una especie en la que se están iniciando investigaciones en propagación in vitro y que presenta oxidación que no permite el establecimiento de los explantes, al comienzo de este estudio como un ensayo exploratorio se llevo a cabo un diseño DIA con tres tratamientos hormonales y 20 repeticiones, probando diferentes concentraciones hormonales utilizando ANA (Acido Naftalenacético) como auxina y Cinetina como citocinina (Tabla 3), utilizando meristemos como explantes y como testigo el medio básico.

TABLA 3. Tratamientos hormonales empleados en la primera fase del estudio.

Tratamiento	Auxina (ANA) (ppm)	Citocinina (CIN) (ppm)
T _A	0	0
T _B	0.02	2
T _C	0.2	0.2
T _D	2	0.02

En este ensayo se siguió como método de desinfección el que emplea como producto bactericida – funguicida BENLATE y para la prevención de la oxidación se uso la solución de ácido cítrico (150 mg/l) y ácido ascórbico (100 mg/l) conjuntamente, aplicada en forma sistémica 24 horas antes de la siembra, con incubación bajo condiciones de luz.

En una segunda siembra, para probar la efectividad en el control de la oxidación utilizando meristemas como explante, y poder comparar entre dos soluciones antioxidantes una de las cuales correspondió a la ensayada en la siembra anterior, se probó con otro producto Polivinyl pirrolidona (250 mg/l), aplicado en forma sistémica durante un periodo de 24 horas, las cuales se tomaron como tratamientos cada uno con quince repeticiones, siguiendo el mismo procedimiento

utilizado en la siembra anterior, en cuanto a desinfección del material vegetal, forma de incubación y utilizando los mismos reguladores de crecimiento en una concentración de 0.02 ppm de Auxina y 2 ppm de Citocinina.

Para observar con más detenimiento el proceso de oxidación se empleó otro tipo de explante, esta vez con nudos, como un ensayo previo, a la siembra definitiva, con aplicación de Polivinyl pirrolidona en concentraciones y tiempo de inmersión del material vegetal como se venía desarrollando en las siembras anteriores, esta vez probando dentro del método de desinfección el producto bactericida – funguicida AGRODINE.

Dentro del mismo ensayo se probó a la vez dos tipos de auxinas ANA y 2,4 – D en 0,03 ppm, de manera independiente y en interacción de cada tipo de auxina con Cinetina en una proporción de 3 ppm para observar el comportamiento de los explantes ante la aplicación de otro tipo de auxina, en combinación con la composición salina de Murashige Skoog (62), con incubación bajo condiciones de luz, dando como resultado dos tratamientos con quince repeticiones, para un total de 30 unidades experimentales.

En la siembra final aplicando un Diseño Irrestrictamente al Azar se llevaron a cabo 6 tratamientos antioxidantes con 15 repeticiones cada uno, en donde las unidades experimentales estaban representadas por frascos de vidrio ya descritos, sembrándose un explante por unidad.

Se utilizó como medio básico el de Murashige Skoog (62), suplementado con hormonas como el 2,4 – D y CIN como citocinina con las mismas concentraciones de la siembra previa, con incubación bajo condiciones de luz a excepción del tratamiento donde se utilizó carbón activado para probar la respuesta de los explantes bajo condiciones de oscuridad.

Los tratamientos para prevenir la oxidación fueron:

➤ **Tratamiento 1.** Aplicación de solución de ácido cítrico y ascórbico en forma sistémica.

Antes de realizar la desinfección del material vegetal, este se colocó en inmersión en una solución antioxidante que contuviera conjuntamente ácido cítrico (150 mg/l) y ácido ascórbico (100 mg/l), como método preventivo, durante 24 horas, siendo transportado por el sistema radicular a través de los haces vasculares para llegar a las diferentes partes de la planta, con el objeto de que cuando se hiciera el corte no se presentará la oxidación.

➤ **Tratamiento 2.** Aplicación de Polivinyl pirrolidona en forma sistémica.

Se ensayó con otra solución antioxidante Polivinyl pirrolidona (polímero que absorbe sustancias parecidas al fenol) que se agregó en una concentración de 250 mg/l, siguiendo la misma metodología empleada con la otra solución

antioxidante para el tratamiento del material vegetal.

- **Tratamiento 3.** Aplicación de Polivinyl pirrolidona como suplemento al medio de cultivo utilizado para el control de la oxidación.

Al medio de cultivo Murashige Skoog (62), se adicionó Polivinyl pirrolidona en 250 mg/l, como método de control de la oxidación para el establecimiento de los explantes.

- **Tratamiento 4.** Reducción de la concentración salina en el medio de cultivo.

La concentración salina del medio de cultivo se redujo a la mitad de la proporción establecida.

- **Tratamiento 5.** Incubación de explantes con carbón activado al 1% bajo condiciones de oscuridad y transplante a medio Murashige Skoog sin carbón activado.

Se probó con diferentes dosis de carbón activado al 0.1 %, 1%, 2% y 3% suplementado al medio de cultivo Murashige Skoog (62), como absorbente de emisión de sustancias tóxicas al medio de cultivo, para el control de la oxidación, incubando los explantes bajo condiciones de oscuridad.

