

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



RESPUESTA DEL PALO BLANCO  
(*Tabebuia donell-smithii* Rose.) AL  
ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* CON FINES  
DE PROPAGACIÓN

Trabajo de graduación presentado por Ana Lucía  
Solano Garrido para optar al grado de Licenciatura  
en Ingeniería Forestal

Guatemala  
2007

RESPUESTA DEL PALO BLANCO  
(*Tabebuia donell-smithii* Rose.) AL  
ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* CON FINES  
DE PROPAGACIÓN

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

RESPUESTA DEL PALO BLANCO  
(*Tabebuia donell-smithii* Rose.) AL  
ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* CON FINES  
DE PROPAGACIÓN

Trabajo de graduación presentado por Ana Lucía  
Solano Garrido para optar al grado de Licenciatura  
en Ingeniería Forestal

Guatemala  
2007

## PREFACIO

La finalidad de este trabajo es aportar información al sector forestal sobre la respuesta del Palo Blanco al establecimiento *in vitro*, para que ésta pueda servir de base en futuras investigaciones con el objetivo de lograr la propagación de individuos con características superiores.

La perspectiva de este va orientada a que este tipo de investigaciones son un aporte para lograr el mejoramiento genético en especies forestales de una forma científica y seria, haciendo uso de técnicas modernas con las que actualmente se cuenta gracias a los avances biotecnológicos.

Adicionalmente se desea enfatizar que en Guatemala se tiene poco conocimiento sobre la genética forestal y sobre todos los recursos tecnológicos que existen para poder aprovechar mejor los recursos genéticos con los que cuenta el país, debido al escepticismo y a la falta de interés en el tema, tanto de las instituciones competentes como de silvicultores. De tal forma que si se orientaran esfuerzos para generar más investigación en este campo, se podrían obtener grandes beneficios en la silvicultura que repercutirían en ganancias para el sector industrial forestal, como lo han hecho ya otros países.

Deseo reconocer y agradecer el apoyo de la Universidad Del Valle de Guatemala por permitirme realizar esta investigación en sus instalaciones y proporcionarme todos los medios necesarios para que esta se realizará exitosamente. En especial a la Lda. Margarita Palmieri, Directora del Departamento de Biología, a la Inga. Mónica Espinoza, encargada del Laboratorio de cultivo de tejidos y al Ing. Luis Molina asesor de este trabajo. También agradezco el apoyo incondicional de Pablo Ramírez propietario de la Finca Santa Elisa por proporcionarme el material vegetal necesario para que esta investigación pudiera llevarse a cabo.

Deseo dedicar este trabajo a Dios por ser el motivo y la inspiración en mi vida para ser una buena profesional y a mi familia por su apoyo constante durante toda mi carrera de Ingeniería Forestal.

# CONTENIDO

	Página
<b>PREFACIO</b> .....	<b>iv</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ILUSTRACIONES</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>viii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. MARCO REFERENCIAL</b> .....	<b>2</b>
A. Palo Blanco .....	2
B. Mejoramiento genético forestal (MGF).....	8
C. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	11
D. Propagación de especies forestales por medio de cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	14
E. Objetivos .....	20
<b>III. METODOLOGÍA</b> .....	<b>21</b>
A. Descripción del área de trabajo .....	21
B. Materiales .....	21
C. Métodos .....	21
D. Diseño experimental y metodológico.....	24
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>46</b>
<b>IX. APÉNDICE</b> .....	<b>48</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica del Palo Blanco.....	5
2. Algunos países que han desarrollado experimentos e investigaciones en el cultivo de tejidos <i>in vitro</i> en especies forestales.....	17
3. Descripción de los tratamientos .....	24
4. Resultados finales de la primera siembra de yemas apicales.....	26
5. Resultados finales de las pruebas de desinfección en yemas apicales.....	27
6. Resultados finales en pruebas de desinfección con el tratamiento 2 en yemas apicales.....	28
7. Respuesta al establecimiento in vitro de yemas apicales .....	28
8. Resultados finales de la primera siembra de yemas axilares .....	29
9. Resultados finales de la segunda siembra de yemas axilares.....	30
10. Resultados finales de la tercera siembra de yemas axilares .....	31
11. Resultados finales de la cuarta siembra de yemas axilares.....	32
12. Resultados finales de la quinta siembra de yemas axilares.....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución natural del Palo Blanco.....	5
2. Diagrama de MGF .....	8
3. Diagrama de flujo de la metodología.....	55
4. Explante: yema apical .....	26
5. Explante: yema axilar .....	29
6. Contaminación de yemas axilares por bacteria.....	36
7. Contaminación de yemas axilares pro bacteria y hongos .....	37
8. Yema axilar iniciando la formación de callo .....	38
9. Yemas apicales que formaron callo y brotes.....	38
10. Yemas apicales que regeneraron hojas .....	39
11. Oxidación del tejido vegetal.....	40

## RESUMEN

Este trabajo perseguía evaluar la respuesta del Palo Blanco (*T. donell-smithii*) al establecimiento *in vitro* y definir el tratamiento más adecuado para lograr su multiplicación por medio de cinco tratamientos con Bencil-aminopurina (BAP).

Inicialmente se decapitó un grupo de plantas de Palo Blanco de 1 año de edad, y se les aplicó Kinetina (1Mm) para estimular el crecimiento de yemas axilares. Las yemas apicales obtenidas de la decapitación, se utilizaron para realizar pruebas preliminares con el fin de definir un método de desinfección adecuado y las condiciones del medio de cultivo. Según los resultados obtenidos el método de desinfección más adecuado consiste en: lavar el explante con agua y jabón, desinfectarlo con Etanol al 70% por 1 min. en agitación constante, exponerlo a una solución de hipoclorito de sodio al 1% con una gota de Tween -20<sup>®</sup>, por 10 min. Y por último enjuagarlo tres veces con agua estéril. El medio de cultivo que se utilizó fue MS/2 suplementado con ácido cítrico como antioxidante. De las 60 yemas apicales sembradas se tuvo una respuesta positiva solamente en 6 (10%), en las cuales se observó formación de callo y brotes, o regeneración de hojas. Sin embargo, el desarrollo de éstas se detuvo por la oxidación del tejido vegetal.

Para evaluar el establecimiento de las yemas axilares se utilizó el mismo medio de cultivo y éste se suplementó con distintas dosis de BAP, de esta forma se establecieron cinco tratamientos para evaluar la multiplicación de los explantes: 0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mg/L BAP. Se realizaron 20 repeticiones para cada tratamiento,

La respuesta de las yemas axilares al establecimiento *in vitro* fue negativa, ya que la desinfección fue compleja. Se tuvieron que realizar modificaciones en el método de desinfección, aplicando antibiótico (Agrimicyn<sup>®</sup>) a las plantas madres y desinfectando los explantes, con una mezcla de fungicidas (Benomil<sup>®</sup> y Derosal<sup>®</sup>) por 25 min.; adicionalmente el explante se desinfectó con Etanol al 70% por 1 min. y con Hipoclorito de sodio al 3% con 1 gota de Tween -20<sup>®</sup>, por 8 min. Pero a pesar de mejorar la desinfección, la contaminación fue de 100% a 75%, con el inconveniente que los explantes que no se contaminaron, fue porque murieron en el proceso de desinfección. Por consiguiente no se pudo lograr el establecimiento de estos explantes, por lo que no pudo determinarse un tratamiento para su multiplicación.

## I. INTRODUCCIÓN

El Palo Blanco (*Tabebuia donell-smithii* Rose) es una especie muy apreciada en Guatemala por las características de su madera, las cuales la hacen ideal para la fabricación de muebles, puertas, etc. La madera del Palo Blanco ha sido utilizada desde hace muchos años, la cual se obtenía de árboles provenientes de sistemas agroforestales de café y del bosque natural. Hasta hace poco empezó a surgir la inquietud de aprovechar mejor este material pero se encontraba la limitación que este ya era escaso naturalmente, esto motivó a silvicultores así como agricultores para establecer plantaciones puras de Palo Blanco con el objetivo de producir madera para cubrir la demanda del mercado. La respuesta del Palo Blanco a desarrollarse en plantaciones es buena y esto ha incentivado a que el número de plantaciones de esta especie aumenten en todo el país y se estime como una especie prometedora en la industria forestal. Sin embargo, a pesar que su forma no es del todo mala y su crecimiento es rápido, se podrían mejorar los rendimientos en la industria si se mejoran ciertas características estructurales de la planta. Es aquí en donde interviene el tema que se ha dejado de último y al que no se le ha prestado mucha importancia: El mejoramiento genético forestal.

El tema del mejoramiento genético forestal surge de la necesidad de obtener materia prima de mejor calidad y así obtener mayores rendimientos en la industria, ya que en muchos países se observó, y en el caso de Guatemala se sigue dando, que existe una falta de correlación entre los tres puntos claves de la producción de bienes maderables (producción de plantas, plantaciones e industria), debido a que no se planta lo que la industria consume y lo que se planta no es de buena calidad en algunos casos, por lo tanto el producto final de la cadena productiva tiene defectos, pequeñas dimensiones útiles o simplemente es un producto limitado que no puede alcanzar una mejor posición en el mercado tanto local como internacional.

Por esta razón es importante generar investigación en el tema de genética y mejoramiento forestal. Pero para esto es necesario conocer las características de las especies forestales, las leyes genéticas que las gobiernan y las herramientas científicas y tecnológicas que permitan estudiarlas más a fondo. En este sentido, este trabajo tiene la finalidad de generar información básica que permita definir el establecimiento *in vitro* del Palo Blanco con el fin de lograr la propagación de individuos con características superiores. Con la perspectiva de contribuir a su mejoramiento genético, sirviendo como base para investigaciones futuras en este tema.

## II. MARCO REFERENCIAL

### A. Palo Blanco *Tabebuia donell-smithii* Rose.

El Palo Blanco, *Tabebuia donell-smithii* Rose. es una especie forestal muy apreciada y valorada en Guatemala por las cualidades y propiedades de su madera para realizar trabajos de carpintería finos. Comúnmente en Guatemala se le conoce como Palo Blanco debido a que su corteza es de un color gris claro o blancuzca. Entre otros nombres comunes que se le dan están: Cortez, Cortez blanco, Primavera, Caoba blanca o Cedro blanco por tener cualidades de trabajabilidad tan buenas como estas especies (Standley y Steyermark, 1946-77).

**1. Taxonomía:** el Palo Blanco, *Tabebuia donell-smithii* Rose. es una especie que fue reportada por primera vez por Rose en 1892. Pertenece a la familia Bignoniaceae y en la literatura se puede encontrar también bajo los sinónimos: *Cybistax donell-smithii* (Rose) Seibert. y *Roseodendron donell-smithii* (Rose) Miranda. (Standley y Steyermark, 1946-77) Recientemente se ha retornado al nombre original de *Tabebuia donnell-smithii* Rose, de acuerdo a Pennington y Sarukhán, 1998. (Castañeda, 2004).

#### Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Palo Blanco

REINO	Plantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Labiales
FAMILIA	Bignoniaceae
GENERO	<i>Tabebuia</i>
ESPECIE	<i>Tabebuia donell-smithii</i> Rose

(Standley y Steyermark, 1946-77)

**2. Descripción botánica:** el Palo Blanco es un árbol grande que puede llegar a medir hasta 35 m. de altura y 60 a 100 cm. de diámetro. Usualmente presenta pequeñas gambas y una copa redondeada.

La corteza es ligeramente café clara a gris o blancuzca, lisa o algunas veces con pequeñas escamas; la corteza interior es de color blanco o café pálido.

Las hojas son deciduas con 7 foliolos y algunas veces 5; los foliolos son membranosos, oblongos a ovados, acuminados, redondos o subcordados en la base, de 5 a 25 cm. de largo, con frecuencia irregularmente serrados, pubescentes en el haz y envés, a lo largo de la nervadura.

Tiene una inflorescencia que es una panícula abierta, densamente pubescente; el cáliz es membranoso, bilabiado, profundamente lobado, 12-15 mm de largo, tiene una corola de color amarillo brillante de 4.5 – 6 cm. de largo.

Los frutos son cápsulas de 30-45 cm. de largo, de 2-3 cm. de ancho, cada valva con 6 costillas. Pubescente con pelos blancos y cortos. (Standley y Steyermark, 1946-77). La semilla es muy delgada y posee un ala papirácea para su fácil distribución por la acción del viento. (Francis, 1989)

**3. Distribución:** la especie se encuentra distribuida naturalmente desde el sur de México, Guatemala, El Salvador y en el área central de Honduras. Fuera de su área natural el Palo Blanco ha sido introducido a Costa Rica, Hawai y Puerto Rico. (Francis, 1989)

En Guatemala, se le encuentra comúnmente en el bosque seco y Bosque tropical húmedo y semihúmedo, mayormente en la Costa Sur del país, a elevaciones bajas hasta los 1000 m.s.n.m. (Castañeda, 2004).

La especie requiere de suelos derivados de cenizas volcánicas, roca metamórfica y piedra caliza, con una textura arenosa a franco arcilloso y con valores de pH de 5.5 a 7.5. La especie necesita suelos bien drenados y precipitaciones altas que van desde 1000 a 3000 mm. al año. La temperatura promedio que requiere la especie es de 23 °C a 28 °C.

