



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ
INGENIERÍA BIOQUÍMICA
RESIDENCIA PROFESIONAL

NOMBRE DEL PROYECTO:

PROPAGACIÓN IN VITRO DE
Tabebuia crisantha (Jacq.) G. Nicholson.

ASESOR INTERNO:

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli

ASESOR EXTERNO:

Ing. Elizabeth Álvarez Reyes

PRESENTA:

Salazar Posada Jhony Leonel

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 20 de Junio del 2011

ÍNDICE

Introducción.....	4
Justificación.....	6
Objetivos generales y específicos.....	7
Caracterización del área de trabajo.....	8
Problemas a resolver.....	9
Alcances y limitaciones.....	9
Fundamento teórico.....	10
Oxidación in vitro de especies leñosas.....	10
Desinfección y esterilización.....	12
Medios de cultivo y sus componentes.....	14
Agentes solidificantes.....	15
Constituyentes minerales.....	15
Fuentes de carbono y energía.....	16
Biorreguladores.....	16
Vitaminas y minerales.....	18
Factores físicos.....	18
Iluminación.....	18
Temperatura.....	19
Humedad Relativa.....	19
Acidez del medio.....	19
Estados de desarrollo.....	20
Diferencia entre semillas ortodoxas y recalcitrantes.....	21
Descripción taxonómica de <i>Tabebuia crysantha</i>	22
Distribución y Hábitad.....	23
Floración y fructificación.....	24
Frutos.....	25
Semillas.....	26
Recolección y rendimiento.....	26
Procesamiento de frutos y semillas.....	26
Calidad física y de germinación.....	27

Almacenamiento.....	27
Manejo de especies en vivero.....	27
Contaminación.....	28
Vitrificación.....	29
Problemas fito-sanitario.....	29
Época de seca.....	30
Época lluviosa.....	30
Uso y tráfico.....	31
Materiales y métodos.....	32
Experimentos con semillas.....	33
Experimento con yemas.....	35
Resultados.....	38
Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	40
Anexos I.....	42
Anexos II.....	44
Anexos III.....	46
Índice de figuras.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>Tabebuia crysantha</i>	23
Figura 2: Corteza de <i>Tabebuia crysantha</i>	23
Figura 3: Hábitat de <i>Tabebuia crysantha</i>	25
Figura 4: Flores de <i>T. Crysantha</i>	26
Figura 5: A) Fruto <i>T. Crysantha</i> , B) Flor colectada en campo.....	26
Figura 6: Semillas de <i>T. Crysantha</i>	27
Figura 7: <i>Amblycerus sp.</i>	31
Figura 8: Diagrama de flujo para la metodología del establecimiento con semillas.....	33
Figura 9: Tratamiento de desinfección de semillas antes de entrar a campana.....	34
Figura 10: (En campana) Semillas sin testa.....	35
Figura 11: Diagrama de flujo para el establecimiento de yemas.....	36
Figura 12: Tratamiento de yemas antes de entrar a campana de flujo laminar.....	37
Figura 13: A) Tallo apical de invernadero, B) Segmentación en campana de flujo laminar, C) y D) Yemas establecidas en medio MS ½.....	38
Figura 14: A) Contaminación del medio por bacterias sistémicas, B) Yema con producción de fenoles.....	39

INTRODUCCIÓN

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la década del '50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad.

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano ó tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuales son los principales factores que conforman dicho y que deberán ser controlados.

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación. El presente trabajo tiene como objetivo la propagación *in vitro* de una especie leñosa (*Tabebuia crisantha*).

JUSTIFICACIÓN

Uno de los grandes problemas que se observa últimamente es la pérdida rápida de los recursos naturales y en especial las especies leñosas en las diferentes regiones de nuestro país, debido a la satisfacción de necesidades de leña, forraje y otros productos básicos para la alimentación de la población.

El estado de Chiapas cuenta con altos índices de deforestación, se reporta que en los últimos años se han perdido más de 40,000 hectáreas anuales, ocupando uno de los primeros lugares en pérdida de vegetación a nivel nacional. Para atender esta problemática se han puesto en marcha diversos programas de reforestación, plantaciones y diversificación productiva, los cuales demandan de material seminal de calidad genética y fisiológica. En la actualidad no contamos con información suficiente y detallada de los procesos de cultivo *in vitro* de especies que se encuentran bajo alguna categoría de riesgo, se están aplicando bases biotecnológicas para poder contribuir en gran medida a la conservación de dichas especies.

El Roble (*Tabebuia crisantha*) da una de las maderas más pesadas y duraderas de casi toda América Latina. Madera de gran valor comercial y resistente al ataque por termitas. Se utiliza también en sistemas silvopastoriles linderos, como sombra y ornamental.

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no solo a un mayor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular y también al aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas, en este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas de cultivo *in vitro*: a) mejoramiento genético, b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma y d) micropropagación.

Hasta la fecha la micropropagación ha sido la técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación de la práctica.

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar alternativas para realizar la propagación in vitro de *Tabebuia crysantha*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Obtener un mayor índice de formación de células nuevas, ya que se ha reportado bibliográficamente que las especies leñosas no superan el 2%.

Diseñar un método de desinfección para muestras contaminadas.

Diseñar un tratamiento de desinfección para antes de sembrar nuevos brotes, hojas y yemas.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El siguiente trabajo de investigación se desarrolló bajo el asesoramiento del Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli, investigador y catedrático de posgrado del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez y asesora externa Ing. Elizabeth Álvarez Reyes Coordinadora Regional del laboratorio de Germoplasma de la Secretaría de Medio Ambiente, Vivienda e Historia Natural (SEMAVIHN) ubicado en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Los análisis físico-químicos de las semillas recolectadas en campo se llevaron a cabo en el laboratorio de la SEMAVIHN ubicado en el Jardín Botánico Dr. Faustino Miranda.