Después de una semana de incubación de los explantes bajo condiciones de oscuridad, se transfirieron a un medio de cultivo Murashige Skoog (62) sin carbón activado, y luego se incubaron bajo condiciones de luz.

➤ **Tratamiento 6.** Incubación de explantes con carbón activado al 1% bajo 2000 lux de intensidad lumínica

Se sembraron los explantes en un medio de cultivo Murashige Skoog (62) suplementado con carbón activado al 1%, sin transferirlos a un medio de cultivo sin carbón activado, incubándolos bajo condiciones de luz (Figura 3).

2.7 VARIABLES EVALUADAS

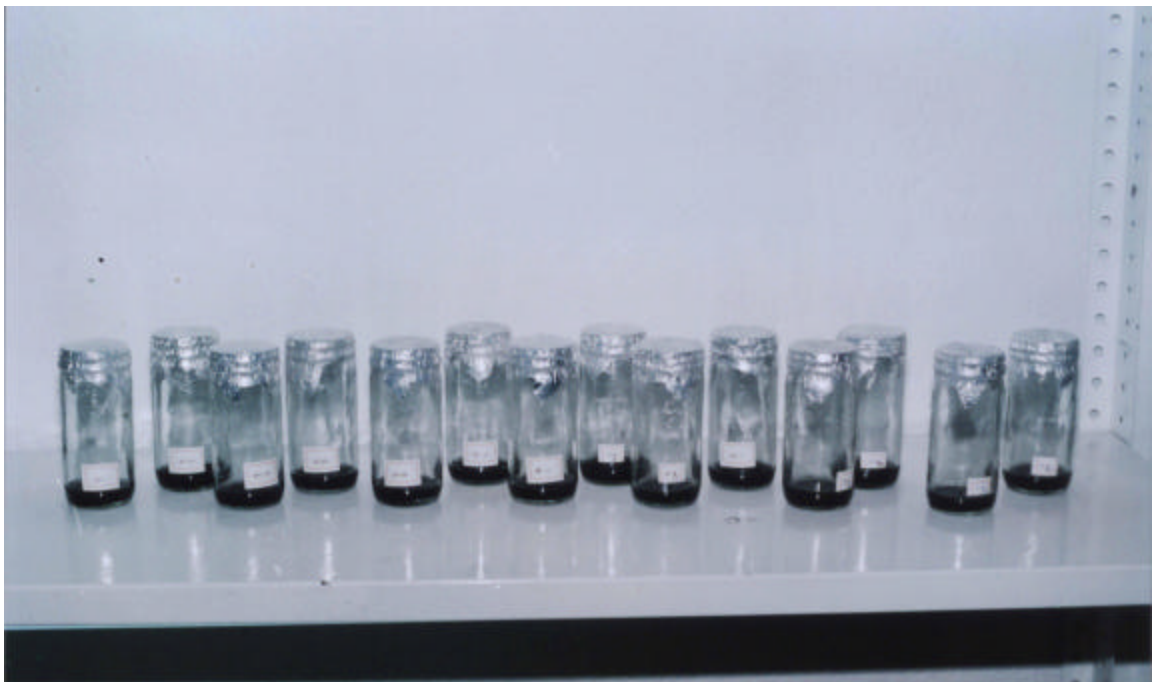
➤ **Porcentaje de contaminación.** Este se evaluó con base al número de unidades experimentales contaminadas, para determinar la efectividad en el proceso de desinfección del material vegetal y así establecer el método con el que se pudiera obtener mejores resultados.

➤ **Porcentaje de oxidación.** Para obtener este porcentaje se tuvo en cuenta el número de explantes que manifestaron síntomas de oxidación.

➤ **Porcentaje de prendimiento.** Este se obtuvo de acuerdo al número de explantes que presentaron estructuras vegetativas.

➤ **Porcentaje de mortalidad.** La mortalidad se determinó con el número de explantes que presentaron necrosamiento total del tejido.

Figura 3. Medio de cultivo con la composición salina de Murashige Skoog (62), suplementado con carbón activado para el control de la oxidación.



3. RESULTADOS Y DISCUSION

Con el presente estudio se pretendía evaluar medios de cultivo, mediante la aplicación de un diseño DIA, ensayando diferentes tipos de reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones con las que se pudieran observar resultados, pero debido a la respuesta negativa en el comportamiento de los explantes por causa de la oxidación, el procedimiento se encamino a buscar la forma de evitar este impedimento, razón por la cual a través del estudio solo se trabajo con la formulación de Murashige Skoog (62), que se tomo como medio básico, para determinar las posibles causas que conllevan a este fenómeno, razón por lo cual no se ensayo con otra composición salina.

3.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE DEL ESTUDIO

En la evaluación que se hizo siete días después de la siembra, para observar el comportamiento de los explantes ante la aplicación de la solución antioxidante con ácido cítrico – ascórbico y los tratamientos hormonales con ANA y CIN con 20 repeticiones, el porcentaje de contaminación más alto se presentó en el T_C (2 ppm ANA, 0.02 ppm CIN) con un 95 % y la menor contaminación se dio en los tratamientos T_A(0.02 ppm ANA, 2 ppm CIN) y T_B (0.2 ppm ANA, 0.2 ppm CIN) en un 15 % (tabla 4).

TABLA 4. Porcentaje de contaminación, necrosamiento y formación de callo en la primera fase del estudio.