En el bosque se encuentra en asociaciones naturales con *Terminalia oblonga* (R. & P.) Volador, *Dendropanax arboreus* (L.) Planch. & Decae, Mano de León, *Bursera simaruba* (L.) Sarg., Palo de jote, *Swietenia humilis* Zucc., Caoba de costa, *Tabebuia palmeri* Rose. Cortez colorado. y *Tabebuia rosea* (Bertol) DC. Matilsiguate. (Francis, 1989)

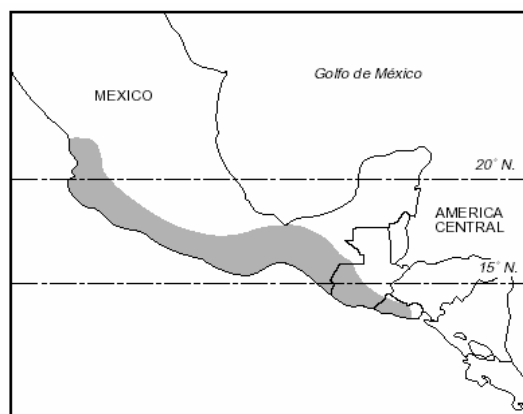


Figura 1: Distribución natural del Palo Blanco (Francis, 1989).

#### 4. Ciclo de vida

**a. Reproducción y crecimiento inicial:** el Palo Blanco produce flores de color amarillo brillante, durante la época seca las cuales pueden permanecer hasta por dos meses. Las semillas producidas se encuentran en vainas delgadas y poseen un ala papirácea, para su fácil distribución por medio del viento. La germinación de las semillas es epigea, las cuales tardan aproximadamente de 15 a 18 días en germinar.

La reproducción de la especie también puede hacerse de forma vegetativa por medio de enraizamiento de brotes; los árboles jóvenes son capaces de rebrotar al ser cortados, por lo menos hasta alcanzar un tamaño de poste.

El Palo Blanco puede ser manejado perfectamente en vivero sin presentar muchas exigencias. La semilla no necesita tratamientos pregerminativos, las plantas puede transplantarse a bolsas o bandejas y son trasladadas al campo definitivo al tener alrededor de 4 a 5 meses de edad. (Francis, 1989)

**b. Reproducción vegetativa:** se tienen datos que en Honduras se realiza la siembra de Palo Blanco por medio de estacas sin embargo para obtener las estacas las plantas de donde se obtienen deben tener alrededor de 1 m. de altura. (Francis, 1989)

En Guatemala se hizo una prueba de propagación por medio de estacas, la cual consistió en evaluar la respuesta al enraizamiento de estacas de tallo aplicando Ácido Indolbutírico (AIB) en concentraciones de 3000 y 5000 ppm por el método de inmersión rápida y 1000, 2000 y 3000 ppm por el método de espolvoreado, en periodos de enraizamiento de 30, 60 y 120 días y estacas de 1 a 1.5 y 1.6 a 2.5 cm de diámetro.

Los resultados indican que si se observó presencia de callo y brotes a los 30 y 60 días; sin embargo a los 120 días se observó la pudrición y muerte de todas las estacas, aun las que habían formado callo. (Gerónimo, 2004).

**c. Etapa de brinjal hasta la madurez:** los árboles tienen una fuerte reacción a la competencia por ser muy exigentes con la cantidad de luz que requieren. Es una especie pionera, sin embargo las plantas jóvenes bajo la cobertura de otros árboles tienen un crecimiento pobre por la falta de luz directa.

Existe una cantidad limitada de información sobre el crecimiento del Palo Blanco. El crecimiento puede ser de 1.5 a 2 m de altura por año en los buenos sitios

mas o menos por los primeros 10 años. Este crecimiento disminuye gradualmente hasta que se alcanza una altura máxima de 25 a 35m.

El crecimiento en diámetro en los buenos sitios varía entre 1 a 3 cm. por año. Es posible alcanzar un DAP (diámetro a la altura del pecho) de hasta 1m (Francis, 1989)

**5. Aspectos silviculturales de la especie:** para la producción de madera aserrada de Palo Blanco se ha sugerido una rotación de 30 a 35 años (INAB,1999). En los mejores sitios 30 años serian suficientes para la producción de piezas de madera grandes y de buena calidad (Francis, 1989).

Para establecer un plantación de Palo Blanco el espaciamiento de siembra puede variar, en plantaciones en Honduras por lo general es de 9 por 4.5 m (240 árboles por ha) (Francis, 1989) en Guatemala la mayoría de las plantaciones existentes están a 3 por 3 m. (1,111 árboles por ha) (INAB,1999).

La forma del árbol es buena sin embargo se ha observado que muchos individuos presentan una ramificación baja y presentan a veces torceduras del fuste hacia la luz, mayormente cuando se encuentran en supresión. La alta mortalidad y el crecimiento lento pueden ocurrir en plantaciones si el estrato de cobertura superior no es removido por completo o si los rebrotes y las hierbas no son controlados de manera adecuada después de la siembra. Se ha observado también que tienden a bifurcarse en el tallo frecuentemente durante el crecimiento normal y, a pesar de que una de las ramas bifurcadas domina a la otra, casi siempre se desarrollan unas curvaturas en estos puntos. (Francis, 1989).

Este defecto se puede evitar si se realiza una poda de una de las ramas cada vez que se forme una bifurcación, sin embargo esta poda debe hacerse preferentemente cuando el tejido aun no se ha lignificado y se encuentra verde, debido a que si la poda se realiza cuando las ramas bifurcadas ya están lignificadas quede una cicatriz en el árbol y la curvatura causada por al bifurcación es más pronunciada, causando que el fuste quede torcido. La poda y el monitoreo para identificar los árboles que se bifurcarán requiere de un costo operativo extra que debe considerarse como algo importante.

Es importante mencionar también que aunque se han probado varios distanciamientos, aun en los más estrechos no se ha observado que este factor ayude a mejorar la forma del árbol (Francis, 1989).

Según los distanciamientos de siembra se pueden realizar de tres a cuatro raleos (INAB, 1999).

**a. Agentes dañinos:** hasta el momento no se han reportado enfermedades serias o problemas serios con plagas de insectos. El grado de resistencia de la madera a las termitas se desconoce. El duramen del Palo Blanco es por lo general muy durable cuando es expuesto a los hongos de la pudrición blanca y parda (Francis, 1989).

**b. Genética:** el género *Tabebuia* contiene alrededor de 100 especies en la América tropical y subtropical. El Palo Blanco es similar a *Tabebuia millsii* (Miranda) A. Gentry, la cual crece en el sur de México, con una población aislada en Venezuela. Se pueden encontrar formas intermedias entre estas dos especies, y es posible que ambas sean en realidad una sola especie (Francis, 1989).

En el tema de mejoramiento genético de Palo Blanco, se conoce que en Guatemala se desarrolló un programa para la conservación del material genético superior de Palo Blanco y para su propagación y desarrollo comercial. Este pretendía seleccionar los mejores árboles que aún se encuentran en la región costera y propagarlos por medio de semillas, injertos y estacas, con el fin de mejorar el rendimiento comercial de esta especie, hasta en un 20 %. El proyecto tiene una duración de tres años y se esperarían resultados para finales del 2007. (Alvarado, 2005)

**c. Usos:** el principal uso del Palo Blanco es la obtención de madera para hacer muebles y puertas con acabados finos (Standley y Steyermark, 1946-77).

**6. Situación actual de la especie en Guatemala:** la abundancia del Palo Blanco en bosques naturales se ha visto reducida debido a su corta excesiva (Castañeda, 2004), Por esta razón el Palo blanco es una de las especies prioritarias para los proyectos de reforestación financiados por el programa de Incentivos Forestales –PINFOR– en Guatemala. En los años 1998-2005 se han reforestado 3,378.14 hectáreas y se espera que para el año 2016 se hayan reforestado 15,326 hectáreas con esta especie (INAB, 2005).

En Guatemala la madera de Palo Blanco se considera madera semipreciosa y su precio en el mercado nacional se ha elevado en los últimos años.

Su madera tiene mucha demanda en el sector de la industria de madera secundaria que incluye las carpinterías grandes hasta las pequeñas que trabajan de forma artesanal.

Sin embargo en ocasiones el rendimiento en el aserrío no es muy alto debido a que la madera proviene de árboles del bosque natural y estos presentan torceduras o bifurcaciones, lo cual disminuye la cantidad de madera considerada como de primera o madera con las mejores características para ser trabajada.

De las especies que ocupan los primeros lugares en las exportaciones Nacionales, ya sea como madera aserrada o como determinado producto, el Palo Blanco es la especie que se encuentra en el cuarto lugar, antecedido por el Pino, Caoba y Hule y seguido de Melina, Cedro, Teca, Santa María, San Juan y Conacaste.

En cuanto a la relación bosque-Industria-Exportaciones El Palo Blanco es la cuarta especie más importante en el rubro de las exportaciones (US\$ 4,684,829 en el 2005). Es la tercera especie de latifoliada más importante que se exporta después de la Caoba y el Hule. (Gómez y Alvarez, 2006)

El Palo Blanco que actualmente se utiliza en la industria proviene principalmente del sistema agroforestal (fincas de café y otros cultivos). Sin embargo según los registros de PINFOR (INAB) ocupa la sexta posición en importancia como especie reforestada con después del grupo de las coníferas y de la Teca. Lo anterior significa que el Palo Blanco en el mediano plazo (10 años) será la especie nativa latifoliada más importante en el país desplazando a la Caoba, la cual tiene una existencia limitada en bosques naturales y una tasa de reposición muy baja, en una relación 1:10.5 con respecto al palo blanco (1 árbol de caoba por cada 10 árboles de Palo Blanco). Es posible que mientras las plantaciones de Palo Blanco producen madera de calidad para la industria, ocurra una merma de oferta hacia la industria, por cuanto la actual oferta es provista principalmente del sistema agroforestal café, la cual tiende a reducirse por la gran demanda que está teniendo la especie. (Gómez y Alvarez, 2006)

Esta demanda es la principal causa por la que el Palo Blanco ya no se encuentra comúnmente en su estado natural y es ésta la importancia de poder desarrollar plantaciones con esta especie, pero plantaciones con buenos ejemplares.

## B. Mejoramiento genético forestal (MGF)

El Mejoramiento Genético Forestal (MGF) consiste en el desarrollo de poblaciones o individuos genéticamente superiores, a partir de poblaciones amplias y diversas (poblaciones base) de especies forestales y su uso operacional como semillas, a partir de poblaciones de producción o clones mediante multiplicación agámica. La finalidad de un programa de MGF es la de mejorar las principales características cuantitativas y cualitativas de rendimiento y calidad, así como garantizar la seguridad de cosecha a través de la selección de genes deseables y su perpetuación mediante la utilización de semillas o clones mejorados. Gracias a la mejora genética puede lograrse, entre otras cosas, mayor productividad / ha, mejor calidad del producto, adaptación a áreas marginales de cultivo, reducción del turno de aprovechamiento y de los costos de establecimiento, cosecha y/o procesos industriales. Esto lleva a considerar al MGF como una herramienta operacional de uso corriente tal como las prácticas silviculturales (Marcó, 2004)

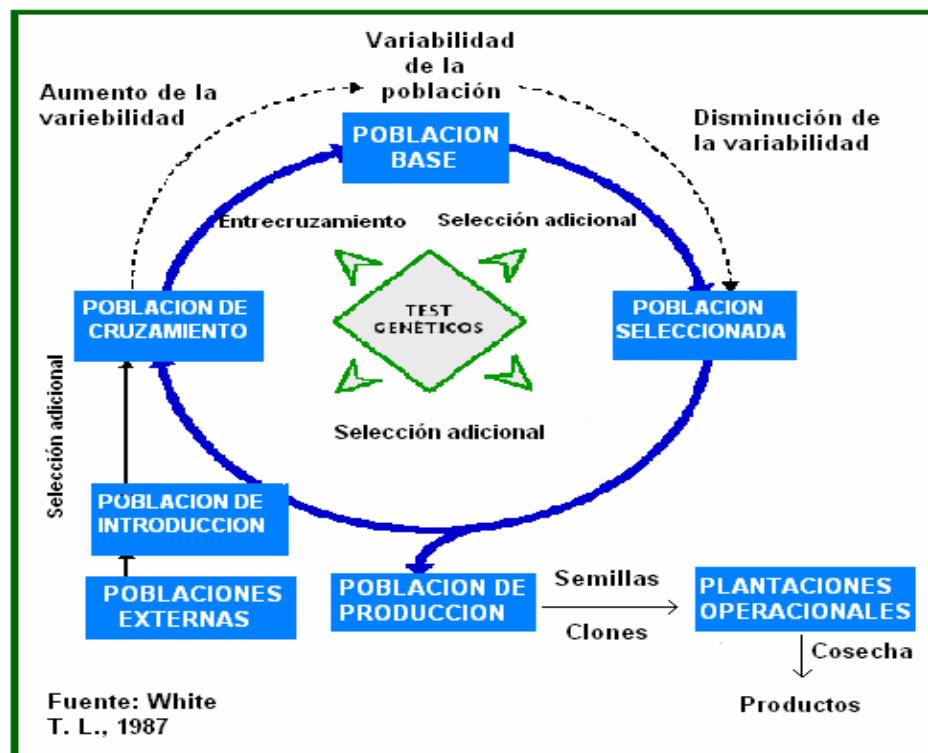


Figura 2: Diagrama de MGF (Marcó, 2004)

**1. Ventajas y desventajas de las especies forestales para realizar mejoramiento genético:** las especies forestales, en su mayoría, son plantas que no han sido manipuladas grandemente por el hombre, de manera que se encuentran en estado prácticamente silvestre y muestran una inmensa variabilidad genética, la cual se presenta como una gran ventaja para el mejoramiento genético. Sin embargo, por su mayor tamaño y su ciclo biológico mas largo, presentan una serie mayor de obstáculos para su manipulación y mejoramiento genético que los cultivos agrícolas. (Mesén,1997)

Pero a pesar de estas desventajas el mejoramiento genético de especies forestales es posible y necesario. Es difícil entender por que todavía a muchos reforestadores, comerciantes de semillas incluso técnicos, no les preocupa seleccionar árboles deformes, enfermos o suprimidos para recolectar su semilla y establecer plantaciones, o bien obtener la semilla sin conocer su origen ni las características genéticas de los padres. El resultado de este error ha sido evidente en muchos casos y en muchos países, tal vez demasiados, y sin embargo se sigue repitiendo. Sus repercusiones no solo se han sentido en las pérdidas económicas del dueño de la plantación, sino que tantas plantaciones fallidas han generado frustración y han dado una imagen negativa a la reforestación.