PROBLEMAS A RESOLVER

- *T. crysantha* al ser una especie leñosa recalcitrante presenta serios problemas de formación de plántulas para explantes.
- *T. crysantha* tiene grandes problemas de contaminación por bacterias sistémicas, por lo que se necesitan árboles jóvenes.
- Para el establecimiento se necesitan células de un árbol joven para no tener problemas con bacterias sistémicas.

ALCANCES

- Se logró establecer una ruta efectiva de desinfección.
- El establecimiento con yemas resultó en un 90% de establecimiento y formación de células nuevas.

LIMITACIONES

- Debido al corto tiempo no se pudo lograr hacer micropropagación como tal.
- En el caso de las yemas, se necesitan de árboles jóvenes para disminuir la contaminación por bacterias sistémicas y de manera silvestre es muy difícil conseguir dicho material genético.

FUNDAMENTO TEÓRICO

A nivel mundial nuestro país está catalogado dentro de los cinco países con mayor biodiversidad de especies vegetales, por lo que uno de los compromisos es proteger las especies vegetales con las que cuenta México en sus ecosistemas.

Oxidación in vitro de especies leñosas.

La luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de especies en cultivo *in vitro*. Además de la luz y la especie, existen otros factores que son condicionantes para que se produzca oxidación.

El amonio, en concentraciones sobre 8 meq/lit, puede ser tóxico, ya que consideran a la oxidación como uno de los síntomas de toxicidad producida por algunos iones, entre ellos el amonio.

La elevada relación amonio/nitrógeno y a la elevada concentración de amonio y potasio presente en el medio MS, el fracaso de su utilización en muchas especies.

El pardeamiento de los explantes es un problema que se presenta con mayor frecuencia en explantes de especies leñosas y se relaciona con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, que dan como resultado productos tóxicos para el explante (Seemann y Barriga *et al*, 1993)

Tanto los explantes como el medio de cultivo de algunas especies, sobre todo leñosas, una vez puestas en cultivo *in vitro*, tienen la tendencia a manifestar un pardeamiento que, en forma extrema, lleva a la muerte de los explantes. Este pardeamiento se produce por acción de enzimas oxidasas que contienen cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas, que se liberan al herirse los tejidos. La inhibición del crecimiento de los explantes, por otro lado, ocurre por la oxidación de los fenoles y la consecuente formación de compuestos quinónicos, altamente activos.

Según Seemann y Barriga (1993), la prevención de pardeamiento de los explantes y el medio puede manejarse mediante:

- a) la remoción de compuestos fenólicos producidos.
- b) La modificación del potencial redox del medio de cultivo
- c) La inactivación de enzimas fenolasas
- d) La reducción de la actividad fenolásica

Se puede remover los compuestos fenólicos liberados al medio, aplicando algunas de las siguientes medidas: lavado de explantes por 2 a 24 horas antes de su siembra; cambio de medios de cultivo con mucha frecuencia; uso de medios líquidos en una primera fase para dilución de los fenoles, seguido del uso de medios sólidos, etc.; absorción de fenoles mediante carbón activado (3-5 g/L) o polyvinilpolypirrolidona (PVP) de alto peso molecular en concentración de 0,5-2,0%. Estas medidas son esenciales para la sobrevivencia de los explantes durante las primeras 4 a 8 semanas de cultivo. La reducción del potencial redox del medio de cultivo como medida de control de oxidación de fenoles se puede lograr mediante la incorporación al medio de cultivo de alguno de los siguientes compuestos: Glutation reducido (200 mg/L), Feniltiourea (15-20 mg/L) o L- cisteína (10-50 mg/L) y/o sumergiendo el material vegetal en agua destilada estéril, en agua de coco o cultivando en medio líquido estacionario durante unos días, con ello se logra reducir la disponibilidad de oxígeno y por lo tanto la oxidación de los fenoles. Otra técnicas muy utilizada consiste en el uso de sustancias antioxidantes con las cuales se tratan los explantes, entre ellas se h utilizado una mezcla de ácido cítrico (150 mg/L) más ácido ascórbico (100-150 mg/L). La inactivación de las enzimas fenolásicas se puede lograr mediante el uso de sustancias quelantes (FeNa EDTA) en mayores concentraciones que las adicionales normales de los medios de cultivo, mediante el uso de Tirosina más Cobre o bien incorporando al medio Dietilditiocarbamato (DIECA) o Dimetildiocarbamato de Sodio (10-250 mg/L). La reducción de la actividad fenolásica se puede lograr disminuyendo el pH del medio durante la etapa inicial de cultivo. Otra forma de disminuir la oxidacin de fenoles consiste en cultivar inicialmente en ausencia de luz, por períodos de hasta 4semanas.

Según los mismos autores, el problema puede ser disminuido en la práctica mediante las siguientes medidas de manejo:

- a) Incrementando la concentración de agar y/o de sacarosa en el medio de cultivo o reemplazando parcialmente el uso de gelrite por agar.
- b) Mejorando el intercambio gaseoso en el matraz de cultivo por medio del uso de diferentes sistemas de cubierta de estos.
- c) Regulando los niveles de citoquinina. Altas concentraciones de éstas a menudo incrementan el problema.
- d) Aumentando la intensidad luminosa, especialmente en cultivos más exigentes (clavel, espárrago, ajo, alcachofa).
- e) Cambiando el medio de cultivo por otro de diferente composición o reduciendo la concentración de éste.