TRATAMIENTOS	CONTAMINACIÓN (%)	FORM. DE CALLO (%)	NECROSAMIENTO (%)
T _A	35	0	65
T _B	15	10	85
T _C	15	0	85
T _D	95	0	5
PROMEDIO	40	5	60

En cuanto a formación de callo a los quince días de la siembra inicial solo dos unidades experimentales del T_A que representaron el 10 %, dieron respuesta, lo que indica que esta concentración hormonal genera respuestas de embriogénesis.

Con relación a los demás explantes todos presentaron oscurecimiento en forma inmediata, es decir a las pocas horas de haberse realizado la siembra.

Este resultado indica que la aplicación del antioxidante ácido cítrico – ascórbico no pudo controlar efectivamente la oxidación y aquellos meristemos que pudieron

mantenerse hasta llegar a la etapa de formación de callo no lograron completar un desarrollo normal ya que su crecimiento se detuvo presentando además síntomas que se manifestaron mediante la aparición de pigmentos de color castaño que llevaron al oscurecimiento en forma progresiva hasta cubrir totalmente el explante provocando el necrosamiento del tejido.

En la segunda siembra con meristemas donde se probó otra solución antioxidante Polivinyl pirrolidona también se presentó perdida total de los explantes por oxidación inmediata que condujo al necrosamiento, no permitiendo la formación de estructuras embriogénicas.

Esto se puede explicar de acuerdo a López (1993), a que cuando se produce la oxidación esta se manifiesta mediante la exudación de pigmentos de color castaño o negro, fenómeno que se debe usualmente a la acción de polifenoles y taninos, cuya emisión se libera como consecuencia de los brotes (Toribio, 1998), y que a la vez conducen a la formación de quinonas altamente tóxicas (Nair et al, 1999), lo que conlleva a una pérdida de clorofila, oscurecimiento de los tejidos y descenso brusco de su capacidad organogénica, produciéndose finalmente la muerte (Toribio, 1998).

También se puede considerar de acuerdo a Rojas y Rovalo (1984), la posibilidad de que inhibidores fenólicos existan en la planta ligados a moléculas proteicas o bien encerrados en vacuolillas, pero sin ser entonces funcionales en el

metabolismo normal a lo que se puede añadir según lo expuesto por Bu'lock y Kristiansen (1991), que es normal encontrar metabolitos secundarios confinados a una familia particular de plantas o únicos a una especie particular como puede ser en este caso.

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SIEMBRA CON NUDOS

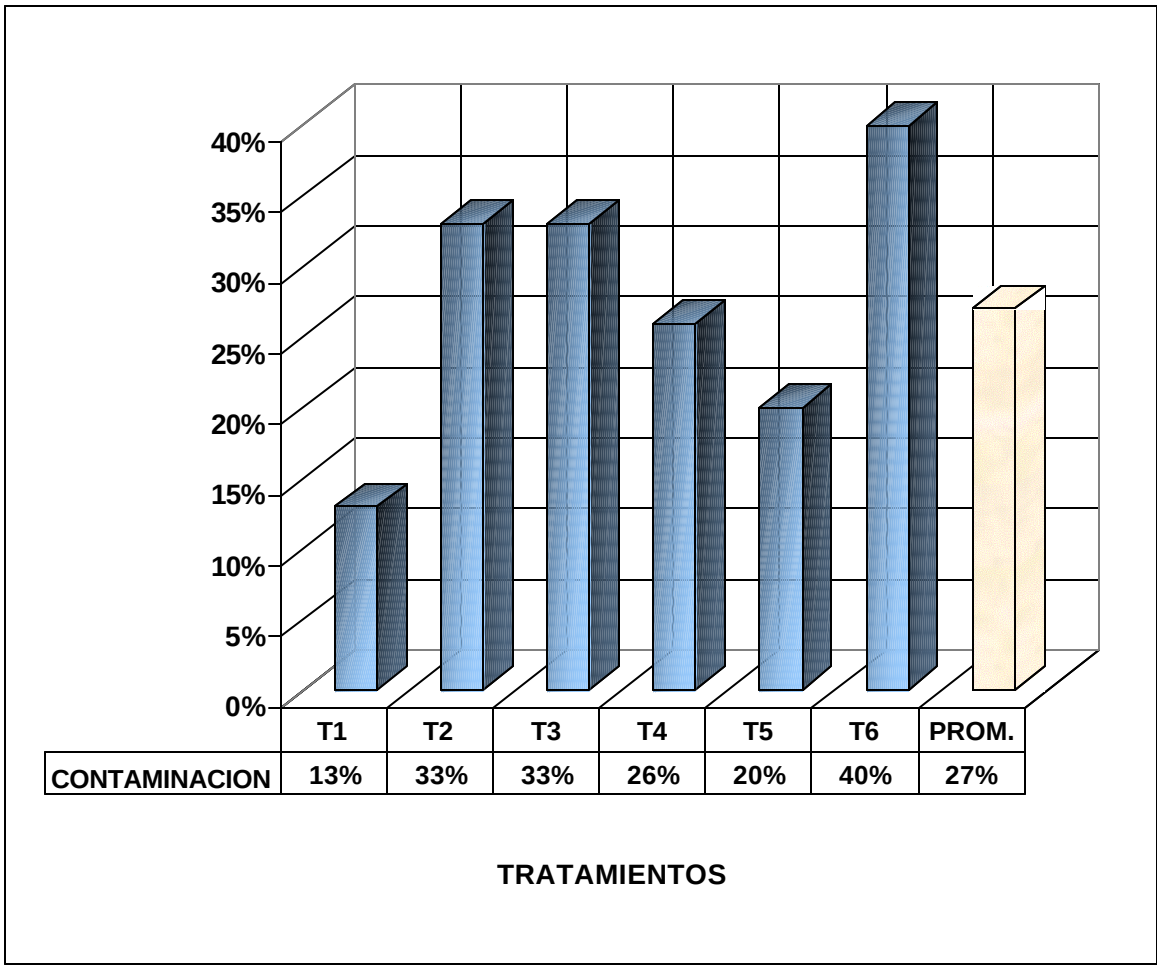
Debido a la alta contaminación que se presentó en la siembra de meristemos, se ensayo en el proceso de desinfección del material vegetal el producto AGRODINE para poder observar su efectividad en una siembra previa que se realizó con nudos.