Esta falta de atención hacia el componente genético en la silvicultura posiblemente tenga su origen en ciertas características propias del recurso forestal, que lo diferencia de los cultivos agrícolas y animales domésticos: a) el bosque ha sido visto como un regalo de la naturaleza que esta ahí únicamente para ser explotado, no manejado como un cultivo más. La cultura forestal es una actividad relativamente reciente y aun muchas sociedades consideran absurda la siembra de árboles; b) por siglos, el bosque se ha venido regenerando sin intervención del hombre, lo cual ha hecho suponer que esta acción se le puede seguir dejando a la naturaleza, bajo los "mismos términos" y c) las prácticas de manejo forestal permiten un amplio margen de selección y mayores opciones de obtener un producto final a pesar de la mala calidad del germoplasma utilizado.

Además, la enseñanza de las ciencias forestales ha tendido a sobre enfatizar la importancia del ambiente y del manejo en el éxito de la silvicultura, minimizando e incluso ignorando la importancia de la herencia en el comportamiento de los individuos. Ha tornado a los forestales demasiado tiempo entender que los árboles responden a la manipulación genética y se rigen por los mismos principios de la herencia que cualquier otro organismo vivo. (Mesén,1997)

Sin embargo hay que tomar en cuenta que existen serias limitaciones en el desarrollo de programas de mejoramiento genético como los que se aplican en la agricultura debido a que: muchos árboles no florecen en edades juveniles esto limita la aplicación de programas que se basen en cruzamiento natural, la arquitectura de los árboles requiere grandes áreas para evaluación, conservación de genotipos y producción de germoplasma, que a menudo no están fácilmente disponibles, sobre todo cuando se trabaja con instituciones estatales. (Mesén, 1997)

**2. Perspectivas:** el mejoramiento genético forestal, en un futuro no muy lejano, pretende mejorar ciertas características en las especies forestales con el objetivo de mejorar la calidad y cantidad del producto final, entre los aspectos que se desean mejorar están: lograr que la arquitectura de copa de los árboles capturen la luz de forma más eficiente, que concentren la producción de fotosintatos en el tallo, que presenten menor cantidad de ramas, mayor largo de entrenudos, fustes más rectos, mejor aptitud y comportamiento en los procesos de transformación de la madera para fines específicos, entre otras.

Ahora bien para lograr esto, será necesario: 1) desarrollar nuevos protocolos de muestreo y métodos no destructivos, que puedan ser utilizados a gran escala a efectos de explorar y evaluar la diversidad genética de las actuales poblaciones de mejoramiento, 2) reintroducir algunas coníferas y latifoliadas de reconocido alto valor maderable y 3) incrementar la utilización de las herramientas generadas recientemente por la biotecnología para entender y manipular la información genética en los programas de mejoramiento. En este sentido, la utilización de marcadores moleculares permitirá caracterizar y cuantificar la diversidad genética en poblaciones forestales, detectar las fuentes de variación entre y dentro de orígenes, razas y familias e identificar a los genes involucrados en las características de interés (QTLs, genes candidatos).

Asimismo, la disponibilidad de mapas de ligamiento y de programas de secuenciación del genoma de las principales especies forestales de interés junto a estudios comparativos entre especies, están permitiendo entender el funcionamiento de características complejas tales como crecimiento, resistencia a enfermedades y plagas, tolerancia al frío, sequía, etc. Los genes una vez caracterizados podrán ser manipulados, y las ganancias genéticas logradas a través de su incorporación a genotipos de alto valor, podrán perpetuarse mediante propagación vegetativa ya sea por medio de cultivo de tejidos *in vitro* o por medio de esquejes (en las especies que sea factible) (Marcó, 2004).

### C. CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*

El cultivo de tejidos *in vitro*, comprende de un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplastos, células, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

Los objetivos perseguidos con la utilización de cultivo de tejidos *in vitro* son numerosos y diferentes. La posibilidad de las aplicaciones de estas técnicas pueden resumirse en: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética y mejoramiento genético; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma. (Mroginski y Roca, 1991)

Hay dos sistemas de producción de plantas *in vitro*, uno es la embriogénesis somática la cual consiste en producir plantas *in vitro* a partir de una semilla inmadura para generar múltiples clones, y el otro es la organogénesis la cual consiste en producir plantas *in vitro* a partir de secciones vegetales (órganos) para generar múltiples clones. Según lo que se desee obtener y según las características de la planta con la que se este trabajando, se debe analizar qué sistema de producción de plantas es el más adecuado (Niella, 2006).

**1. Explante:** la elección del explante adecuado esta determinada por el objetivo perseguido y la especie utilizada.

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de explantes que cultivados en condiciones apropiadas permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos. En estos casos es muy frecuente utilizar ápices o meristemas caulinares, hojas entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos.

Sin embargo la elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos. Son pocas las especies las que permiten el uso de gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas enteras.

Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos.

La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles.

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento del cultivo; cuanto mas grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae consigo mayor posibilidad de contaminación con microorganismos.

Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados, entre estos aspectos están: la época del año en que se realizan los cultivos, los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos (Mroginski y Roca, 1991)

**2. Asepsia:** la asociación de el explante y el medio de cultivo en el que se incuba es un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar la contaminación con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación.

Para establecer cultivos en condiciones asépticas es necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y d) realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia.

Entre los compuestos químicos más utilizados para realizar al desinfección de explantes esta: etanol (70%), Hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$  del 1% al 3%). Con menor frecuencia se utilizan Hipoclorito de Calcio ( $\text{Ca(OCl)}_2$  del 6% al 12%) y el Cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$  del 0.1% al 1.5%)

En algunos casos resulta útil agregar un agente tensoactivo (el que se utiliza mas comúnmente es Tween-20<sup>®</sup>).

Es necesario que después de las desinfecciones los explantes se enjuaguen con agua destilada para eliminar el exceso de químicos.

La desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explantes. Es más fácil la desinfección de los explantes provenientes de plantas de invernaderos o cuartos climatizados, así como los explantes provenientes de material joven.

Un aspecto básico es la desinfección del ambiente en donde se realizará el cultivo, esto incluye la desinfección de: la cámara de flujo laminar ( esto se realiza con cloro al 10%, y etanol al 75%), las manos y antebrazos del cultivador con etanol al 75%, desinfección de todos los instrumentos a utilizar flameándolos, desinfección superficial de todos los recipientes que se introducen en la cámara y requiere trabajar lo más cerca del mechero y los mas adentro posible de la cámara (Mroginski y Roca, 1991).

**3. Medios de cultivo:** el medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Este incluye nutrientes minerales (macronutrientes: C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg y micronutrientes: B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl), Una fuente de carbono ya que muy pocos explantes son autótrofos, la que comúnmente se utiliza es la sacarosa. Incluye vitaminas, éstas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo vegetal y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son: la vitamina B, en forma de tiamina-HCL, vitamina B6 en forma de piridoxina-HCL, vitamina E, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina y Myo-inositol. También es necesaria la adición de algunos aminoácidos. A menudo el medio que contiene todos estos componentes se le denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento, algún antioxidante u otras sustancias (Mroginski y Roca, 1991).

**a. Agente gelificante:** en los medios semisolidos comúnmente se utiliza agar (0.6% a 1.0%), pero debe considerarse siempre la pureza del agar; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas del cultivo. (Mroginski y Roca, 1991).

**b. Reguladores de crecimiento:** en algunos casos se obtienen los cultivos *in vitro* sin necesidad de emplear reguladores de crecimiento. Los reguladores de crecimiento más utilizados son las auxinas y las citocininas. Las giberelinas son necesarias en el cultivo de meristemos de algunas Solanaceas.

Las auxinas que mas se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-D, ANA, AIA (Ácido Indolacético) y AIB (Ácido Indolbutírico); Las citocininas que más de emplean son: KIN, BAP (Bencilaminopurina) y ZEA. (Mroginski y Roca, 1991).

**c. Sustancias antioxidantes:** son de utilidad para explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventualmente muerte de los explantes (Mroginski y Roca, 1991).

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo .

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborg (1968), o sus derivados, ha sido de gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios MS y B5 es la menor concentración de nitratos en B5. El medio WPM (1980) de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas (Medina , 2005).

**4. Condiciones ambientales para la incubación:** es necesario que los cultivos sean incubados en ambientes controlados por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura; estos factores están relativamente poco estudiados y la información existente sobre ellos suele ser escasa e inexacta.

Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación y duración de la luz. Comúnmente se utilizan lámparas fluorescentes y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Los foto periodos mas utilizados son de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, con una temperatura de 25 a 28 C (Mroginski y Roca, 1991).

#### **D. Propagación de especies forestales por medio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

La propagación de especies forestales por medio de cultivo de tejidos *in vitro* es una técnica que se ha utilizado recientemente, debido a que no había surgido la necesidad de aplicarla como se ha hecho con muchas plantas de uso agrícola, ya que se limitaba a plantar únicamente las especies que se podían reproducir por medio de semilla o por esquejes (siendo estas últimas un número mucho más limitado) (Mesén y Leakey, 1990).

Los primeros estudios sobre la técnica del cultivo de tejidos en especies forestales se iniciaron en la década de 1950, cuando se cultivo callos de *Sequoia sempervirens* para la diferenciación de yemas. Sin embargo en estos ensayos la organogénesis no fue posible sino hasta después de que en la década de 1960 se realizaron investigaciones relacionadas con el enriquecimiento de los medios de cultivo, de acuerdo a los requerimientos de las especies de coníferas cultivadas. La reproducción de especies forestales fue acelerada después que el Dr. Brown en 1974 publicara sus investigaciones sobre la diferenciación *in vitro* de *Pinus palustris* a partir de cotiledones embrionales, siendo ésta la primera conífera producida con la técnica de cultivos vegetales (Hurtado & Merino, 1987). Esto se dio a medida que se observaba que algunas especies forestales tienen dificultades para reproducirse por medio de semillas, ejemplos de estas son las especies que tienen semillas recalcitrantes o que producen un porcentaje bajo de semillas fértiles.

En el caso de la reproducción vegetativa, algunas especies han demostrado tener mucha facilidad para lograr el enraizamiento en esquejes o estacas por medio del uso de reguladores de crecimiento, sin embargo en algunas especies esto todavía no ha sido posible debido a que es difícil realizar el enraizamiento en material maduro, o se desconoce la relación existente entre el comportamiento juvenil y maduro de la especie. (CATIE,1990)

En este contexto, la biotecnología, y más específicamente, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, representa un gran potencial para la preservación y reproducción de las especies forestales con semillas recalcitrantes, con un bajo porcentaje de semillas fértiles, y con dificultades para reproducirse por medio de estacas. (Niella, 2006)

Aparte de esto la utilización de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* ofrece otros beneficios que no podrían obtenerse por la reproducción de semillas ni por estacas, estos son:

- Conservación de material genético *in vitro*. (crío-conservación)
- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo
- Reducción del tiempo de multiplicación, ocupando menos espacio.
- Mayor control de la sanidad del material propagado.
- Facilidad de intercambiar material genético de interés con otros países.

- Realización de mejoramiento genético (Mroginski y Roca, 1991).

En el tema de conservación se ha observado a lo largo de los años que existen algunas especies que presentan una fluctuación en la producción de semillas año con año, la cual está siendo intensificada por la alteración de los ecosistemas naturales, proceso conocido como erosión genética. Es éste un factor muy común en los bosques tropicales y subtropicales del mundo, donde como consecuencia de una sobreexplotación de los mejores ejemplares, son los genotipos inferiores los únicos organismos que darán descendencia, causando un empobrecimiento gradual en la composición del bosque. En este caso la biotecnología ofrece las técnicas de criopreservación por medio de cultivo de tejidos *in vitro*, para poder preservar especies en peligro de extinción, especies endémicas y especies con gran valor ecológico. (Niella, 2006)

Para la realización de mejoramiento genético es necesario tener metodologías que permitan la clonación de los individuos de interés, para esto existen dos opciones: la producción de clones por medio de estacas o por medio de plantas completas regeneradas *in vitro* a partir de estructuras vegetales tales como: yemas axilares, yemas apicales o segmentos de hojas. Sin embargo para realizar mejoramiento genético a nivel molecular, por medio de la ingeniería genética, sólo existe una forma de reproducir y clonar el material mejorado, que es por medio de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*. Por lo tanto la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* en especies forestales permiten la regeneración de plantas completas de manera controlada, eficiente y ocupando menos espacio. Los clones tienen el mismo vigor de crecimiento, calidad de madera o corcho, resistencia a plagas o enfermedades o la misma tolerancia a las condiciones de estrés que los árboles a partir de los que fueron creados. (Niella, 2006)

En algunos países ya se han realizado varios experimentos e investigaciones para desarrollar protocolos que permitan la producción de plantas forestales por medio de cultivo de tejidos *in vitro*, con el propósito de poder establecer metodologías simplificadas que hagan que la producción de vitroplantas sea más accesible y más eficiente. Algunos ejemplos de esto son:

**Cuadro2: Algunos países que han desarrollado experimentos e investigaciones en el cultivo de tejidos *in vitro* en diferentes especies forestales**