Se ha descrito principalmente en los géneros *Malus* y *Prunus* (Pieerik *et al.*, 1987).

Desinfección y esterilización.

Es importante iniciar el cultivo en una condición de total asepsia, lo cual implica realizar tratamientos para eliminar de su superficie microorganismos. Además el lugar de trabajo y los materiales deben cumplir con esta condición (Auge *et al.*, 1984).

La desinfección del material vegetal contaminado por bacterias y hongos del suelo, además de saprófitos es siempre difícil y aleatorio.

El hipoclorito de sodio es un esterilizante muy recurrido en los trabajos de cultivo *in vitro*. Frazier (1981), dice que es un poderoso agente antioxidante y potente germicida de

contacto, aunque su efectividad se reduce notablemente en presencia de materia orgánica abundante; los microorganismos son atacados por oxidación o por cloración directa de sus proteínas celulares.

Por otra parte, George y Sherrington (1984), señalan que es posible que se produzcan infecciones internas que pueden constituir un problema importante. Estas son causadas por microorganismos que se encuentran presentes en el interior de la planta, y no pueden ser eliminados por esterilización externa. Frente a este problema, se plantean dos soluciones:

a) Cultivo de meristemos

b) Adición de antibióticos al medio.

Este último, generalmente conduce a fenómenos fitotoxicológicos, por las altas concentraciones necesarias de este producto, inhibiendo su crecimiento y desarrollo además de conducir a la selección de microorganismos resistentes.

La esterilización del material a utilizar se realiza a través de tres formas posibles como son el autoclavado (a presión con vapor en un tiempo y temperatura determinados), irradiación y filtración (Pierrick *et al*, 1987). La asepsia del tejido que se usará en micropropagación debiera comenzar antes de la extracción de los explantes, manteniendo una óptima sanidad de la planta madre. Esto se logra mediante un adecuado programa de aplicación de fungicidas y bactericidas, de modo de reducir drásticamente la carga de organismos contaminantes tanto exógenos como endógenos. En materiales provenientes del campo, cultivos agrícolas o plantas forestales, este tratamiento a menudo no es factible de aplicar en forma tan intensiva como en plantas madres cultivadas en invernadero, por lo que las tasas de contaminación, a pesar de los esfuerzos de esterilización, normalmente va a ser más altas.

El material vegetal extraído de la planta madre debe ser lavado en agua corriente para eliminar todo resto de polvo y contaminantes más gruesos. A continuación es conveniente usar agua destilada con unas gotas de un detergente o producto tensoactivo como Tween 20 u 80 o Teepol. En otros casos se utiliza una solución de etanol al 70%

(Seeman y Barriga *et al*, 1993).

Al probar diferentes desinfectantes y secuencias de tratamientos de desinfección de explantes apicales y axilares, se determinó que la aparición de agentes contaminantes es efectivamente reducida por el tratamiento con HgCl₂ al 0,02% por 5 minutos y el tratamiento con etanol 70% durante un minuto, seguido por la inmersión de los explantes en 5% de hipoclorito de sodio durante 15 minutos.

Medios de cultivo y sus componentes

La micropropagación de especies vegetales exige el uso de medios de cultivo más o menos complejos que están compuestos por macro y micronutrientes, aminoácidos y vitaminas, fitohormonas, compuestos orgánicos complejos, carbohidratos y eventualmente un gelificante. Los medios usados más frecuentemente para promover la organogénesis son los de Murashige and Skoog (1962), White (1963), citados por Roca y Mrogniski (1991).

- Agar (medio inerte para solidificar).

- Solución mineral.

- Solución de vitaminas (Tiamina, Piridoxina, Mioinositol, reforzada en algunos casos con otras vitaminas).

- Aminoácidos (Glicina).

- Fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas)

Con anterioridad, Murashige (1974), había señalado que el medio líquido facilita la libre difusión de las sustancias tóxicas liberadas.

Agentes solidificantes.

El agente solidificante más utilizado es el agar en polvo purificado, en una concentración de 0,5% al 1% (Hartman y Kester *et al*, 1983). El agar presenta varias ventajas, según Torres (1988), sobre los otros agentes gelificantes. Concentración de agar desde 0,5 a 2% disminuye la pérdida de humedad de los tejidos más viejos (vitricación), pero al mismo tiempo reduce el crecimiento de los brotes y enraizamiento potencial.

La concentración usual para el agar es de 0,6 a 0,8%. Si se utiliza una concentración más baja (0,4%), el medio permanece sin cuajar, sobre todo cuando el pH es bajo. Si la concentración es muy alta (1,0%), el medio nutritivo queda muy sólido, haciendo difícil la inoculación. Si se usa una concentración del 0,6%, y el medio no adquiere rigidez, debe corregirse el pH; si éste es más bajo que 4,5 –4,8, un medio con 0,6% de agar, no gelifica.

Constituyentes minerales.

Los medios de cultivo deben contener todos aquellos elementos considerados esenciales para el desarrollo de las plantas, sean macro o microelementos. Los macroelementos, son constituyentes esenciales de los tejidos vegetales e intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas. Los microelementos tienen un papel importante en los mecanismos enzimáticos, como activadores o constituyentes de las coenzimas.

El medio desarrollado por Murashige y Skoog (1962) se considera como un medio rico en nitrógeno amoniacal y potasio, que contiene cerca de 4 veces más nitrato que otros medios.