Los resultados obtenidos fueron positivos, ya que la mayoría de unidades no presentaron contaminación, indicando que se puede llevar a cabo la preparación del material vegetal usando este método de desinfección.

En la siembra final con nudos aplicando este método, los resultados presentaron un bajo porcentaje, dándose el menor resultado en el Tratamiento uno con el 13.33% y el mayor porcentaje en el Tratamiento seis con el 40%, con un promedio total del 27.78 %, lo que confirma la efectividad de este método de desinfección en este tipo de explante en el cual resulta aún más difícil controlar esta variable por las condiciones que presenta este, ya que debido a la formación de estructuras

vegetativas existe mayor probabilidad de albergar microorganismos que puedan escapar al proceso de desinfección (Figura 4).

Figura 4. Porcentaje de contaminación en siembra con nudos.



3.2.1 Porcentaje de oxidación, prendimiento y mortalidad

Debido a la pérdida de la mayoría de unidades experimentales por los inconvenientes de oxidación que condujeron al necrosamiento y posterior muerte de tejido, no se pudo aplicar el análisis estadístico a través de un ANDEVA con la prueba de significancia que correspondiera, ya que no se obtuvieron los datos necesarios para entrar a evaluar las variables propuestas y las respuestas que se dieron se presentaron en un número reducido, por lo que los resultados obtenidos se expresaron únicamente en porcentajes.

En una siembra previa al ensayar con la auxina 2,4 - D, los nudos presentaron formación de hojas lo que llevo a ensayar con esta hormona en la siembra final.

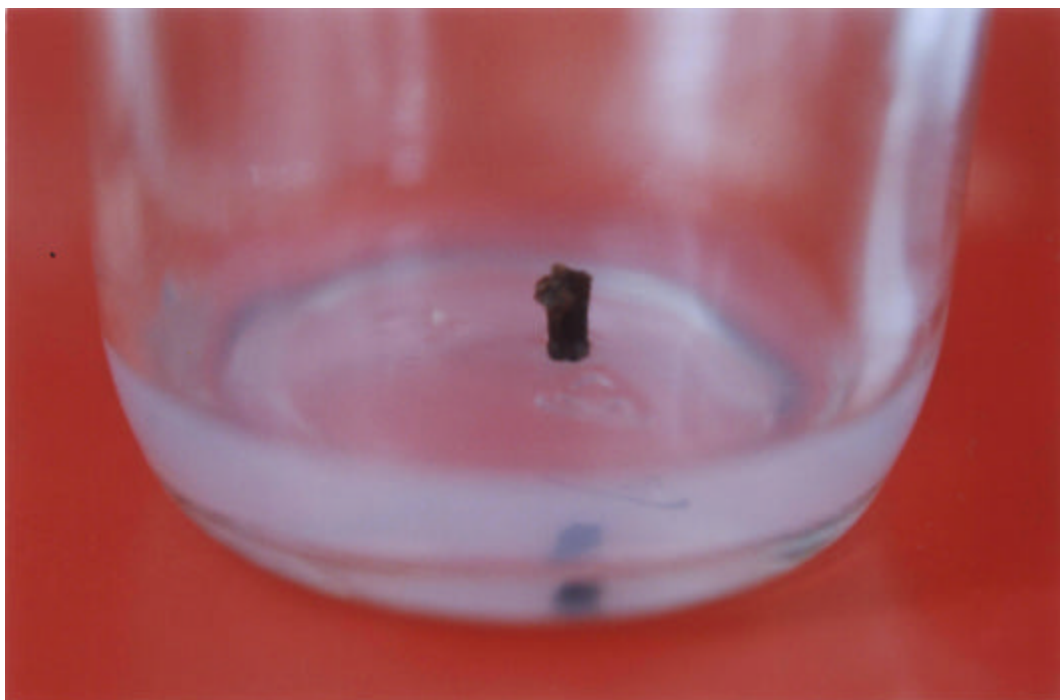
De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 5) en la siembra de nudos con la aplicación de los tratamientos antioxidantes, (aplicación de las soluciones ácido cítrico – ascórbico y Polivinyl pirrolidona en forma sistémica, Polivinyl pirrolidona incorporado al medio de cultivo, reducción de la concentración salina y carbón activado en diferentes concentraciones con incubación bajo condiciones de oscuridad y posterior transferencia al medio básico con incubación de 2000 lux de intensidad lumínica), se presentó oxidación de los nudos, manifestándose síntomas de oscurecimiento de los tejidos en la base de los explantes que cubrieron paulatinamente todo el tejido hasta eliminarlo completamente (Figura 5).