País	Especie	Objetivo	Resultados obtenidos
España	<b>Alcornoque</b> ( <i>Quercus suber</i> ) <b>Roble</b> ( <i>Quercus robar</i> ) <b>Encino</b> ( <i>Quercus rotundifolia</i> ).	Conservación de dichas especies.	Se han establecido metodologías para la conservación <i>in vitro</i> de dichas especies, pero aun se tienen limitaciones en la conservación de material adulto, por lo que las investigaciones continúan.
Guatemala	<b>Pinabete</b> ( <i>Abies guatemalensis Redher</i> ) <b>Pino blanco</b> ( <i>Pinus ayacahuite Ehr</i> ) <b>Pino rudis</b> ( <i>Pinus rudis Ende.</i> )	Este programa tiene como objetivo: Rescatar especies en vía de extinción, Propagar especies con dificultad de reproducción convencional. Clonar individuos elite.	En estas especies se ha establecido ya una metodología con la cual se ha logrado la producción de brotes y formación de callo. También se ha logrado el enraizamiento de las plantas obtenidas, sin embargo las investigaciones continúan para afinar la metodología. (Ramírez, 2004)
Colombia	<b>Matilisguate</b> ( <i>Tabebuia rosea</i> )	Desarrollo de protocolo para realizar producción masiva de clones	Se logro definir una metodología para la multiplicación y producción de vitroplantas de Matilisguate, sin embargo la recuperación <i>ex vitro</i> de las plantas micropropagadas ha sido muy baja, por lo que las condiciones de micropropagación se continúan investigando, así como mejores métodos de desinfección y de multiplicación. (Suarez, <i>et al.</i> , 2006)
El Salvador	<b>Cedro</b> ( <i>Cedrela odorata</i> ) <b>Caoba</b> ( <i>Swietenia humilis</i> )	Establecer una metodología de micropropagación de segmentos nodales de cedro ( <i>Cedrela odorata</i> L.) y caoba ( <i>Swietenia humilis</i> ), obtenidos a partir de semilla bajo condiciones de laboratorio.	Hasta el momento la caoba se encuentra en la fase previa de aclimatación <i>in vitro</i> y el cedro en la fase de multiplicación. (Montes, M. E, 2005)
Argentina	<b>Teca</b> ( <i>Tectona grandis</i> ) <b>Araucaria</b> ( <i>Araucaria angustifolia</i> ) <b>Palo Rosa</b> ( <i>Aspidosperma polyneuron</i> )	Conservación de dichas especies.	En el caso de la Teca se estableció un protocolo para la propagación <i>in vitro</i> , con niveles de supervivencia de los brotes superiores del 95%. Con el Palo Rosa se estableció

## Continuación Cuadro 2

	<b>Cedro misionero</b> <i>(Cedrela fissilis.</i> <b>Peteribi</b> ( <i>Cordia</i> <i>tricotoma</i> ) <b>Incienso</b> ( <i>Myrocarpus</i> <i>frondosus</i> ) Plantas de uso medicinal: <b>Cangorosa</b> ( <i>Maytenus</i> <i>aquifolium</i> ) <b>Palo amargo</b> ( <i>Picrasma</i> <i>crenata</i> )		un método de germinación de semillas <i>in vitro</i> , multiplicación axilar a partir de los segmentos nodales obtenidos de las plantas germinados <i>in vitro</i> , enraizamiento y posterior formación de una planta. Esta misma metodología fue también desarrollada para el Cedro misionero en del cual los primeros ejemplares producidos <i>in vitro</i> fueron ya trasladados al jardín botánico. Con el resto de las especies se esta investigando aun los medios nutritivos adecuados, las condiciones para su aclimatación <i>in vitro</i> , así como diferentes ensayos preliminares de desinfección de los explantes. (Niella, 2006)
Costa Rica	<i>Hieronyma</i> <i>alchorneooides</i> <i>Dalbergia retusa</i> <i>Astronium graveolens</i> <b>Caoba</b> ( <i>Swietenia</i> <i>macrophylla</i> ) Almendro ( <i>Diptexys</i> <i>panamensis</i> ) <b>Cedro</b> ( <i>Cedrela</i> <i>odorata</i> )	Para fines de conservación y propagación para mejoramiento genético.	Estas investigaciones se están iniciando pero los resultados que se persiguen es que al termino de este proyecto se pueda contar con metodologías que permitan conservar y multiplicar de forma <i>in vitro</i> especies forestales valiosas. (CATIE,2004) Ya se realizaron pruebas de establecimiento y optimización de la fase de multiplicación en <i>cedrela odorata</i> en el cual se obtuvieron resultados muy buenos, debido a que los explantes se obtuvieron de vitroplantas. (Pérez <i>et al.</i> , 2005)

**1. Limitaciones del cultivo de tejidos *in vitro* en especies forestales:** a pesar de las ventajas de la utilización de esta técnica las plantas leñosas aún presentan limitaciones específicas que impiden el uso extensivo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para realizar forestaciones comerciales, algunas de estas limitaciones son las siguientes:

**a. Contaminación:** A pesar del gran número de especies leñosas obtenidas por cultivo *in vitro*, la contaminación interna y externa de los explantes constituyen aún impedimentos para la micropropagación a gran escala (Sharry, 2001). Otros factores que también afectan el establecimiento *in vitro* son la necrosis apical, la vitrificación, la oxidación, el enraizamiento y la supervivencia *ex vitro* (Niella, 2006)

**b. Edad y desarrollo de las plantas madres:** La edad de la planta madre y el estado de desarrollo representan aún hoy significativas limitaciones para la multiplicación masiva de árboles adultos selectos (Sharry, 2001).

**c. Tiempo y costos:** aunque el cultivo de tejidos *in vitro* permite una alta tasa de multiplicación en menor espacio en comparación con los métodos tradicionales de propagación vegetativa, la aplicación de la técnica consume mucho tiempo y es costosa debido a la labor intensiva necesaria. Aspectos como un mejor conocimiento de la fisiología de árboles, el desarrollo de técnicas que faciliten el autofructificación, la automatización del proceso y una aclimatación más eficaz de las plantas obtenidas podría mejorar el rendimiento y reducir los costos. Una vez que se consiga un mayor control de la embriogénesis somática será factible también el uso masivo de semillas sintéticas en forestaciones clonales, sin dejar de tener en cuenta que los ensayos a campo son un paso final imprescindible para permitir el uso de vitroplantas en reforestaciones(Sharry, 2001).

**d. Falta de reproducibilidad de los protocolos descritos en la literatura:** varios protocolos pareciera que son de aplicación estándar pero en la mayoría de casos deben realizarse modificaciones para poder obtener buenos resultados en la propagación de plantas. Sin embargo en estas pequeñas modificaciones (métodos de preparación de medios, diferente tipo de envases, mayores cuartos de crecimiento, etc.) posiblemente se introducen cambios inesperados y desconocidos, que afectan significativamente los resultados (Sharry, 2001).

**e. Escepticismo en los silvicultores:** todavía existe entre los silvicultores escepticismo con respecto a la aplicación de la micropropagación. Aunque los resultados de las investigaciones indican que varias especies, incluidas aquellas utilizadas para reforestaciones industriales, pueden ser micropropagadas, la aplicación extensa de la técnica en el establecimiento de plantaciones comerciales no es aún evidente. Muchos programas de reforestación se basan en la propagación por medio de semillas, y algunos (en menor cantidad) por medio de esquejes.

La incorporación de sistemas mecanizados y la robotización para el trasplante reducirá los requerimientos de mano de obra; el manejo de información computarizada serán también importantes pasos hacia la producción en gran escala de árboles forestales para propósitos comerciales (Sharry, 2001).

**f. Restricción para especies no industriales:** Respecto a aquellas especies no industriales, pero que revisten importancia por su uso regional, ya sea con el objeto de conservación, bioprospección y utilización en la restauración de ecosistemas degradados o sistemas agro-forestales, así como también, para desarrollar programas de mejoramiento, la aplicación de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* es más restringida. La investigación con estas especies se lleva a cabo mayormente en el sector académico, ya que representan un interés local y sin fines comerciales a corto plazo. Existen pocos antecedentes de trabajos en muchas de estas plantas y el ajuste de protocolos eficientes se dificulta debido a las limitaciones intrínsecas del cultivo de tejidos *in vitro* de leñosas y fundamentalmente por externalidades, como la falta de conciencia de la necesidad de apoyar estos programas. (Sharry, 2001).

### III. OBJETIVOS

#### A. Objetivo general

- Generar información básica en el sector forestal que permita la innovación tecnológica en el uso sostenible de Palo Blanco, a través de la obtención de clones de individuos que posean características superiores por medio del cultivo de tejidos *in vitro*.

#### B. Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta del explante de Palo Blanco (yemas axilares y apicales) al establecimiento *in vitro*.

- Determinar un método eficaz para la multiplicación *in vitro* de Palo Blanco por medio de cinco tratamientos con Bencil-amino purina (BAP).

### III. METODOLOGÍA

#### A. Descripción del área de trabajo

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Investigación de la Universidad Del Valle de Guatemala. El laboratorio cuenta con un área de preparación de medio y preparación del material vegetal a utilizar; un área de transferencia la cual esta equipada con cámaras de flujo laminar y todo el equipo necesario para mantener las condiciones asépticas del lugar; un área de crecimiento con un sistema automatizado para controlar el fotoperiodo y la temperatura; y con un área de esterilización en donde se encuentran las autoclaves para desinfectar el equipo a utilizar así como para el material contaminado.

#### B. Materiales

**1. Material vegetal:** se utilizaron brotes de yemas axilares de plantas de 1 año de edad. Las plantas de las cuales se obtuvo el explante (plantas madres) se seleccionaron con base a sus características fenotípicas, escogiendo las más altas, las mas sanas y las que presentaran un desarrollo superior al de las demás plantas del lote de donde se obtuvieron. Éstas procedían del vivero de la Finca Santa Elisa, ubicada en el municipio de Villa Canales, departamento de Guatemala.

Para obtener los brotes de las yemas axilares se decapitaron las plantas madres retirándoles la yema apical y se les aplicó Kinetina (1 mM) para inducir el crecimiento de estos. La Kinetina se aplicó dos veces, dejando tres semanas entre cada aplicación. Los brotes de las yemas axilares se cortaron con una tijera cuando alcanzaban los 2-3 cm. de largo. Para trasladarlos al laboratorio se les eliminaron las hojas y se colocaron en un recipiente hermético con servilletas húmedas para que no se deshidrataran. Las yemas apicales obtenidas de la decapitación se utilizaron para hacer pruebas preliminares con el fin de evaluar la respuesta del tejido: al medio de cultivo y a distintos tratamientos de desinfección superficial. Ambos explantes (yemas axilares y apicales) se cortaron antes de sembrarlos, a modo de obtener un explante de aproximadamente 1.5 a 2 cm. de alto.

**2. Reactivos, cristalería y equipo utilizado:** los reactivos, la cristalería y el equipo utilizado, fueron los indispensables en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Estos se indican mas detalladamente en el Apéndice 1.

### C. Métodos

**1. Medio de cultivo:** el medio de cultivo que se utilizó como base fue el de Murashige y Skoog (1962), a la mitad de la concentración original (MS/2) con inositol (100 mg/L), sacarosa (3% p/v), tiamina HCl (0.4mg/L) Gel rite (2 g/L) y fue suplementado con ácido cítrico como antioxidante (0.5 g/L). Este se preparó a partir de soluciones madre. En los Apéndices 2 y 3 se encuentran los componentes del medio de cultivo, los componentes de las soluciones madres y la forma en que esto se preparó.

El medio base fue suplementado con distintas concentraciones del regulador de crecimiento Bencil-aminopurina (BAP), con el fin de determinar el mejor tratamiento para la producción de nuevos tallos a partir del crecimiento de yemas axilares. Los tratamientos con BAP establecidos fueron: 1) 0.0 mg/L o control; 2) 2.0 mg/L; 3) 4.0 mg/L; 4) 6.0 mg/L; 5) 8.0 mg/L. Para tener en total 5 tratamientos de los cuales se hicieron 20 repeticiones de cada uno.

El pH del medio se ajustó a 5.7– 5.8 con NaOH o HCl previo a la adición de un agente gelificante (Gel rite<sup>®</sup>). Posteriormente el medio se sirvió en frascos de compota (25-30ml de medio por frasco) en condiciones asépticas, los cuales fueron esterilizados en una autoclave a 121°C y 1.1kg cm<sup>-2</sup> por un período de 30 minutos.

**2. Desinfección superficial del material vegetal:** inicialmente se estableció un tratamiento para realizar la desinfección de los explantes, el cual consistía en lavar el explante cuidadosamente con jabón y abundante agua utilizando un cepillo pequeño. Se recortó un poco el explante y se expuso por 1 minuto en Etanol al 70% en agitación constante utilizando un agitador magnético. Después se introdujo durante 20 min. en una solución de hipoclorito de sodio al 2%. Agregando 2 gotas (20 g/L) de Tween-20<sup>®</sup> siempre con agitación constante.

Los explantes en la solución de hipoclorito, se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se enjuagaron con tres cambios de agua esterilizada.

Este tratamiento de desinfección fue probado inicialmente en las yemas apicales, y los resultados obtenidos fueron negativos ya que el tratamiento fue demasiado fuerte y todas los explantes murieron.

Debido a esto se realizaron modificaciones en la concentración y tiempo de exposición del hipoclorito de sodio lo cual mejoró para las yemas apicales, pero al probarlo en las yemas axilares estas no presentaron una respuesta positiva ya que la contaminación fue muy alta, por lo tanto se tuvo que definir nuevamente el tratamiento adecuado de desinfección para yemas axilares, observando que este es mucho mas complejo. Por esta razón, finalmente se establecen dos métodos de desinfección distintos al que inicialmente se había planteado, uno para yemas apicales y otro para yemas axilares.