Los meristemos y, en forma general, los tejidos con actividad metabólica elevada, pueden presentar importantes necesidades en potasio.

Fuente de carbohidratos y energía.

Se ha comprobado que la ausencia de azúcares se convierte en un factor limitante en la organogénesis de los tejidos, presentando una acción metabólica y energética.

Entre otros, los compuestos orgánicos comúnmente usados, se incluye la sacarosa. La glucosa ha sido superior a la sacarosa sólo ocasionalmente.

La sacarosa es generalmente la fuente carbonada que se usa en los estudios de organogénesis, aunque en algunas circunstancias se ha sustituido por glucosa o fructosa. La sacarosa puede asimismo estimular la formación de callos.

Biorreguladores.

Entre las citoquininas sintéticas se incluye la kinetina, N6-bencilaminopurina (BAP) y N6 –isopenteniladenina (2ip). Las auxinas comúnmente utilizadas para proliferación axilar y adventicia, comprenden al ácido indol – 3 –acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Las principales acciones que presentan las citoquininas son un efecto muy marcado sobre la división celular, inducen la organogénesis estimulando fuertemente la formación de yemas, son antagonistas de la rizogénesis, estimulan el metabolismo favoreciendo la síntesis proteica y, finalmente, presentan un efecto antagonista de la dominancia apical.

El papel de los reguladores de crecimiento en la organogénesis se ha estudiado intensamente. Usualmente se induce la formación de callos a partir de explantes en medios que contengan auxina (s) o una proporción alta de auxina: citoquinina.

Resulta un fenómeno general que la iniciación de brotes está mediada por la interacción entre auxinas y citoquininas, pero es variable según la especie, determinando concentraciones hormonales diferentes para cada una de ellas. En explantes de órganos, la

formación de meristemas adventicios se da con la estimulación de la división celular por auxinas o citoquininas, o, las dos juntas; éstas divisiones pueden dar origen a estructuras meristematicas, ya sea por organogénesis directa o vía callogénesis, según las hormonas usadas y sus concentraciones.

El AIA se utiliza con frecuencia en estudios fisiológicos, ya que es un compuesto natural con gran capacidad de organogénesis, pero es sensible a temperatura, luz y pH. Por lo mismo análogos sintéticos más estables y poderosos, tales como IBA y ANA, son comúnmente más usados. El 2,4-D, compuesto altamente activo, es la auxina sintética más efectiva para promover callogénesis.

Las giberelinas también pueden tener un papel importante en la organogénesis; aunque generalmente inhiben la diferenciación, algunas veces estimulan la formación de yemas. El efecto inhibitorio de la giberelinas en la diferenciación se puede anular parcialmente adicionando ácido absícico al medio. En presencia de los precursores del AIA (triptófano desaminado oxidativamente), el ácido giberélico puede inducir la formación de raíces adventicias a partir de discos de hojas cultivados *in vitro*, probablemente debido al estímulo biosintético del AIA. Compuestos como giberelinas y ácido absícico pueden tener un papel en el proceso organogénico, sin embargo, en varias especies estos reguladores de crecimiento juegan un papel represivo o no tienen efectos en la formación de órganos *in vitro*.

Según Ellena (1998), la formación de brotes es promovida por niveles altos de citoquininas en relación a las auxinas, mientras las relaciones inversas favorecen el desarrollo de raíces.

La acción de las auxinas depende de su concentración y de sus interacciones con los otros reguladores. En diversos estudios se ha visto que presentan una estimulación de la división celular, lo que conduce a la formación de "callo", y por último posee una acción rizogénica neta.

Vitaminas y aminoácidos.

Cuando las células de las plantas superiores crecen en cultivo, algunas vitaminas pueden llegar a ser limitantes. La tiamina es crítica y generalmente se usa en un rango de 0,1 – 0,4 mg/L. El inositol no es esencial, no obstante, se ha usado a una tasa de 100 mg/L. El ácido ascórbico se usa en combinación con ácido cítrico para evitar oxidación de los explantes.

El mismo autor señala que algunos aminoácidos como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina, pueden ser ventajosos en el medio de multiplicación de órganos.

Generalmente acepta únicamente la tiamina entre 0,1 y 5 mg/L, pues es esencial para el crecimiento continuo. El inositol, puede ser un componente esencial para el crecimiento y la diferenciación de los callos. Activa la organogénesis en cantidades de 50 – 500 mg/L. En cantidades pequeñas, la adición de ácido paraminobenzoico, ácido fólico, cloruro de clorocolina, riboflavina o ácido ascórbico puede estimular el crecimiento . Asimismo, a veces se han señalado efectos favorables del ácido Nicotínico y Piridoxina sobre el crecimiento de los cultivos.

Factores físicos.

La organogénesis puede estar afectada por una gran variedad de factores como luz, temperatura, consistencia del medio, y pH.

Iluminación.

Generalmente la iluminación de las cámaras de cultivo se realiza mediante tubos fluorescentes.

Tanto la intensidad de la luz, como el fotoperiodo pueden ser críticos para la formación de brotes en algunas especies.

Cuando las plántulas sean pasadas a la fase de enraizamiento, es recomendable aumentar la intensidad lumínica.

El fotoperiodo también puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento. Usualmente, un fotoperiodo de 12 a 16 horas con 1000 a 3000 lux es suficiente para inducir la organogénesis; por otra parte, un cambio en la intensidad lumínica puede causar organogénesis, y pueden ocurrir cambios morfo genéticos específicos debidos a la longitud de onda de la iluminación.

Temperatura.