Tabla 5. Porcentaje de Oxidación, Prendimiento y Necrosamiento utilizando nudos como explante.

TRATAMIENTOS	OXIDACIÓN %	PRENDIMIENTO %	NECROSAMIENTO %	N
T ₁	86.67	0	86.67	13
T ₂	66.67	0	66.67	10
T ₃	66.67	66.67	66.67	10
T ₄	73.34	0	73.34	11
T ₅	80	0	80	12
T ₆	0	28.57	0	4
PROMEDIO	62.23%	15.87%	62.23%	

Es necesario aclarar que de acuerdo a estos resultados, en todos los tratamientos la manifestación de la oxidación causo simultáneamente el necrosamiento de los explantes ocasionando la perdida en su totalidad, así se haya logrado o no la formación de brotes, a excepción del T₆ donde se dio una respuesta favorable, ya que no se presento oxidación, se generó prendimiento en algunos explantes y no se produjo necrosamiento.

Figura 5. Nudo necrosado en medio de cultivo Murashige – Skoog (62), utilizando como antioxidante sistémico Polivinyl pirrolidona.



Al ensayarse diferentes concentraciones de carbón activado 0.1%, 1%, 2% y 3%, bajo condiciones de oscuridad, las respuestas dadas fueron oxidación en la concentración de 0.1%, pero a partir del 1% ya no se presentó este problema lo que indica que esta concentración es suficiente para emplearla en el control de la oxidación.

Al transferir los explantes después de una semana a un medio sin carbón activado

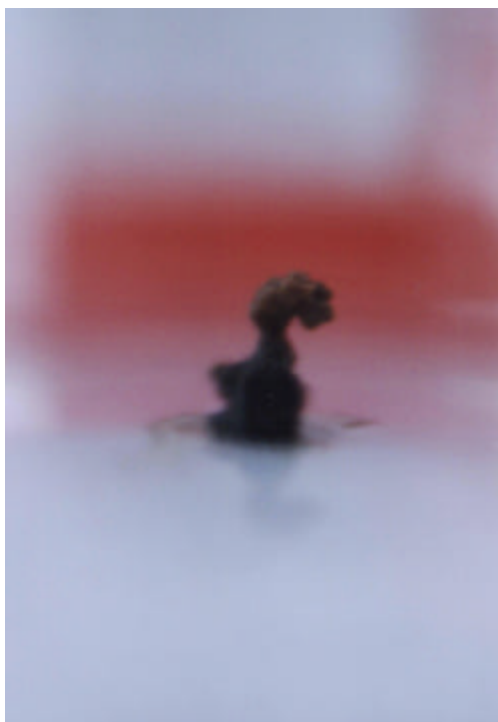
bajo condiciones de luz, la oxidación se manifestó inmediatamente indicando que se requiere de más tiempo de incubación de los explantes en medio suplementado con carbón activado para luego realizar la transferencia.

En esta misma concentración pero incubando directamente los explantes bajo condiciones de luz para observar la influencia de este factor en este proceso, se pudo observar que los explantes no presentan síntomas de oxidación permitiendo el establecimiento de estos, pero manteniéndose bajo períodos prolongados de incubación en este medio (2 - 3 meses) hasta lograr la adaptación de los nudos bajo estas condiciones para luego poderlos llevar a un medio que le proporcione los requerimientos necesarios para que se puedan dar respuestas de organogénesis.

En cuanto a la formación de brotes, estos se presentaron en el T3 (Polivinyl pirrolidona incorporado al medio), a los cuatro días de haber sido sembrados, en un 66.67% a pesar de haber presentado síntomas de oxidación pero las hojas se decoloraron provocando necrosamiento, además de presentarse emisión de sustancias de color castaño oscuro en el medio de cultivo (Figura 6).

Esto puede deberse a una respuesta similar reportada en un trabajo de propagación in vitro de *Bactris gasipaes* realizada por Stein y Stephens (1991, 198) en Costa Rica, quiénes atribuyeron este fenómeno a la interacción negativa del 2,4 D con sustancias secretadas por parte del explante dentro del medio lo que

Figura 6. Nudo con la formación de brote presentando necrosamiento con emisión de sustancias de color castaño en el medio de cultivo Murashige Skoog (62).



conllea a usar otra alternativa de control como la adición de carbón activado al medio.

Con carbón activado se presentó formación de brotes en un 28.57%, los cuales no presentaron síntomas de muerte de tejido. En uno de los explantes la formación del primer par de hojas se dio a los ocho días después de la siembra y así sucesivamente cada semana se observaba la formación del siguiente par de hojas hasta completar un total de ocho hojas pero los entrenudos se presentaron con corta elongación dando lugar a formación de roseta (Figura 7).