**a. Tratamiento de desinfección para yemas apicales de Palo Blanco.** Se lavó el explante cuidadosamente con jabón antibacterial y abundante agua utilizando un cepillo pequeño. Se recortaron un poco y se expusieron por 1 minuto en Etanol al 70% en agitación constante utilizando un agitador magnético. Después se introdujeron durante 10 min. en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Agregando 1 gota (20g/L) de Tween-20<sup>®</sup> siempre con agitación constante.

Los explantes en la solución de hipoclorito, se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se enjuagaron con tres cambios de agua esterilizada.

**b. Tratamiento de desinfección para yemas axilares de Palo Blanco**

**-Tratamiento de las plantas madres con antibiótico Agrimycin<sup>®</sup>:** se realizaron varias aplicaciones del antibiótico Agrimycin<sup>®</sup> (1.2g/1L) a las plantas madres, este se aplicó dos veces por semana durante 1 mes.

**-Desinfección superficial con fungicida previo a la siembra:** los explantes se lavaron con jabón antibacterial y abundante agua utilizando un cepillo pequeño. Se recortaron un poco y se expusieron por 25 min. a una solución que contenía una mezcla de fungicidas que contenía 500 mL de Benomil (1g/L) y 500 mL de Derosal (25 mL/L). Después se expusieron por 1 min. en Etanol al 70% en agitación constante utilizando un agitador magnético. Después se introdujeron durante 8 min. en una solución de hipoclorito de sodio al 3%. Agregando 1 gota (20g/L) de Tween-20<sup>®</sup> siempre con agitación constante.

Los explantes en la solución de hipoclorito, se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se enjuagaron con tres cambios de agua esterilizada.

**3. Establecimiento *in vitro*:** la siembra del explante se realizó en una cámara de flujo laminar previamente desinfectada con Cloro al 10% y etanol al 75%. Todos los instrumentos que se utilizaron fueron esterilizados en una autoclave y flameados antes de utilizarlos.

Antes de sembrar el explante este se recortaron las partes dañadas o afectadas por la desinfección. Se estableció un explante por recipiente.

Los explantes se expusieron a un periodo de iluminación de 16 horas diarias suministrada con lámparas de luz blanca fluorescente.

Los explantes que lograron desarrollarse y no se contaminaron fueron transplantados a medio fresco cada 3-4 semanas.

#### D. Diseño experimental y metodológico

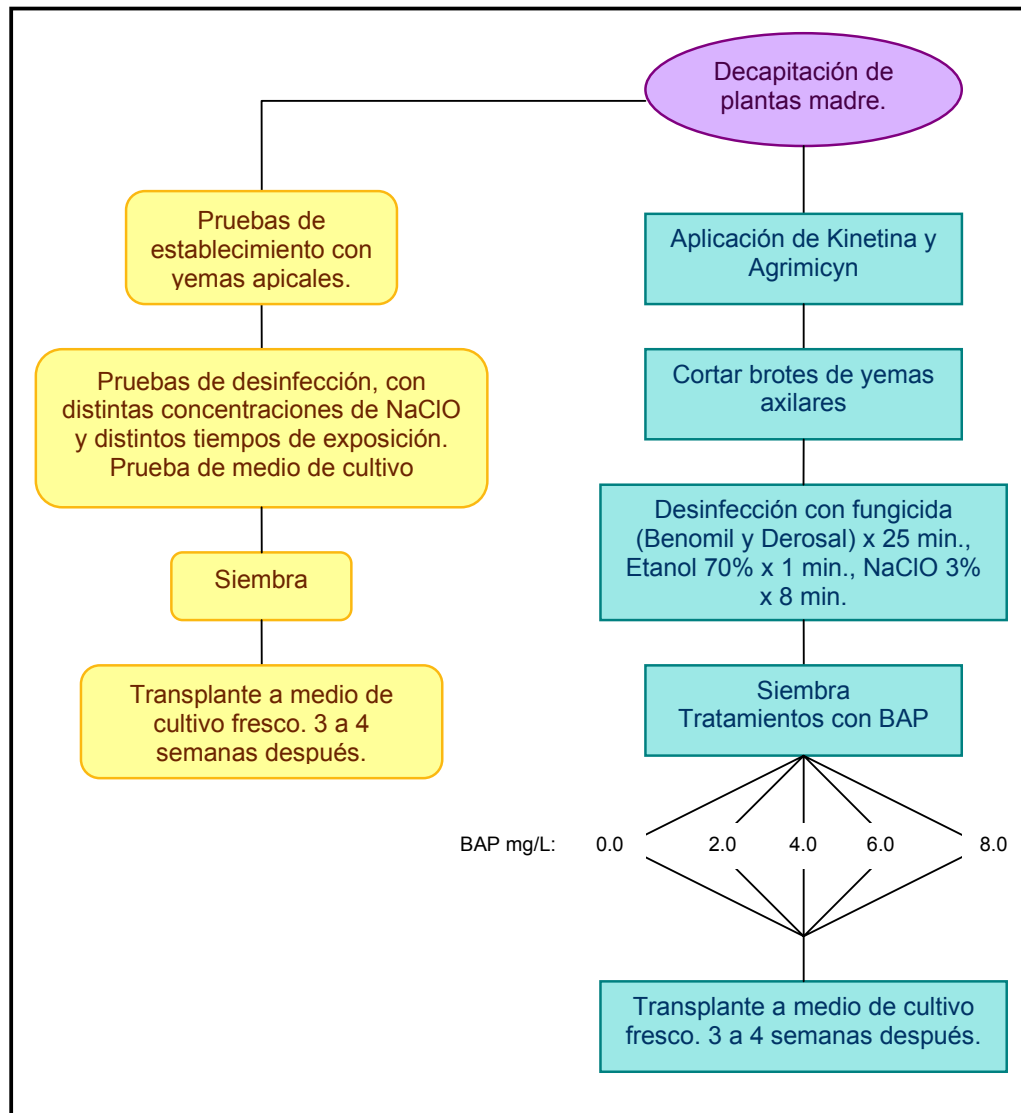
**1. Unidad experimental:** la unidad experimental es un frasco Gerber® con 30ml. de medio y un explante.

**2. Descripción de los tratamientos:** se evaluaron cinco tratamientos como se menciono anteriormente, estos consistían en distintas concentraciones de Bencilaminopurina (BAP): 0.0 mg/L o control, 2.0 mg/L, 4.0 mg/L, 6.0 mg/L, 8.0 mg/L. De cada tratamiento se llevaron a cabo 20 repeticiones. No se sembró todo el material de una sola vez en cada tratamiento, se hicieron cinco siembras en donde se sembraron cuatro explantes por tratamiento.

**Cuadro 3: Descripción de los tratamientos**

Tratamiento	#Unidades experimentales	#Unidades experimentales por siembra y por tratamiento
BAP 0.0 mg/L (control)	20	4
BAP 2.0 mg/L (control)	20	4
BAP 4.0 mg/L (control)	20	4
BAP 6.0 mg/L (control)	20	4
BAP 8.0 mg/L (control)	20	4
Total	100	20 X 5 siembras realizadas=100

**3. Metodología:** la metodología que se utilizó para realizar esta investigación se diseño con base a una revisión bibliográfica de protocolos de propagación *in vitro* para especies forestales, teniendo como modelo principal un protocolo desarrollado en Colombia para la propagación *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Matiliguat) (Suarez *et al.*, 2006); este se eligió por ser la especie taxonómicamente más cercana al Palo Blanco de la cual se encuentra información de este tipo.



**Figura 3: Diagrama de flujo de la metodología**

## IV. RESULTADOS

### A. Respuesta del explante de Palo Blanco a las condiciones *in vitro*.

#### 1. Siembra de yemas apicales



Figura 4: Explante: yema apical

##### a. Primera siembra: yemas apicales de Palo Blanco

FECHA DE SIEMBRA: 12 de abril 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 04 de mayo 2007

MEDIO DE CULTIVO: Medio ½ MS con BAP 4 mg/L.

DESINFECCIÓN:

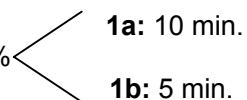
- Se lavó el explante cuidadosamente con abundante agua y con un cepillo pequeño.
- Se expuso por 1 minuto en Etanol al 70%
- Se expuso por 20 min. en hipoclorito de sodio al 2%. Agregando 1 gota (20g/L) de Tween-20®
- El tratamiento con hipoclorito se enjuagó con tres cambios de agua estéril en condiciones asépticas.

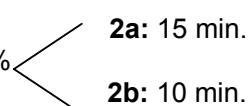
**Cuadro 4: Resultados finales de la primera siembra de yemas apicales**

# Exp. sembrados	# Exp. vivos	# Exp. muertos	# Exp. contaminados	% contaminación	Organismo contaminante	Observación
30	2	22	6	20%	Bacteria	Los explantes murieron por la desinfección que fue muy fuerte.

### Prueba de desinfección

Debido a los resultados obtenidos en la primera siembra se llevó a cabo una prueba de desinfección variando solamente la exposición de los explantes al hipoclorito de sodio (la exposición al etanol se dejó igual) con el objetivo de probar distintas concentraciones y distintos tiempos de exposición, la prueba consistió en lo siguientes:

**Tratamiento 1:** Exposición a hipoclorito de sodio al 2%  **1a:** 10 min.  
**1b:** 5 min.

**Tratamiento 2:** Exposición a hipoclorito de sodio al 1%  **2a:** 15 min.  
**2b:** 10 min.

#### b. Prueba de desinfección: yemas apicales de Palo Blanco

FECHA DE SIEMBRA: 16 de mayo de 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 6 de junio 2007

MEDIO DE CULTIVO: Medio ½ MS con BAP 4 mg/L.

**Cuadro 5: Resultados finales de las pruebas de desinfección en yemas apicales.**

Tratamiento	# Exp. sembrado	# Exp. vivo	# Exp. muerto	# Exp. contaminado	% contaminación	Organismo Contaminante	Observación
1a	5	3	0	2	40%	Bacteria	
1b	5	1	0	4	80%	Bacteria	
2a	5	3	0	2	40%	Bacteria	
2b	5	5	0	0	0%	Bacteria	2 brotaron

#### Observación

Los resultados obtenidos mostraban un dato curioso, ya que la desinfección 2b fue más efectiva que la 2a la cual por lógica se esperaba que diera mejores resultados; en esto posiblemente influyó el número pequeño de repeticiones por tratamiento que fue de cinco explantes, así que para evaluar mejor este resultado se realizó una repetición del tratamiento 2, (2ay 2b).

**b. Repetición de prueba de desinfección con el tratamiento 2 en yemas apicales**

FECHA DE SIEMBRA: 15 de junio 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 20 de junio 2007

MEDIO DE CULTIVO: Medio ½ MS con BAP 4 mg/L.

**Cuadro 6: Resultados finales en pruebas de desinfección con tratamiento 2 en yemas apicales**

Tratamiento	# Exp. sembrado	# Exp. vivo	# Exp. muerto	# Exp. contaminado	% contaminación	Organismo contaminante	Observación
2a	5	3	1	1	20%	Bacteria	El explante que murió era muy pequeño es posible que por esto no haya soportado la desinfección.
2b	5	4	0	1	20%	Bacteria	

Con los resultados obtenidos se estableció finalmente que para la desinfección superficial en yemas apicales la metodología más adecuada a seguir es:

- Lavar el explante cuidadosamente con abundante agua y con un cepillo pequeño.
- Exposición por 1 minuto en Etanol al 70%
- Exposición por 10 min. en hipoclorito de sodio al 1%. Agregando 1 gota (20g/L) de Tween
- El tratamiento con hipoclorito se enjuaga con tres cambios de agua estéril en condiciones asépticas.

De las yemas apicales que sobrevivieron sólo seis mostraron una respuesta positiva al establecimiento *in Vitro*:

**Cuadro 7: Respuesta al establecimiento *in vitro* de yemas apicales**

Fecha de siembra	# explantes	Observación
12/04/07	1	Se observó formación de callo, pero no se observaron brotes.
16/05/07	1	Un explante presentó formación de callo y este empezó a desarrollar pequeños brotes. Los otros dos sólo brotaron no se formó callo.
15/06/07	4	No se presentó formación de callo, sólo regeneración de hojas.

Estos explantes fueron cambiados a medio fresco cada mes, sin embargo se observó que a pesar que el medio estaba suplementado con Ácido cítrico para prevenir la oxidación , el tejido empezó a oxidarse, entonces se trasladaron a medio fresco con la misma composición solo que se le agregó carbón activado.

**2. Siembra de yemas axilares:** habiendo evaluado el establecimiento *in vitro* de las yemas apicales de Palo Blanco se procedió a sembrar las yemas axilares las cuales ya se habían desarrollado en las plantas madre.



**Figura 5: Explante: yema axilar**

La desinfección superficial de las yemas axilares inicialmente se realizó de acuerdo a la metodología que se definió a partir de los resultados obtenidos con las yemas apicales; siendo los resultados los siguientes:

**a. Primera siembra: yemas axilares de Palo Blanco**

FECHA DE SIEMBRA: 15 de junio del 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 06 de julio del 2007

**Cuadro 8: Resultados finales de la primera siembra de yemas axilares.**

Tratamiento	# Exp. sembrado	# Exp. vivo	# Exp. muerto	# Exp. contaminado	% contaminación	Organismo contaminante
Control	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 2 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 4 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 6 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 8 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo

### Observación

La contaminación fue muy agresiva, ésta se expandió y cubrió casi totalmente a los explantes. En todos los frascos se observó primero la presencia de bacteria, a los dos o tres días se observó la aparición de diferentes hongos. Observando esto se modificó la concentración de hipoclorito de sodio aumentándola, debido a que estos explantes parecían ser más resistentes que las yemas apicales. La desinfección se modificó a hipoclorito de sodio al 2%, con un tiempo de exposición de 20 min. todo lo demás permaneció constante. Los resultados fueron los siguientes:

#### b. Segunda siembra: yemas axilares de Palo Blanco

FECHA DE SIEMBRA: 06 de julio del 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 24 de julio del 2007

**Cuadro 9: Resultados finales de la segunda siembra de yemas axilares**

Trata- miento	# Exp. sembrado	# Exp vivo	# Exp. muerto	# Exp. contaminado	% contaminación	Organismo contaminante
Control	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 2 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 4 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 6 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo
BAP 8 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo

### Observación

La contaminación fue muy fuerte nuevamente. Así que se modificó nuevamente el método de desinfección superficial aumentando la concentración de hipoclorito de sodio, tomando como referencia la concentración que se menciona como efectiva en el protocolo para el desarrollo *in vitro* de Matiliguat. La concentración señalada en este protocolo era de hipoclorito de sodio al 3%, con una exposición de 10 min.