Factor importante de mantener en las cámaras de crecimiento y generalmente varía entre 22 y 25 °C.

Los cultivos de tejidos se mantienen generalmente a 25°C (Thorpe, 1980); sin embargo, las temperaturas que están dentro de 18 y 28°C son también efectivas. Las fluctuaciones entre las temperaturas del día y de la noche pueden estimular la organogénesis. Los tratamientos previos con temperaturas bajas también son efectivos.

Humedad relativa.

Dentro del cuarto de incubación, debiera fluctuar de 70 – 80%. Valores más bajos, a menudo provocan una desecación del medio de cultivo.

Acidez del medio (pH)

Quak (1977) señala que el pH es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de explantes y en general se ajusta entre 5,5 y 5,8. Adicionalmente, con pH bajo se pueden producir problemas de inestabilidad de AIA, de giberelinas, vitamina B1 y ácido pantoténico, precipitación de ciertas sales (fosfatos y sales férricas); retardo en la absorción de NH₄ y licuación de medio.

En la mayoría de los casos, el pH de un medio de cultivo tiende a estar entre 5,5 y 6,0. Murashige y Skoog (1962), reportaron que un pH de 5,7 a 5,8 es adecuado para mantener todas las sales en forma soluble, siempre con niveles relativamente altos de iones fosfato.

En cuanto al control del pH, el tratamiento del medio con autoclave causa una acidificación del medio, la cual es reducida con la adición de agar.

La mayoría de los elementos son solubles en una cantidad favorable para las plantas en un rango de pH entre 5,5 y 7,5; valores superiores a 7,5 determinan frecuentemente diferencias debido a la precipitación de los nutrientes y con pH bajo 5,5 se presentan problemas de excesiva solubilidad. Para un crecimiento efectivo el rango ordinario del pH es de 5 a 6.

Estados de desarrollo

Según Seeman y Barriga (1993), los estados de desarrollo en la micropropagación son:

- | | |
|----------|---|
| Estado 0 | <ul style="list-style-type: none">- Selección y preparación de plantas madres- Desinfección- Nutrición y cultivo adecuado- Eliminación de virus |
| Estado 1 | <ul style="list-style-type: none">- Establecimiento de un cultivo aséptico- Selección de explantes- Fase inicial de cultivo- Obtención de cultivos limpios- Inicio del crecimiento (callo o brotes) |
| Estado 2 | <ul style="list-style-type: none">- Producción de propágulos adecuados- Inducción de brotación adventicia |

Estado 3	- Formación de embrioides - Preparación para crecimiento en ambiente natural
Estado 3a	- Producción de plántulas individuales
Estado 2	- Elongación de brotes formados en para ser llevado a estado 3b.
Estado 3b	- Enraizamiento <i>in vitro</i> o <i>extra vitrum</i> de brotes obtenidos en Estado 3a
Estado 4	- Transferencia al ambiente natural - Regulación de intensidad lumínica y humedad relativa - Formación de ceras epicuticulares - Inducción de autotrofia

DIFERENCIACIÓN ENTRE SEMILLAS ORTODOXAS Y RECALCITRANTES

Semillas Ortodoxas:

Son aquellas que tienen tolerancia a la desecación, cuyo contenido de humedad es posible bajarlo a valores entre 5 a 10 % y guardarlas a temperaturas bajo cero sin dañarlas, y por lo tanto es posible su conservación por períodos largos sin perder su capacidad germinativa. Esta capacidad para tolerar la desecación se debe principalmente a que el proceso normal de maduración, estas semillas van perdiendo humedad y es así que cuando son dispersadas desde el árbol, o bien cuando aún permanecen en él estando maduras, su contenido de humedad es bajo.

Semillas Recalcitrantes:

A diferencia de las ortodoxas, las semillas recalcitrantes no pueden ser almacenadas y tienen escasa longevidad. No están condicionadas ni estructural ni fisiológicamente para resistir la desecación y el frío, al tratar de almacenarlas se presentan los siguientes problemas: daños en la estructura celular provocados por desecación cuando su contenido de humedad se reduce por debajo del 20 %; daños por congelación, provocados por la

formación de cristales cuando se almacenan con altos contenidos de humedad; problemas asociados con el almacenamiento hermético en una condición húmeda, en donde hay falta de oxígeno, contaminación por hongos y bacterias y germinación durante el almacenamiento.

Descripción taxonómica de *Tabebuia Crysantha*.

Árbol de hasta 30 m de altura y de hasta 60 cm de diámetro, caducifolio, ramas escasas gruesas y ascendentes, copa regular y redondeada; fuste seco, cilíndrico con base cónica o alargada.



Figura 1. Árbol de *Tabebuia crysantha*.

La corteza es áspera de color gris a café oscuro, tiene grietas verticales, profundas y forman placas anchas de color café. Las hojas son alternas, digitadamente compuestas, con 5 hojuelas oblongo – ovoides, de 5 a 25 cm de largo y de 8 a 20 cm de ancho, márgenes enteros, ápice acuminado, base obtusa, caducifolia con el as verde y envés verde claro y densamente cubierto por pelos estrellados color café. Las flores son camapanuladas, grandes, en grupos de inflorescencias terminales (panículas), de 5 a 12 cm de largo, de color amarillo claro, muy vistosas con líneas rojas en el cuello.



Figura 2: Corteza de *Tabebuia crisantha*.

La madera está considerada como una de las más duras y pesadas en los neotrópicos, con un peso específico de 0.95 y 1.25g/cm³. El durámen es de color café oliva oscuro y la albura amarillenta rosada y presenta venteado suave. Su grano es recto o entre cruzado, lustre, regular, textura media. Es difícil de cepillar y cortar, durable y muy resistente a las termitas y al agua salada.