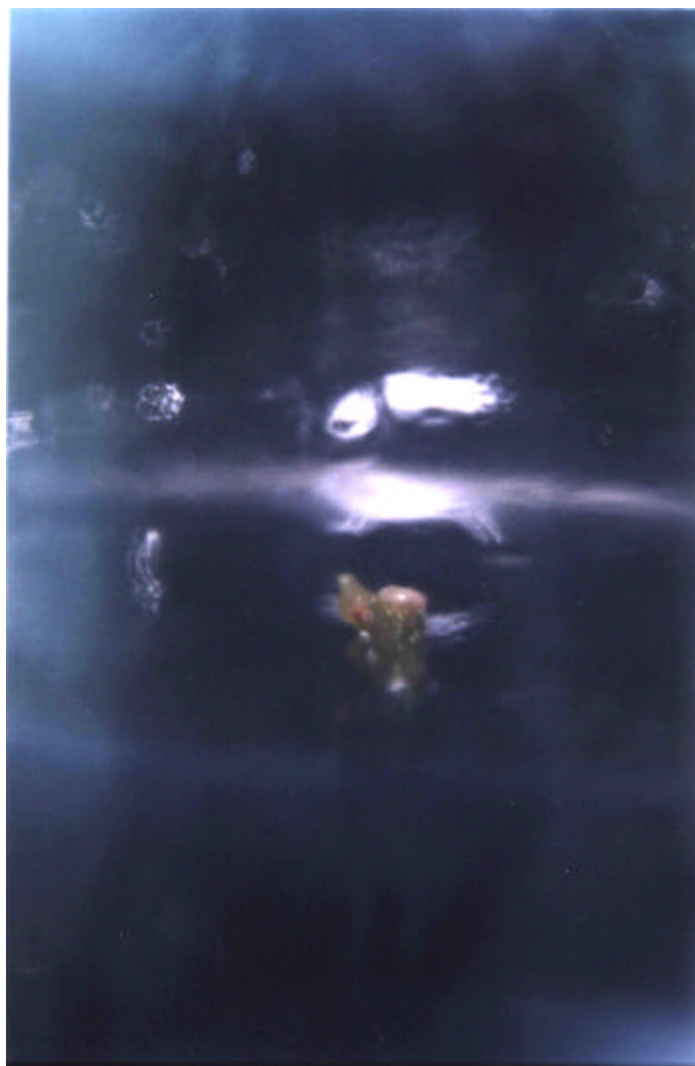
Esta respuesta coincide con la obtenida en la propagación in vitro del durazno blanco común realizada por Pachón y Bridge (1993, 107) en la cual la formación en roseta se dio con hojas abundantes y tamaño variable con entrenudos de 2 mm, al igual que en la propagación in vitro de ciruelo realizada por Pacheco (1989, 92) en donde también se dio formación de rosetas en hojas y elongación mínima de tallo alcanzando un máximo de 1.5 mm de longitud.

Los otros explantes que presentaron estructuras vegetativas, solo dieron como respuesta la formación de 1 a 2 hojas, pero se detuvo su crecimiento y los demás nudos no presentaron formación de brotes ya que las yemas permanecieron latentes y en todos no hubo formación de raíces (Figura 8).

Figura 7. Prendimiento de nudo, en medio Murashige – Skoog (62), suplementado con carbón activado al 1 %.



Figura 8. Nudo sin oxidación con yema latente.



Estas respuestas pueden deberse a varias causas; una debido a la presencia del carbón activado que según Weatherhead *et al.* (1978), citados por Stein y Stephens (1991, 198) este compuesto puede absorber auxinas del medio de cultivo, disminuyendo de esta manera su efectividad y en algunos casos haciéndolas completamente indisponibles.

Según Toribio (1988, 326) también puede depender del estado fisiológico del explante, de la época del año que puede provocar variación en las respuestas, el momento del día en el que se efectúe la recogida o a su genotipo pues se ha comprobado que determinadas líneas dentro de una especie pueden mostrar un mayor potencial regenerativo y que dicho potencial es heredable.

A lo anterior se puede añadir el origen del explante, la composición del medio de cultivo, la concentración hormonal teniendo en cuenta que cada especie tiene requerimientos específicos.

También se debe tener en cuenta de acuerdo con Yeoman (1977), citado por Hurtado y Merino (1987, 77, 96) que para obtener respuestas del explante en la propagación *in vitro*, estas dependen del tipo de auxina o regulador del crecimiento.

También anotan que puede ser requisito para una especie el suplemento de una auxina o un regulador de crecimiento relacionado; o requerir solo una citocinina o