#### c. Tercera siembra: yemas axilares de Palo Blanco

FECHA DE SIEMBRA: 09 de julio del 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 24 de julio del 2007

**Cuadro 10: Resultados finales de la tercera siembra de yemas axilares**

Tratamiento	# Exp. sembrado	# Exp. vivo	# Exp. muerto	# Exp. contaminado	% contaminación	Organismo contaminante	Observación
Control	4	0	3	1	%25	Bacteria/hongo	Los explantes que no se contaminaron murieron por la alta concentración de hipoclorito de sodio quedando totalmente blancos al paso de los días.
BAP 2 mg/L	4	0	0	4	%100	Bacteria/hongo	
BAP 4 mg/L	4		1	3	%75	Bacteria/hongo	
BAP 6 mg/L	4	0	1	3	%75	Bacteria/hongo	
BAP 8 mg/L	4	0	2	2	%50	Bacteria/hongo	

### Observación

Con los resultados obtenidos se observó que la desinfección no era adecuada, ya que a pesar de la alta concentración de hipoclorito de sodio la contaminación siguió siendo muy alta, iniciándose siempre por bacteria y precedida por hongos de distintos tipos. Los explantes que no se contaminaron murieron a los pocos días. El único explante que aparentemente estaba con vida quedó en latencia, mostrando un color verde grisáceo, después de la fecha de observación se tomo como muerto.

Debido a los resultados negativos para establecer los explantes en condiciones *in vitro*, se observó que era posible que la contaminación por bacterias fuera endógena. Se procedió entonces a aplicar un antibiótico sistémico a las plantas madres (Agrimicyn®) por un periodo de un mes, haciendo una aplicaciones a las plantas dos veces por semana.

A parte de esto el proceso de desinfección superficial en el laboratorio se modifico adicionando la desinfección de los explantes con una mezcla de fungicidas, que consistió en lo siguiente:

### Tratamiento de los explantes con fungicidas previo a la siembra

- Se preparó una mezcla de fungicidas que contenía Benomil® (1g/L) y Derosal® (25 ml/L).
- Los explantes se levaron con agua y jabón antibacterial
- Estos se introdujeron a la mezcla de fungicidas y se dejaron en agitación constante por 30 minutos.

- Después se aplicó el tratamiento de desinfección 2 el cual consistió en exponer los explantes por 1 min. en Etanol al 70% , seguidamente se expusieron por 8 minutos en hipoclorito de sodio al 3%. Agregando 1 gota (20g/L) de Tween-20®.

#### d. Cuarta siembra: yemas axilares de Palo Blanco

FECHA DE SIEMBRA: 06 septiembre del 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 12 de octubre del 2007

**Cuadro 11: Resultados finales de la cuarta siembra de yemas axilares**

Tratamiento	# Exp. sembrado	# Exp. vivo	# Exp. muerto	# Exp. contaminado	% contaminación	Organismo contaminante	Observación
Control	4			4	%100	Bacteria/hongo	Solamente se observó un explante vivo, el resto que no se contaminó parecían estar en latencia pero finalmente murieron.
BAP 2 mg/L	4	1		3	%75	Bacteria/hongo	
BAP 4 mg/L	4		1	3	%75	Bacteria/hongo	
BAP 6 mg/L	4		1	3	%75	Bacteria/hongo	
BAP 8 mg/L	4		1	3	%75	Bacteria/hongo	

#### e. Quinta siembra: yemas axilares de Palo Blanco

FECHA DE SIEMBRA: 07 septiembre del 2007

FECHA DE LA OBSERVACIÓN: 12 de octubre del 2007

**Cuadro 12 : Resultados finales de la quinta siembra de yemas axilares**

Tratamiento	# Exp. sembrado	# Exp. vivo	# Exp. muerto	# Exp. contaminado	% contaminación	Organismo contaminante	Observación
Control	4			4	%100	Bacteria/hongo	Inicialmente se habían observado mas explantes vivos y no contaminados , pero la contaminación n apareció después de 4 semanas.
BAP 2 mg/L	4			4	%100	Bacteria/hongo	
BAP 4 mg/L	4	1		3	%75	Bacteria/hongo	
BAP 6 mg/L	4		1	3	%75	Bacteria/hongo	
BAP 8 mg/L	4		1	3	%75	Bacteria/hongo	

**B. Multiplicación de los explantes con los tratamientos de Bencil-amino purina (BAP).**

No se obtuvieron resultados con respecto a la fase de multiplicación de los explantes debido a que no se logro su establecimiento exitoso a las condiciones *in vitro*. Por lo tanto no se puede definir que tratamiento sería el más adecuado para la formación de nuevos tallos.

## V. DISCUSIÓN

### A. Respuesta del explante de Palo Blanco al establecimiento *in vitro*.

El establecimiento de los explantes de Palo Blanco a las condiciones *in vitro* fue complejo, debido a que existen dos factores que no se pudieron controlar fácilmente, el más relevante de estos fue la alta contaminación que se dio en ambos explantes y el otro fue la oxidación del tejido vegetal.

La contaminación en general es una de las principales causas que afectan la eficiencia de esta técnica en especies leñosas, debido a que el explante en la mayoría de especies de este tipo es la principal fuente de contaminación (Sharry, 2001) Esto se debe a que el tejido de estas especies permite la acumulación de patógenos tanto externos como internos; mayormente esto se da cuando los explantes provienen de plantas maduras y ya se encuentran lignificados o en proceso de lignificación, ya que la corteza es uno de los tejidos más difíciles de desinfectar. Algunos de los microorganismos contaminantes se encuentran en la planta sin causarle daños aparentes, por lo que la planta madre de donde se obtiene el explante se ve sana.

Esto se pudo observar claramente ya que las plantas madre de Palo Blanco que se utilizaron se encontraban sanas, en un lugar aislado de otras especies y otras plantas que pudieran transmitirles alguna enfermedad, sin embargo se observó que los explantes se encontraban contaminados principalmente con bacterias que aparecían a los 4 ó 5 días después de la siembra. Después de aparecer la contaminación con bacteria se observaba una proliferación de hongos de distintos tipos, los cuales no se identificaron.

En las siembras experimentales que se realizaron con las yemas apicales provenientes de la decapitación de las plantas madre, se observó el mismo patrón de contaminación, aunque en este caso pudo controlarse mejor y se logró obtener seis explantes que si pudieron establecerse pero su desarrollo posterior se vio limitado por la oxidación del tejido regenerado. En el caso de yemas apicales la desinfección se facilita de cierta forma, debido a que estas son estructuras que no están tan expuestas a la contaminación externa ya que están protegidas por ramas laterales y por pequeñas hojas que envuelven el meristemo apical, esto permite que al eliminar las ramas laterales y las hojas más externas antes de la siembra, pueda obtenerse una porción de tejido libre de contaminación. De igual forma el meristemo apical no está expuesto a la contaminación interna de la planta ya que éste carece de tejidos vasculares, que es por donde se propagan algunos patógenos (Medina, 2005).

Sin embargo en este caso no se podía sembrar solo el meristemo apical sin los primordios foliares, así que se sembró la estructura completa, dejando el explante un poco mas grande para evitar que este muriera, pero a su vez esto trajo como consecuencia una mayor probabilidad de contaminación.

Estas ventajas no se tienen en las yemas axilares, estas están mas expuestas a la contaminación externa por su forma y por su posición en la planta, y también están más expuestas a la contaminación interna por su comunicación directa con el tejido vascular, por lo que son estructuras mucho mas difíciles de desinfectar. Eso pudo comprobarse porque la contaminación que se presentó fue severa, siendo la mas alta 100% y la mas baja 75%.

Esta se trató de controlar por varias formas: primero por medio de la desinfección superficial del explante y segundo por la desinfección interna de la planta madre. En la primera, se trató al explante con dos soluciones desinfectantes que comúnmente se usan en cultivo de tejidos, una es el Etanol al 70% y el hipoclorito de sodio.

La acción del hipoclorito de sodio como desinfectante se orienta hacia cualquier especie de organismos microscópicos y submicroscópicos; su eficacia depende de tres aspectos importantes, que son: la concentración, el tiempo de contacto y el perfecto contacto del producto con el material a tratar. Como cualquier otro desinfectante este es menos eficiente en superficies o tejido con suciedad, por esta razón es muy importante limpiar previamente el explante con agua, jabón y etanol.

Este desinfectante se utiliza comúnmente en la mayoría de proyectos de cultivo *in vitro* por ser económico, fácil de conseguir y por no ser tan tóxico para el explante (siempre y cuando se utilice a una concentración adecuada). Este ultimo punto es muy importante, como señala Mroginski y Roca (1991) ya que uno de los principales problemas de los agentes desinfectantes es que son tóxicos para el explante, y esto se debe principalmente a que son difíciles de remover del tejido que ha sido expuesto, aun realizando varios enjuagues con agua.

En cultivo *in vitro* de guanaba, guayaba, cedro, caoba, encino, Matiliguat y coníferas (todas especie leñosa), se utiliza el hipoclorito de sodio como desinfectante en distintas concentraciones y tiempos de exposición, inclusive este se utiliza para desinfectar semillas para la producción de vitroplantas. Y aunque los resultados obtenidos aun son afectados por la contaminación, se ha demostrado que éste actúa mas eficazmente que otros agentes desinfectantes que también se utilizan en cultivo de tejidos como el nitrato de plata y el cloruro de mercurio. Estos últimos no son tan económicos ni fáciles de conseguir, aparte de esto Ramírez

(1991) reporta que en algunas especies (como la guayaba y Encino por ejemplo) están asociados a un posible efecto tóxico sobre el explante, lo que provoca que se elimine totalmente la microbiota pero también se ocasiona la muerte del explante. Para utilizar estos agentes desinfectantes se deben manejar dosis muy bajas y hacer varias pruebas previas para no perder el material vegetal.

Por estas razones se trabajo con el hipoclorito de sodio, y se observó que utilizándolo a bajas concentraciones (1%) la contaminación que se presentó era muy alta en las yemas axilares, pero no así en las yemas apicales. Si se aumentaba la concentración de la solución al 2%, se observó que las yemas axilares toleraban cierto tiempo de exposición, aproximadamente 20 minutos, pero aún así persistía la contaminación. Algunas yemas axilares soportaron la desinfección con hipoclorito de sodio al 3%, pero con un tiempo de exposición de 8 a 10 minutos máximo, sin embargo la contaminación de los explantes, que no murieron durante la desinfección, se siguió presentando.

Con estas observaciones se pudo determinar que la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición mas adecuado para desinfectar las yemas apicales era 1% por 10 minutos. Este tratamiento permitió que se lograra una desinfección adecuada del explante, obteniendo los porcentajes mas bajos de contaminación (cuadro 5 y 6), y permitió que éste tuviera una respuesta positiva e iniciará su desarrollo. Aun así, por el número reducido de repeticiones que se realizaron con las yemas apicales, se sugiere probar este método de desinfección con un mayor número de explantes para poder observar que tan significativo es el porcentaje de contaminación.

En el caso de las yemas axilares los resultados no fueron muy alentadores utilizando el mismo método de desinfección que se utilizó para las yemas apicales. Los porcentajes de contaminación fueron de 100% (cuadro 8 y 9) y en algunos casos fue de 75% o 50% (cuadro 10) porque el resto de los explantes murieron en el proceso de desinfección. Se observó que la contaminación no se debía al medio de cultivo ni a las condiciones de asepsia del lugar, ya que se observó que el medio de cultivo previo a la siembra nunca se contaminó, si no que las bacterias surgían del explante.

Inicialmente se pensó que eran bacterias endógenas así que se procedió a realizar una desinfección sistemática a las plantas madres con el fin de eliminar las bacterias del sistema vascular de la planta. Para esto se utilizó el antibiótico Agrymicin®, el cual actúa eficientemente en plantas leñosas. Aparte de esto se observó que otro problema era la aparición de hongos después de la contaminación con bacteria, entonces se realizó una desinfección superficial del explante, en el laboratorio antes de la siembra, con dos fungicidas: Benomil y Derosal. El primero es un fungicida sistémico que mata la espora del hongo al contacto y tiene una rápida penetración en el interior de los tejidos de la planta llegando a los sitios en donde se encuentra el hongo y deteniendo la infección, ya que tienen un efecto prolongado. El segundo es un fungicida sistémico que tiene un amplio espectro de control impidiendo el crecimiento del hongo, éste es muy eficiente en especies leñosas y ornamentales.