Es utilizada en construcción de muebles, carrocerías, pisos para uso industrial, durmientes, artesanías finas, ensambladuras y mangos para herramientas.

La especie ha sido empleada en arboricultura urbana, cercos vivos, decorativos para sombra y embellecimiento de fincas. Es una excelente especie melífera.

DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAD

La especie es originaria de la América tropical, desde México a través de América central, hasta Colombia, Venezuela y Perú. Encontrada en los valles de tierras bajas hacia las zonas de los pies de las montañas, con climas de secos a húmedos y elevaciones desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm, con precipitaciones anuales de 1500 a 3000 mm y temperaturas de 18 – 23°C. No es exigente en suelos, prefiere los suelos de textura franca o franca arenosa con buen drenaje interno y externo y un pH de 6 a 8.5.

En el estado de Chiapas es una especie que se puede encontrar casi exclusivamente de manera silvestre.



Figura 3: Hábitat de *Tabebuia caryanthera*

FORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN

Flores:

Las flores son polinizadas por abejorros y también son visitadas por abejas, avispas y colibrís. Su floración se caracteriza por presentarse en forma explosiva. Es común que todos los árboles de la misma región florezcan simultáneamente. En México la floración se da de Febrero a marzo y la fructificación de abril a mayo; En Costa Rica, la floración ocurre de marzo a abril y la fructificación de mayo a junio. En Colombia, la floración y fructificación se presentan durante todo el año en diferentes localidades.



Figura 4: Flores de *T. crisantha*

Frutos:

Son cápsulas cilíndricas, angostas de 11 a 35 cm de largo y de 0.6 a 2cm de ancho, dehiscentes longitudinalmente, retorcidas con numerosas estrías a lo largo.



Figura 5: A) Fruto *T. Crisantha*, B) Flor colectada en campo.

Semillas:

Aladas, aplanadas de 1.5 a 2cm de largo y 1cm de ancho, de color gris plateado, dispuestas en forma transversal.



Figura 6: Semillas de T. Crysantha.

Recolección y rendimiento:

Los frutos maduros presentan una tonalidad verde amarillenta y en el árbol ya hay algunos abiertos. El árbol puede ser escalado haciendo uso de una escalera y cortando los frutos con garruchas especiales, colocando lonas en el piso para evitar el contacto con el suelo. Los frutos también pueden ser colectados directamente del suelo.

Procesamiento de frutos y semillas:

Los frutos una vez recolectados se transportan en sacos a un lugar techado, donde se secan a la sombra sobre lonas durante 3 días o bien al sol durante un día hasta que se abran y se puedan extraer las semillas manualmente. Las semillas extraídas se asolean durante un día por un periodo de 3 a 4 horas.

CALIDAD FÍSICA Y GERMINACIÓN

Calidad física:

En un kilogramo hay de 40,000 a 55,000 semillas. Se han reportado porcentajes de pureza de 85 a 95% y porcentajes de germinación de 60 a 80%.

Germinación:

La germinación es epígea y se presenta de 7 a 15 días después de sembrada y finalizada a los 25 días.

TRATAMIENTOS PRE GERMINATIVOS

Se recomienda sumergir las semillas en agua a temperatura ambiente por 24 horas.

Almacenamiento:

Las semillas deben ser almacenadas con un contenido de humedad de 7 a 8% en recipientes de vidrio herméticos a una temperatura de 18 °C en cámara de enfriamiento para conservar su viabilidad durante un año. Almacenadas en bolsas plásticas cerradas herméticamente en nevera conservan su viabilidad por seis meses. Las semillas almacenadas en condiciones ambientales pierden su viabilidad en menos de 3 meses.

Manejo de especies en vivero:

La germinación puede ser realizada usando como sustrato arena esterilizada. Se recomienda usar 80g de semillas por cada metro cuadrado de germinador y cubrir las semillas con una capa fina de arena.

La germinación se inicia de 5 a 15 días después y cuando las plántulas alcanzan los 5 cm de altura, deben ser trasplantadas a bolsas. Al cabo de seis meses las plantas están listas para ser llevadas al campo.

Contaminación.

La contaminación de los explantes se puede presentar en forma exógena por deficiente esterilización del material vegetal o en forma endógena cuando se trata de contaminantes sistémicos difíciles de controlar.

En el curso del crecimiento de las plantas, hay muchos microorganismos de la superficie o de la rizósfera que pueden colonizar la planta a través de aberturas naturales, heridas, etc., adicionalmente hay patógenos facultativos y obligados que pueden colonizarla, o penetrarla vía vectores o mediante plantas hospederas. Por las razones indicadas, el micropropagador, para evitar pérdidas económicas importantes o problemas de alargamiento del tiempo de cultivo por contaminación, debiera aplicar una serie de normas de control de calidad fitopatológica relacionadas con:

- a) Conocimiento del rango y ciclo de posibles contaminantes del cultivo
- b) Preparación adecuada de la planta madre incluyendo tratamientos de eliminación de esos patógenos.
- c) Confirmación de la sanidad de los cultivos del Estado I basado en sistemas adecuados de esterilización de explantes y selección de propágulos sanos.
- d) Observación permanente de la presencia de posibles contaminantes de la planta, del laboratorio o de los operadores.
- e) Monitoreo de posibles contaminantes endofíticos latentes bajo el nivel de detección que pueden manifestarse al presentarse condiciones de incubación adecuadas.