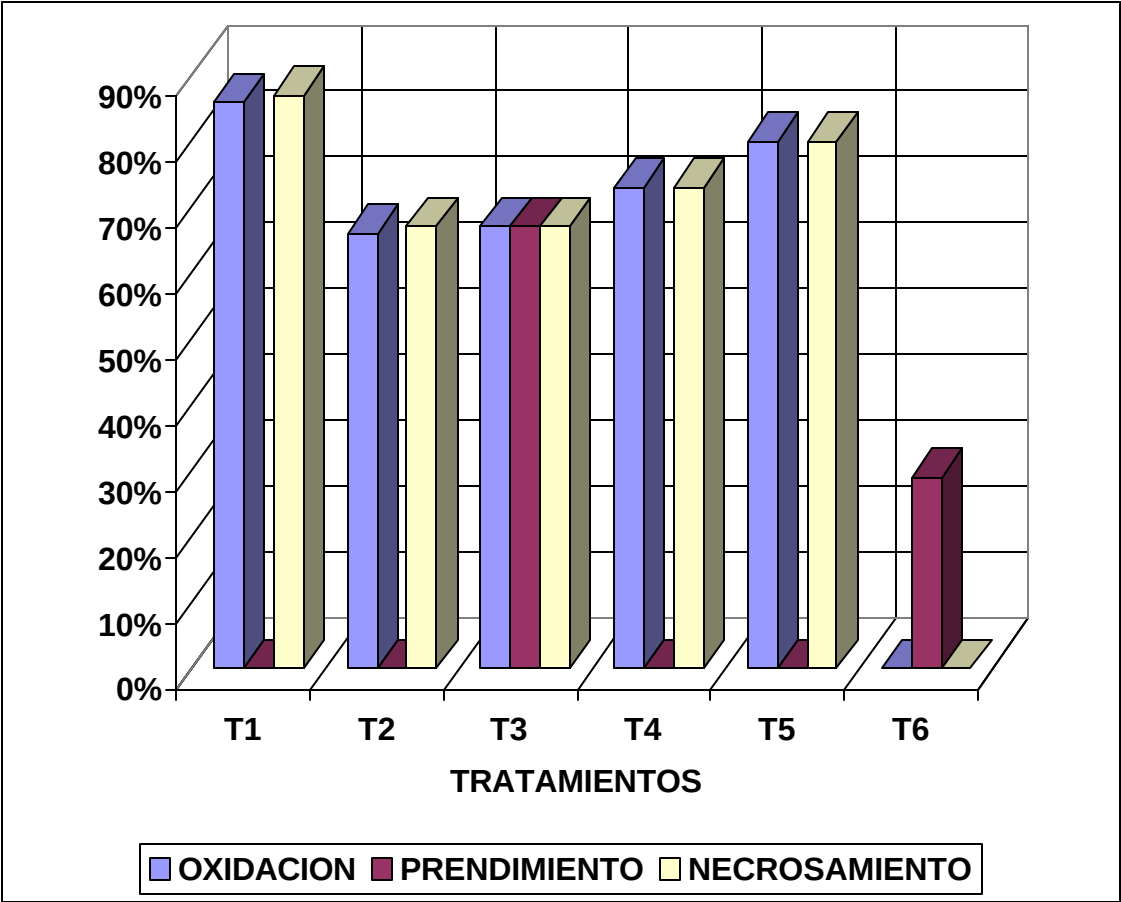
un suplemento, tanto de auxina como de citocinina, o bien, sólo responder en presencia de extractos de complejos naturales en el medio.

Otra causa puede atribuirse de acuerdo a lo enunciado por Toribio (1988, 331) a que el aporte hormonal externo en muchas ocasiones no conduce a la respuesta deseada, debido posiblemente a una falta de acoplamiento óptimo con los niveles endógenos de los reguladores de crecimiento, así como a una alteración en sus gradientes de distribución

Si se observan los resultados obtenidos entre los diferentes tratamientos (Figura 9) de acuerdo al porcentaje de oxidación, el método con carbón activado al 1% con incubación bajo condiciones de luz no conlleva a respuestas de pérdida de explantes.

Estos resultados también determinan que el método de desinfección empleado no contribuye en el proceso de oxidación ni toxicidad confirmando lo expuesto por Pinzón (1984), citado por Castro y López (2000, 43) quien afirma que la inmersión del explante en Hipoclorito de Sodio al 2,5% durante 20 minutos no presenta oxidación ni muerte del tejido, concentración y tiempo de inmersión que dio buenos resultados en especies forestales como la que se probó en *Podocarpus rospigliosii* y *Cedrela odorata* lo que conllevó a seguir este procedimiento para la desinfección del material vegetal en la propagación in vitro del Pino Colombiano (*Podocarpus oleifolius* var. *Macrostachyus*) en donde se comprobó su eficacia.

Figura 9. Porcentaje de Prendimiento y Necrosamiento en siembra con nudos.



4. CONCLUSIONES

4.1 El método de desinfección de explantes más adecuado para la propagación in vitro del Laurel de Cera es el que utiliza Hipoclorito de Sodio al 2.5% durante 20 minutos y la solución concentrada de yodo bactericida - fungicida al 0.15% durante cinco minutos que no produce oxidación ni toxicidad.

4.2 El método antioxidante que empleó carbón activado al 1% con incubación bajo condiciones de luz demostró ser el mas efectivo para el control de la oxidación pues mantiene el material vegetal en estado verde por tiempo prolongado permitiendo su establecimiento bajo estas condiciones.

4.3 Se puede lograr formación de brotes en el medio Murashige Skoog (62) utilizando 2,4 D como auxina suplementado con carbón activado impidiendo que estos puedan presentar decoloración de hojas y posterior muerte del tejido.

5. RECOMENDACIONES

- 5.1 Ensayar con diferentes tipos de hormonas en diferentes concentraciones y en diferentes combinaciones.
- 5.2 Probar con otros medios de cultivo como el de White, Shenk y Hilderbrant, Gamborg, Nitsch, la solución de Knop, etc. utilizando este método antioxidante.
- 5.3 Emplear carbón activado al 1% utilizando otro tipo de explantes como yemas, ápices caulinares, meristemos, para la propagación in vitro.