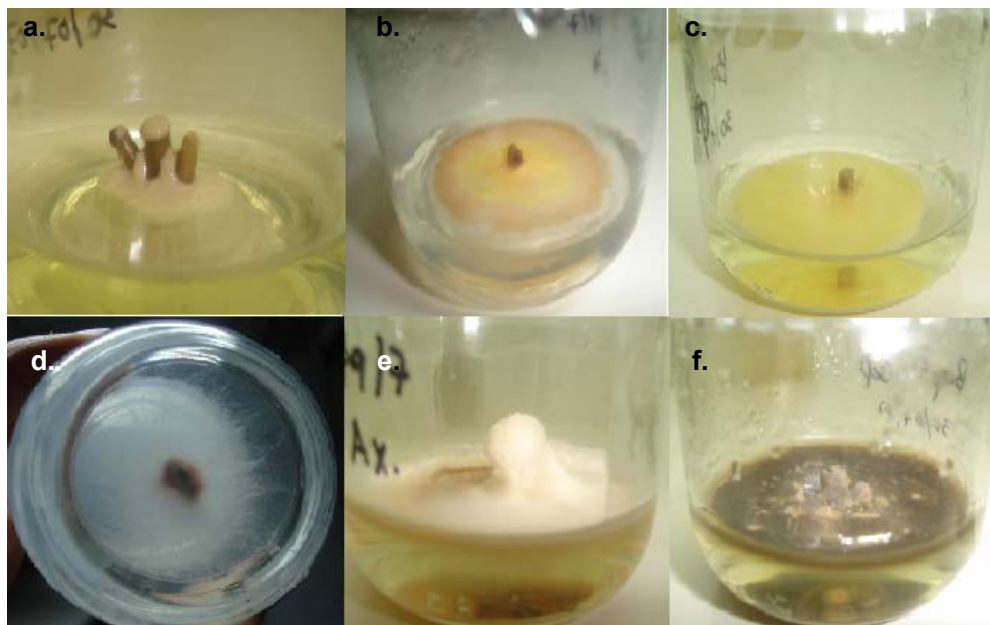
Sin embargo la contaminación persistió, pero se pudo observar que las bacterias no son endógenas si no que se encuentran alrededor del explante como se puede observar en la siguiente figura.



**Figura 6: Contaminación de yemas axilares por bacteria**

Esta es una fotografía tomada en la base del frasco; alrededor del explante se nota un anillo de color naranja pálido que es la colonia bacteriana que empieza a formarse. Al transcurrir los días esta se expande y aparecen encima distintos tipos de hongos como puede observarse en la figura 5. Las observaciones finales de cada siembra se realizaron a las cuatro semanas de su realización, para dar tiempo a que el explante se adaptara al medio y se pudiera evidenciar algún signo de contaminación, sin embargo en algunos explantes no se evidenció contaminación

alguna y se observaba que el explante estaba con vida, pero a las 5 ó 6 semanas empezaban a aparecer las pequeñas colonias de bacterias. Con estas observaciones es evidente que la bacteria se encuentra en el explante y esta es muy resistente, ya que persiste a pesar de los tratamientos severos de desinfección.



**Figura 7: Contaminación de yemas axilares por bacteria y hongos**

a. Después que surge el anillo de bacterias alrededor del explante éstas empiezan a expandirse cubriéndolo. b. Mezcla de distintas colonias de bacterias y en la orilla se observa una mancha blanca que es un hongo. c. Explante casi cubierto por la colonia bacteriana. d. Explante rodeado de bacterias de color rosado y cubierto por un hongo blanco. e. Explante totalmente cubierto por bacterias y hongos. f. En este explante se observa un hongo distinto de color café oscuro, también se presentaron hongos de color verde y negro.

En la literatura, se hace mucha mención a este tipo de dificultades en el establecimiento *in vitro* de especies forestales.

Suárez, Jarma y Ávila (2006) mencionan que la desinfección de explantes aislados de plantas leñosas perennes es compleja y esta ha representado siempre una de las limitantes más severas para el establecimiento *in vitro* de este tipo de especies reportándose contaminaciones de 100% y con frecuencia mayores del 90% por ejemplo en explantes de guayaba dulce (*Psidium guajaba* - Mirtaceae), caoba y cedro. Los métodos de desinfección casi siempre se han tenido que complementar con enjuagues previos de fungicidas y bactericidas más la desinfección superficial con hipoclorito de sodio o algún otro agente desinfectante. Aun así estos métodos no son suficientes para eliminar completamente los contaminantes presentes en la superficie de los explantes y en el interior de los mismos; inclusive se ha podido observar presencia de contaminación en explantes sanos después de varios

subcultivos debiéndose probablemente a infecciones de expresión tardía. Para superar estas limitaciones es indispensable el uso técnicas que permitan la detección de patógenos sistémicos y su desinfección superficial.

En el Protocolo utilizado como guía se reportan datos de contaminación muy similares a los obtenidos en este trabajo, siendo el porcentaje de contaminación más alto %100 y el más bajo %73. En trabajos realizados con coníferas específicamente con el género *Abies*, según González (2000) la contaminación también es muy alta hasta de 100% y los porcentajes mas bajos que se citan son de 20%, utilizando como desinfectante cloro comercial puro, y como explante yemas apicales quitándole las capas de escamas hasta dejarlos de 1 mm. de altura.

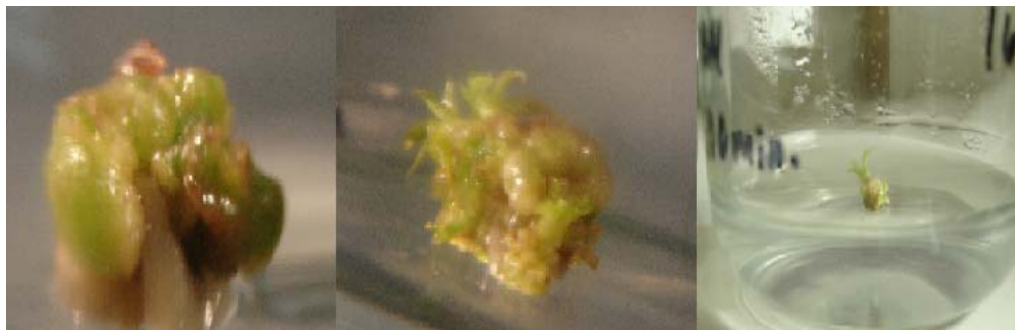
Otra forma en que se ha logrado bajar los porcentajes de contaminación es extrayendo las yemas, ya sea apicales o axilares de plantas germinadas *in vitro* (vitroplantas) (Montes, M. E ,2005) de esta forma se obtienen explantes totalmente estériles, pero esta metodología no iba de acuerdo a la perspectiva ni la finalidad de esta investigación como se explica más adelante.

Los explantes que lograron establecerse fueron seis yemas apicales y una yema axilar la cual presento cambios positivos y no se observó contaminación a las cuatro semanas (figura 8), sin embargo a la quinta semana empezó a surgir la contaminación por bacteria.



**Figura 8: Yema axilar iniciando la formación de callo**

Algunas yemas apicales que mostraron respuesta positiva empezaron a formar callo como se puede observar en la figura 9, y del callo salieron aproximadamente cuatro brotes.



**Figura 9: Yemas apicales que formaron callo y brotes.**

En otras yemas no se dio formación de callo si no que se indujo la producción de hojas, figura 10.



**Figura 10: Yemas apicales que regeneraron hojas**

La respuesta fue distinta debido a que unas yemas apicales se sembraron en medio MS/2 sin reguladores de crecimiento sólo con antioxidante (ácido cítrico) y otras en medio MS/2 suplementado con antioxidante y 4.0 mg/L de BAP. Estas variaciones se hicieron con el único objetivo de observar el efecto del regulador de crecimiento en el tejido vegetal, como parte de las pruebas preliminares que se hicieron en las yemas apicales. El regulador de crecimiento (BAP) por ser básicamente citocininas actúa en las células meristemáticas promoviendo su rápida división, y es esto lo que da lugar a la formación del callo. De estas células algunas tienen la capacidad de diferenciarse y se inicia la regeneración de una nueva planta con cada brote. En el caso en donde el medio no contenía el regulador de crecimiento, el explante continúa creciendo y desarrollándose como lo hace

normalmente en la planta, por esta razón se induce la producción de hojas en las yemas apicales y no se forma callo.

Pero aquí se encontró la segunda dificultad del establecimiento *in vitro* para el Palo Blanco ya que el tejido vegetal que se logró regenerar o producir se oxidó rápidamente. Este factor se había controlado inicialmente cuando al sembrar las primeras yemas apicales se observó que con el paso de los días estas tenían una apariencia necrótica, y se procedió a adicionar al medio de cultivo ácido cítrico como antioxidante. Los resultados fueron buenos ya que el material vegetal dejó de oxidarse, sin embargo las hojas nuevas y el callo empezaron a oxidarse a pesar de realizar trasplantes a medio fresco, como se puede observar en la figura 11. Por último se transplantaron a medio de cultivo con carbón activado, pero la oxidación no se detuvo.



**Figura 11: Oxidación del tejido vegetal regenerado.**

Como cita Gonzáles (2000) uno de los factores que influye negativamente en el crecimiento y en el enraizamiento de los explantes es la oxidación, la cual detiene el desarrollo de los mismos. La luz es uno de los factores que puede influir pero no se tiene mayor conocimiento en el tema y no existe información suficiente para determinar la influencia de este factor.

Mroginski y Roca (1999) también hacen mención que el factor de la iluminación es influyente en la oxidación del tejido, diciendo que en estos caso también es importante evaluar incubar los cultivos en oscuridad o a bajas intensidades de luz.

Los resultados obtenidos en esta parte de la investigación no muestran mayor variación, debido a que en cada siembra realizada el porcentaje de contaminación fue muy similar y muy alto, por esta razón sería poco significativo utilizar algún parámetro estadístico para presentarlos.

## **B. Multiplicación de los explantes con los tratamientos de Bencil-amino purina (BAP).**

El otro objetivo que se pretendía alcanzar en este trabajo era evaluar que tratamiento con Bencil-aminopurina (BAP) era el más adecuado para la multiplicación del Palo Blanco, sin embargo en este aspecto no se obtuvo ningún resultado debido a que no se logró un establecimiento exitoso del explante, por las razones mencionadas anteriormente.

Existen otros aspectos importante que deben evaluarse, uno de ellos es que no se contaba con información específica para el Palo Blanco, por esta razón se utilizó como guía para el diseño de la metodología un protocolo desarrollado en Colombia para una especie taxonomicamente cercana (Matilisguate), esto debido a que la información que se encuentra disponible en este tema es muy escasa y existen varios proyectos en los que se esta trabajando con otras especies forestales, pero estos no han sido publicados o todavía se encuentran en investigación, se podría decir que este es un estudio pionero en el tema de la propagación *in vitro* de Palo Blanco.

Con la metodología utilizada como guía se esperaba que se pudieran obtener resultados similares en el desarrollo de los explantes que si pudieron establecerse exitosamente a las condiciones *in vitro*, sin embargo no fue así. Es evidente con esto que otra de las limitantes en esta técnica, como lo menciona Sharry (2005) es que existe una falta de reproducibilidad de los protocolos existentes, se ve que estos no tienen una aplicación universal ya que es necesario realizar modificaciones en las metodologías para que puedan adaptarse a las condiciones locales. La técnica de cultivo de tejidos vegetales lleva implícitas una gran cantidad de variables, algunas que aun se desconocen, por esto muchas veces los resultados que se han logrado en determinada especie y en determinado lugar no son reproducibles en otra especie ni en otro laboratorio. Las variables que afectan los resultados van desde la preparación del medio, los tipos de envase, la ventilación dentro del recipiente, las condiciones de asepsia generales del lugar, la salud y estado de desarrollo de la planta madre, el tipo de explante, el tamaño del explante, entre muchas otras cosas, que se mencionaron anteriormente.

Es importante mencionar también que este trabajo perseguía investigar como era la respuesta de esta especie en condiciones *in vitro* para poder obtener clones no por la simple intención de reproducir árboles genéticamente iguales, si no con la perspectiva que la producción de clones es una herramienta para la realización de mejoramiento genético y para la utilización de la biotecnología como herramienta científica para realizarlo. Por esta razón no se trabajo con una metodología para obtener clones por medio de estacas que es lo que comúnmente se hace para reproducir individuos genéticamente iguales.

Sin embargo existe una limitación en la realización de mejoramiento genético por medio de estacas, ya que se ha observado que el enraizamiento y el desarrollo de las estacas es mas favorable cuando estas provienen de una planta joven, a parte de esto la estaca se puede obtener cuando la planta madre tiene cierta edad y para obtenerlas se debe decapitar. Sin embargo esta decapitación, según la especie, requiere que se elimine no solo la yema apical sino un buen segmento del tallo principal. Este es un factor que debe tomarse en cuenta ya que para fines de mejoramiento genético las plantas que se desean clonar deben tener ciertas características que no pueden evidenciarse hasta que el árbol haya alcanzado cierta madurez; a parte de esto la decapitación trae consigo un daño mecánico a la planta que influye en el crecimiento vertical de la misma, y difícilmente ésta logre recuperarlo y desarrollarse como una planta normal.

Aunque para obtener las yemas axilares de las plantas para la clonación *in vitro* también es necesaria la decapitación, esta requiere el corte de pequeños segmentos permitiendo que la planta pueda recuperarse mejor, después del daño producido. Con estas observaciones, y entendiendo que es difícil para cualquier propietario echar a perder sus mejores ejemplares (después de esperar varios años) solo para experimentación, se sugiere evaluar la respuesta a la clonación *in vitro* con otro tipo de explante, inclusive podría probarse con segmentos de hojas, como se ha hecho en plantas como el Arándano por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, existen algunas metodologías en las que los explantes se extraen de *Vitroplantas*, las cuales se produjeron por medio de semillas en condiciones *in vitro* ejemplo de esto es la micropropagación que ya se ha realizado en la especie *Cedrela odorata* (Perez J. 2005), (Montes, M. E. 2005). Pero la finalidad de este tipo de investigaciones no va de acuerdo con la perspectiva del mejoramiento genético, que es lo que se persigue en este trabajo, debido a que con este sistema de propagación sólo se estaría multiplicando material genético

desconocido (aunque se conozca la procedencia de la semilla, ésta contiene información genética de ambos progenitores por ser fruto de la reproducción sexual de la planta), ya que el fenotipo de una plantita producida *in vitro* de semanas o de un mes de edad no puede tomarse como base para realizar una selección de características superiores en un grupo de plantas, ya que estas características son muy variables durante el desarrollo de la planta por lo menos hasta alcanzar la edad de un año, pero idealmente las características que se toman en cuenta para definir un individuo como elite o superior genéticamente se manifiestan a los 2 ó 3 años de edad (en el caso del Palo Blanco).