Vitrificación.

La vitrificación es un problema que se presenta en ciertas especies herbáceas y leñosas, y se relaciona con problemas fisiológicos que dan como resultado el desarrollo de tejidos vítreos, translúcidos de difícil sobrevivencia al trasplante.

Es un desorden fisiológico que se presenta en ciertas especies herbáceas y algunas leñosas, caracterizado por el desarrollo de tejidos translúcidos, hiperhidratados y succulentos, producto de condiciones poco adecuadas de cultivo. El fenómeno que se manifiesta principalmente en las hojas, afecta a los procesos de fotosíntesis e intercambio gaseoso. Los brotes y raíces también pueden manifestar una anatomía anormal y por lo tanto impedir el establecimiento de plantas micropropagadas *extra vitrum*. La responsabilidad de estos desórdenes fisiológicos puede atribuirse a un exceso de humedad, especialmente en cultivos de medio líquido, un exceso de factores nutricionales, altos niveles de reguladores de crecimiento y baja intensidad luminosa. Los factores clave de la vitrificación parecen ser la humedad relativa y el potencial hídrico dentro del matraz de cultivo.

PROBLEMAS FITO SANITARIOS

Se reportan daños a semillas por gorgojos (*Amblycerus sp*).



Figura 7: *Amblycerus sp.*

Época seca (a mediados de Diciembre hasta principios de mayo):

Arboles sin hojas en bosques secos caducos. Algunas plantas en bosques más húmedos y en parches de bosque seco viejo y perennifolio pueden mantener sus hojas en esta época, pero no hay crecimiento.

Uno o más eventos de floración ocurren a mediados y/o durante los últimos meses de la época seca. Esto ocurre \pm 6-7 días después de unos días de temperaturas anormalmente frías o con algunas lluvias. Las frutas (vainas) se desarrollan y maduran aproximadamente en tres semanas después un evento de floración.

Miles de semillas pequeñas con alas se desprenden de los frutos en los últimos meses de la época seca o el primer mes de la época lluviosa, que forman sombras de semillas cerca de cada árbol que produjo frutos.

Época lluviosa (a mediados de mayo hasta principios de Diciembre):

Los árboles se encuentran sin hojas produciendo tallos nuevos y expandiendo sus hojas nuevas. La mayoría de los tallos nuevos de los crecimientos se expanden en las primeras semanas de la época lluviosa. También, en el primer mes de la época lluviosa, todas las semillas fértiles germinan y producen una mancha breve de plantas pequeñas en el suelo del bosque. Sin embargo en poco tiempo, la mayoría muere.

En uno o dos meses, en las copas de los árboles se desarrollan rebrotes de flores terminan el crecimiento de todos los tallos. Estos rebrotes quedan inactivos hasta la época seca del próximo año.

Durante los otros meses de la época lluviosa, los árboles pequeños y los adultos hacen fotosíntesis pero raramente producen más hojas.

USO Y TRÁFICO:

El principal uso no maderable de esta especie es el medicinal. Se considera que la corteza es eficaz para tratar reumatismo, artritis, cáncer, infecciones, inflamaciones y úlceras, y probablemente sea un buen bactericida y fungicida. Antiguamente se usaba para construir telares de algodón. La madera de esta especie es muy dura y de duramen oscuro, por lo que se usa para trabajos de tornería, construcción de casas, barricas para vino, muebles y cercos. Es muy apreciada como ornamental y se ha sembrado en los separadores de las avenidas y parques de muchos pueblos y ciudades. Presenta varios usos medicinales. La corteza también es usada para hacer papelillos para cigarrillo (López Camacho *et al.* 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el establecimiento de semillas se utilizó la metodología:

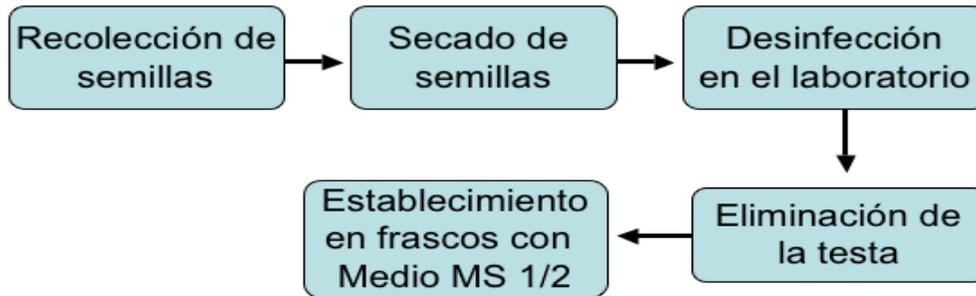


Figura 8: Diagrama de flujo para la metodología del establecimiento con semillas.

Experimento con semillas:

Se emplearon semillas de *T. cysantha*, a las cuales se les dieron un tratamiento de desinfección con agua oxigenada grado reactivo al 11% v/v x 72 horas, se lavó con jabón comercial 10g/l + 5ml de Derosal x 30 min, y en campana de flujo laminar se desinfectó con etanol grado reactivo al 70% x 2 min, se decantó y desinfectó con hipoclorito de sodio al 10% + 3 gotas de tween 80 x 5 min se dio 3 enjuagues con agua destilada y estéril , para proceder con la siembra. A cada semilla se le retiró la testa y se colocaron 4 semillas por frasco con medio MS ½ complementado con Myoinositol 100 mg/l + sulfato de adenina 80 mg/l + sacarosa 30g/l + Thiamina – HCl 10 mg/l + 1 mg/l de BA + 3 g/l de phytigel, el pH se ajustó a 5.8 NaOH y HCl 1N.