BIBLIOGRAFIA

BENAVIDES S., A. L. y ROSERO M., M. Propagación por estacas del Laurel de Cera (*Myrica pubescens* H. B. ex Willdenow). Pasto, Colombia, 1999, 52 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

BERNAL, H. J. y CORREA, J. E. *Myrica Pubescens* En: Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá, Colombia, Guadalupe. Tomo XII, 1998 p. 21 – 48.

BRAVO, A., CASTILLO, A. y CHAVES, G. Evaluación de tres métodos sobre la pregerminación de semillas de Laurel de Cera (*Myrica pubescens* H. B. K.). Pasto, Colombia, 1996. 83 p. Tesis Especialista en Ecología. Universidad de Nariño. Programa de Biología.

BU'LOCK, J. y KRISTIANSEN, B. Biotecnología Básica. Zaragoza, España: Acribia, 1991. p. 526 – 544.

CASTRO, J y LOPEZ, J. Evaluación de un medio de cultivo con tres niveles hormonales en la propagación in vitro de Pino Colombiano (*Podocarpus oleifolius*

var. *Macrostachyus*). Pasto, Colombia, 2000. 82 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agroforestal). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

CUAYAL, J. y RAMIREZ, B. Especies vegetales nativas aptas para la recuperación de áreas de protección en cuencas altas del municipio de Pasto. Pasto, Colombia, 1993. 86 p. Tesis Especialista en Ecología. Universidad de Nariño. Programa de Biología.

ENCARTA 1993 – 2000. Encyclopedia Program Manager. Microsoft Corporation. © & ®. 2001.

HARTMAN, H. T. y KESTER, D. E. Propagación de plantas. Principios y prácticas. México: Continental, 1981. p. 639 – 663.

HERRERA PARDOS, R. y TOVAR RECALDE, E. Evaluación del acodo aéreo en la propagación del Laurel de cera (*Myrica pubescens* Humb. & Bompl. Ex Willd) en el municipio de Pasto. Pasto, Colombia, 2002. 64 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agroforestal). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

HURTADO, M. y MERINO, M. Cultivo de tejidos vegetales. México: Trillas, 1987. 233 p.

LINDARTE, G. y BUSTAMANTE, C. Fundamentos de Biotecnología Vegetal En:

Respuestas. Vol. 2, No. 1 (1997); p. 18 – 19.

LINDSEY, K. y JONES, M. Biotecnología vegetal agrícola. Zaragoza, España: Acribia, 1989. 263 p.

LOPEZ J., G. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Curso teórico práctico. Facultad de Ciencias Agrícolas. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, 1993. 107 p.

MOSQUERA, C. y MUÑOZ, J. Determinación de algunas características sobre peso y cantidad de la semilla de Laurel de cera. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, 1997. 82 p.

MUÑOZ HOYOS, J. Estudio agroeconómico del Laurel (*Myrica pubescens*) en la zona norte del departamento de Nariño. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño. 1994. 86 p.

MUÑOZ LAZO, Z. Determinación de la madurez fisiológica del Laurel de cera (*Myrica pubescens* H. y B. K. ex Willdenow). Pasto, Colombia, 2000. 102 p. Trabajo de grado (Ingeniero Agroforestal) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas.

NAIR, M. K., KARUN, A. RAJESH, M. K. Research Potentialities of Coconut

Biotechnology. In: AgBiotechNet, Vol 1, (1999); 16 p.

PACHECO, M. José C. Micropropagación del ciruelo (*Prunus doméstica* cv. “Ecuatoriano”) En: Propagación y mejoramiento de frutales de hoja caduca. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, 1989. pp. 85 – 97.

PACHON G. BRIDG. H. Micropropagación in vitro del durazno blanco común (*Prunus persica* L.) portainjerto de aplicación comercial. En: Agricultura Trópica. Vol. 30 No. 1 (1993); p. 100 – 109.

PARRA, Carlos A. Taxonomía del género *Myrica* (*Myricae*) en Colombia. Santa fé de Bogotá, Colombia, 1998. pp. 184 – 190. Tesis (Biólogo). Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

ROCA, W. y MROGINSKI, L. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT, 1993. 650 p.

RODRÍGUEZ, J. y PEÑA, J. Flora de los Andes: cien especies del altiplano cundi-boyacense. Bogotá, Colombia: Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los ríos Bogotá, Ubaté y Suárez (CAR), 1984. p. 130 – 131.

ROJAS G., M. y ROVALO M., M. Fisiología vegetal aplicada. 2 ed. México: Mc. Graw Hill, 1984. p. 204 – 226.

SIGMA CHEMICAL COMPAÑY. Biochemicals organic compounds for research and diagnostic reagents. Sigma Chemical Co, 1991. 214 p.

STEIN M. y STEPHENS C. Effect of 2,4 – Dichlorophenoxyacetic Acid an Activated Charcoal on Somatic Embriogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. In: Turrialba Vol. 41, No. 2 (1991); pp. 196 – 201.

TORIBIO IGLESIAS, M. El papel del cultivo “In vitro” en la mejora genética de especies forestales. En: Curso monográfico sobre “Mejora genética de especies arbóreas forestales”. Madrid, España: FUCOVASA, 1988. p. 321 – 333.