Por último es importante mencionar que para este tipo de investigaciones se necesita contar con suficiente tiempo para poder observar resultados significativos. Generalmente proyectos de esta naturaleza requieren alrededor de un año como mínimo para hacer un estudio que permita definir un protocolo preliminar del cultivo *in vitro* de determinada especie. Pero en especies forestales los proyectos que se han realizado o se están ejecutando, llevan implícitas varias fases de prueba y aproximadamente tienen una duración de dos años o más según las complicaciones que presente la especie y la importancia que esta tenga (Ramírez, 2004).

Por esta razón este trabajo de investigación pretende aportar información básica para futuras investigaciones en el tema, presentado un adelanto significativo e importante en el comportamiento de la especie para ser reproducida por medio de esta técnica.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se estableció por medio de pruebas y ensayos que el método de desinfección más efectivo para las yemas apicales de Palo Blanco es de un minuto de exposición en Etanol al 70% en agitación constante, luego 10 min. de exposición en hipoclorito de sodio al 1%. Después tres enjuagues con agua estéril en condiciones asépticas.
2. Se logró el establecimiento de seis yemas apicales, sin embargo la oxidación del tejido regenerado detuvo su desarrollo.
3. No se logró definir un método eficiente para la desinfección de las yemas axilares de Palo Blanco.
4. Por lo complejo que fue el establecimiento de los explante a las condiciones *in vitro* debido a la alta contaminación, no pudo determinarse qué tratamiento con Bencil-aminopurina (BAP) era el más adecuado para la multiplicación del Palo Blanco por medio de esta técnica.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Identificar el tipo de bacteria y de hongos que afectan el establecimiento *in vitro* del Palo Blanco, para poder determinar cómo estos pueden controlarse antes de realizar la siembra con el fin de no perder el material vegetal.
2. Reconociendo el tipo de bacteria presente, se sugiere agregar un antibiótico adecuado al medio de cultivo.
3. Evaluar otros agentes antioxidantes para poder controlar la oxidación del tejido vegetal de los explantes, con el fin de permitir el desarrollo de la planta.
4. Para futuras investigaciones se sugiere evaluar la respuesta a la propagación *in vitro* de Palo Blanco utilizando otro tipo de explante, como por ejemplo segmentos de hoja.
5. Se recomienda continuar con esta investigación teniendo como base la información generada, ya que la biotecnología es una herramienta muy útil para realizar mejoramiento genético forestal, no sólo en el campo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* si no también con otras técnicas que tienen otras aplicaciones como los marcadores moleculares.
6. Se sugiere crear espacios de investigación en el tema de genética forestal ya que con lo expuesto anteriormente es evidente que se necesita trabajar en esta área, principalmente con las especies tropicales nativas de gran valor y de otras especies que tienen potencial, pero que no se han tomado en cuenta como especies productivas.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado F., G. García y L. Irungaray. 2005. *Conservación de material genético superior del Palo Blanco (Tabebuia donnell-smithii. Rose), para su propagación y desarrollo comercial*. Guatemala.
2. Castañeda, C. 2004. *Árboles y Arbustos de los Bosques Secos de Guatemala*. Guatemala. 199 págs.
3. CATIE. 1990. *Proyecto Mejoramiento Genético Forestal (MGF) Primer curso corto Centroamericano sobre MGF*. Turrialba, Costa Rica. 1990. 170 págs.
4. \_\_\_\_\_. 2006. *Laboratorio de Biotecnología*. Turrialba, Costa Rica. 2 págs.
5. Francis, J. K. 1989. *Tabebuia donnell-smithii* Rose. New Orleans, EEUU. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 4 págs.
6. Gómez, A. y J. Álvarez. 2006. *Diagnostico del secado industrial de la madera en Guatemala*. Guatemala. 62 págs.
7. González, L. 2000. *Evaluación de dos hormonas para el enraizamiento de explantes de pinabete Abies guatemalensis Rehder Producidas mediante técnicas in vitro*. Guatemala. Universidad Rafael Landívar. 63 págs.
8. INAB. 1999. <<Ficha técnica de especies: Palo Blanco>> *Boletín del Instituto Nacional de Bosques, INAB*. [Guatemala] (8):1.
9. Leakey R. y F. Mesén. *Métodos de propagación vegetativa en árboles tropicales: enraizamiento de estacas suculentas*. Costa Rica. Instituto de Ecología terrestre de Escocia y CATIE. 60 págs.
10. Macz, O. E. 1995. *Manual para la Propagación de Orquídeas in vitro*. Guatemala. PROFASR. Universidad Rafael Landívar. 50 págs..
11. Marcó, M. 2005. *Conceptos generales del Mejoramiento genético forestal y su aplicación a los bosques cultivados de la Argentina*. Argentina. 10 págs.
12. Medina, M. 2005 *Micropropagación vegetal*. España. Universidad de Zaragoza. 2 págs.
13. Mesén F. 1997. <<Potencial del mejoramiento genético en la silvicultura>>. *Revista Agronomía Costarricense* 21(1): 49-53.

14. Montes, M. E. 2005 *Historia del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales*. El Salvador, Universidad Católica de occidente (UNICO). 3 págs.
15. Mroginski L.A y Roca W.M.1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Colombia, CIAT.
16. Niella F. 2006. *Las biotecnologías como instrumento para la conservación de la biodiversidad*. Argentina. Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Misiones (UNAM). 4 págs.
17. Pérez, G. 2004. *Evaluación de la propagación vegetativa de Teca (Tectona grandis L.), Chichique (Aspidosperma megalocarpon Muell.-Arg.), Palo Blanco (Cybistax donnellsmithii (Rose) Seibert) Y Matilisguate (Tabebuia rosea (Bertol.) DC.)*. Guatemala. INAB. 5 págs.
18. Pérez J. F. Mesén, L. Hilje y M. Aguilar.2005. *Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de Cedrela odorata L.*Costa Rica. CATIE. 5 págs.
19. Ramírez E. 2004. Propagación por cultivo de tejidos vegetales de tres especies de coníferas (Abies guatemalensis Redher, Pinus ayacahuite Ehr y Pinus rudis Endl) e inoculación con hongos micorrizicos para inducir el enraizamiento in vitro y ex vitro de las plantas micropropagadas. Guatemala, ICTA. 13 págs.
20. Ramírez M., S. León y A. Urdaneta. 1999. *Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento in vitro de Psidium guajava L. y Psidium friedrichsthalianum (Berg) Nierdz*. Venezuela. La Universidad del Zulia (LUZ).10págs.
21. Sharry, S. 2005. *Problemas asociados al cultivo de tejidos in vitro de especies leñosas*. Buenos Aires, Argentina. Universidad Nacional de La Plata. 2 págs.
22. Standley, P. y J. Steyermark. 1946-1977. *Flora of Guatemala*. Chicago, EEUU. Chicago Natural History Museum, Fieldiana Botany. 10 (3): 218-220
23. Suárez I; A. Jarma y M. Ávila. 2006. *Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (Tabebuia rosea Bertol DC)*. Colombia. Universidad de Cordoba. 11págs.

## **IX. APÉNDICE**

## A. Apéndice I.

### 1. Cristalería , materiales, equipo y reactivos utilizados.

#### Cristalería

- Balones aforados
- Probetas
- Pipetas
- Beackers
- Frascos de compota
- Tapones especiales de plástico para frascos
- Cajas petri estériles

#### Materiales y equipo

- Servilletas estériles
- Parafilm
- Papel aluminio o bolsas especiales para autoclave
- Bolsas para descarte de medio contaminado
- Marcadores para vidrio
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Balanza analítica
- Estufas con agitación
- Agitadores magnéticos
- Micropipeta (1000 )
- Equipo de disección (pinzas y bisturís)
- pHmetro
- Microondas

#### Reactivos

##### Reactivos para preparar soluciones madres

- Nitrato de amonio  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
- Nitrato de potasio  $\text{KNO}_3$
- Sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Sal disódica de EDTA  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- Sulfato de hierro heptahidratado  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato de cinc heptahidratado  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato de manganeso tetrahidratado  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Sulfato de cobre pentahidratado  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Yoduro de potasio KI
- Cloruro de cobalto hexahidratado  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$

- Molibdato de sodio dihidratado  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- Tiamina HCl
- Acido nicotínico
- Pirodixina-HCl
- Glicina
- Mio-inositol

#### **Reactivos para la preparación del medio de cultivo**

- Soluciones madre
- Sacarosa
- Gel rite<sup>®</sup>
- Bencil-amino purina (1mg/1ml)
- Ácido cítrico
- Agua esterilizada
- Acido clorhídrico 1N. (para ajustar pH)
- Hidróxido de sodio 1N. (para ajustar pH)

#### **Reactivos para la desinfección superficial del explante**

- Cloro comercial
- Etanol
- Agua esterilizada
- Benomil<sup>®</sup> (fungicida)
- Derosal<sup>®</sup> (fungicida)
- Jabón antibacterial
- Tween-20<sup>®</sup>

#### **Reactivo para desinfección interna de la planta madre**

- Agrimicyn<sup>®</sup> (antibiótico)

#### **Reactivo para inducir la formación de brotes en las plantas madres**

- Kinetina (1 Mm)

## B. Apéndice II.

Componentes de las soluciones madre para medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

Solución madre	Compuesto químico	Cantidad en medio MS (mg/L)	Cantidad en disolución madre 50X (g/L)	Cantidad a usar por litro para MS (mL)
<b>Macronutrientes</b>				
MS 1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	82.5	20
	KNO <sub>3</sub>	1900	95.0	
MS 2	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	370	18.5	20
MS 3	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	404	20.2	20
MS 4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	8.5	20
<b>Micronutrientes</b>				
MS 5	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	1.865	20
	FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	27.8	1.39	
	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	8.6	0.43	
MS 6	MnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	22.3	1.115	20
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.00125	
MS 7	KI	0.83	0.042	20
	CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.00125	
MS 8	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	0.31	20
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0.25	0.013	
<b>Orgánicos</b>				
MS 9	Tiamina HCl	0.4	0.02	20
	Acido nicotínico	0.5	0.025	
	Pirodixina-HCl	0.5	0.025	
	Glicina	2.0	0.1	
MS 10	Mio-inositol	100	5.	20

### C. Apéndice III.

Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

Componentes	Cantidad para hacer 1 Litro de medio
<b>Medio basal</b>	
Soluciones madre (MS 1 a MS 10)	20.00 mL/L
Sacarosa	30.0 g./L (3%)
Agente gelificante: Agar o se puede utilizar Gel rite®	g./L (8%) 2.0 g/L
Agua esterilizada	Para aforar un balón de 1000 mL
<b>Componentes adicionales:</b> puede adicionarse algún agente antioxidante, uno o dos reguladores de crecimiento, según lo que se pretenda obtener.	

Componentes y procedimiento para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad (MS/2)

Componentes	Cantidad para hacer 1 Litro de medio
<b>Medio basal</b>	
Soluciones madre (1 a 10)	10.00 mL/L
Sacarosa	15.0 g./L (1.5%)
Agente gelificante: Agar o se puede utilizar Gel rite®***	4.0 g./L (4%) 2.0 g/L*
Agua esterilizada	Para aforar un balón de 1000 mL
<b>Componentes adicionales</b>	
Ágente antioxidante: ácido cítrico	0.5 g./L
Solución de BAP 1mg/1mL	Según el tratamiento: Bap2: 2 mL/L; Bap 4: 4mL/L; Bap 6: 6 mL/L; Bap 8: 8mL/L.

\*\*\*En este trabajo se utilizó Gel rite.

#### Procedimiento

1. Para preparar el medio basal se coloca en un balón de 1000 mL, 300 mL de agua esterilizada y un agitador magnético, a éste se agregan 10 mL de cada una de las 10 soluciones madres, en agitación constante.
2. Se agregan 15 g de sacarosa, y se continúa agitando.
3. La solución de BAP se hace por aparte. Esta se prepara pesando 0.1g de BAP el cual se disuelve en unas gotas (5-8 gotas) de NaOH. En un balón de 100 mL se agrega un poco de agua esterilizada y luego se agrega la disolución de BAP y se termina de aforar el balón a los 100ml. para tener una relación de 1mg/1mL

4. Se agregan al medio basal 0.5 g de ácido cítrico y la dosis de la solución de BAP 1mg/1mL (según el tratamiento que se este preparando).
5. Para que todos los nutrientes estén disponibles para las células a cultivar se debe ajustar el pH del medio con NaOH 1N. y HCl 1N. Esto se hace con la ayuda de un potenciómetro y se va agregando gota a gota el NaOH hasta llegar a un pH de 5.7-5.8. En caso se aumente mucho el pH se ajusta con HCl.
6. Por último se agregan 2 g de Gel rite® y el medio se pone 6-7 min. en un microondas.
7. Con el Gel rite® disuelto, se procede a servir el medio en los frascos de compota. Con la ayuda de un pipeteador se agregan 30 mL de medio por frasco.
8. Los recipientes se llevan a la autoclave por 20 min. para esterilizarlos.