Figura 9: Tratamiento de desinfección de semillas antes de entrar a campana.

A) Semillas de *Tabebuia cysantha*, B) Tratamiento con agua oxigenada, C) Semillas sumergidas en Derosal, D) Limpieza con jabón comercial.

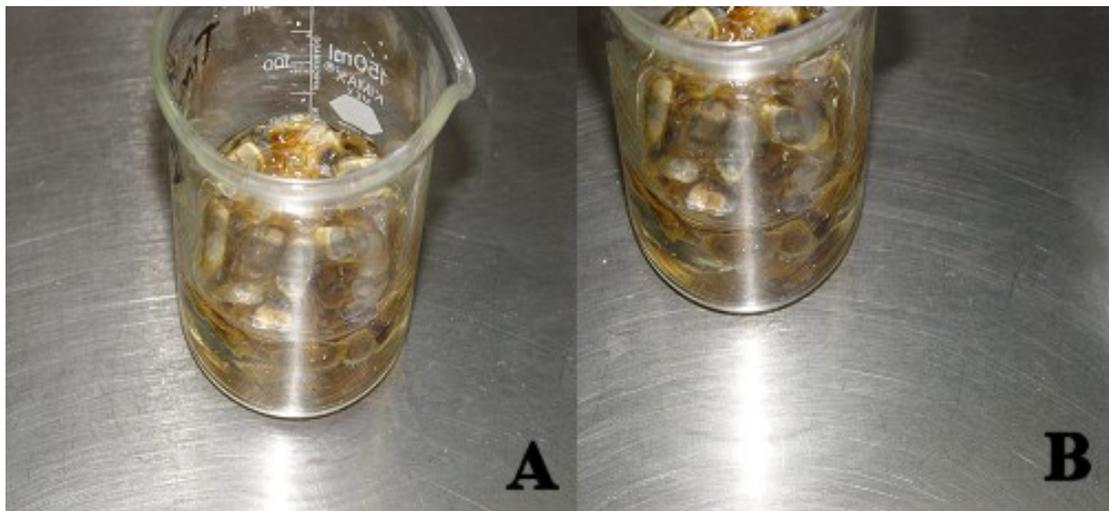


Figura 10: (En campana) Semillas sin testa A) Desinfección con etanol al 70%
B) Enjuague con agua destilada.

Experimento con yemas:

Éstas fueron obtenidas de plantas de un año de edad, se decapitó el tallo apical y se lavaron con jabón comercial 10g/l x ml/l de Derosal x 30 min, se continuó la desinfección con hipoclorito de calcio al 4% x 20 min, después con Rifampicina 300 mg/l x 15 min, se dio un reposo en solución antioxidante elaborada con ácido ascórbico 100 mg/l + 150 mg/l de cisteína x 15 min. Se transfirieron a la campana de flujo laminar y se desinfectaron con etanol grado absoluto al 70% x 2min , se decantó y se desinfectó con hipoclorito de sodio al 10% + 3 gotas de tween 80 x 5 min, se le dieron 3 enjuagues con agua destilada y estéril, para proceder con la siembra. Cada tallo fue segmentado dejando una yema por segmento y se colocaron en tubos de ensaye con medio MS ½ complementado con Myoinositol 100 mg/l + sulfato de adenina 40 mg/l + sacarosa 30g/l + phytagel 3g/l AIA y 4 concentraciones de 2iPen dosis de 0.0, 1.5, 3.0 y 4.5 mg/l, el pH fue ajustado a 5.8 con NaOH y HCl 1N. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 ft² x 20 min. Los explantes fueron transferidos a la cámara bioclimática, sus condiciones de crecimiento fueron de 25 +- 2°C, 35% de humedad relativa, fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y durante las 4 primeras semanas bajo luz tenue y una vez que las yemas brotaron se colocaron en luz directa. El material estuvo en etapa de crecimiento de 8 semanas, al finalizar ese periodo se segmentaron y se colocaron en medio para enraízamiento en medio MS ½ complementado con ANA 1mg/l y se dejó en ese medio por 45 días en las condiciones descritas anteriormente dentro de la cámara bioclimática.

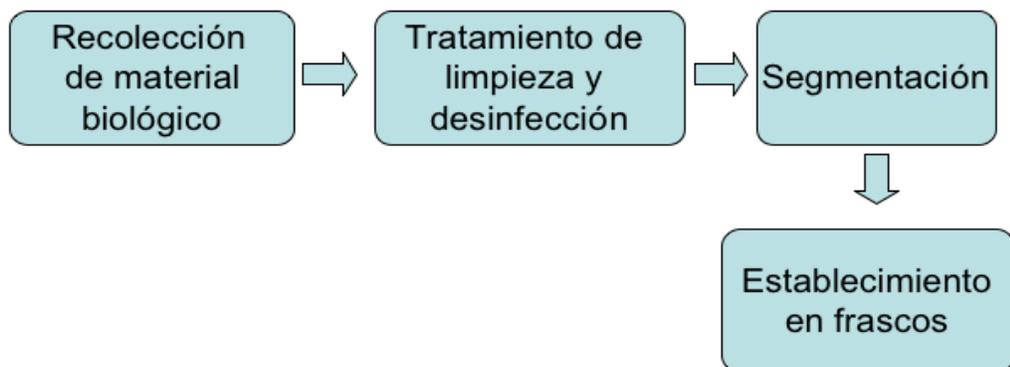


Figura 11: Diagrama de flujo para el establecimiento de yemas.

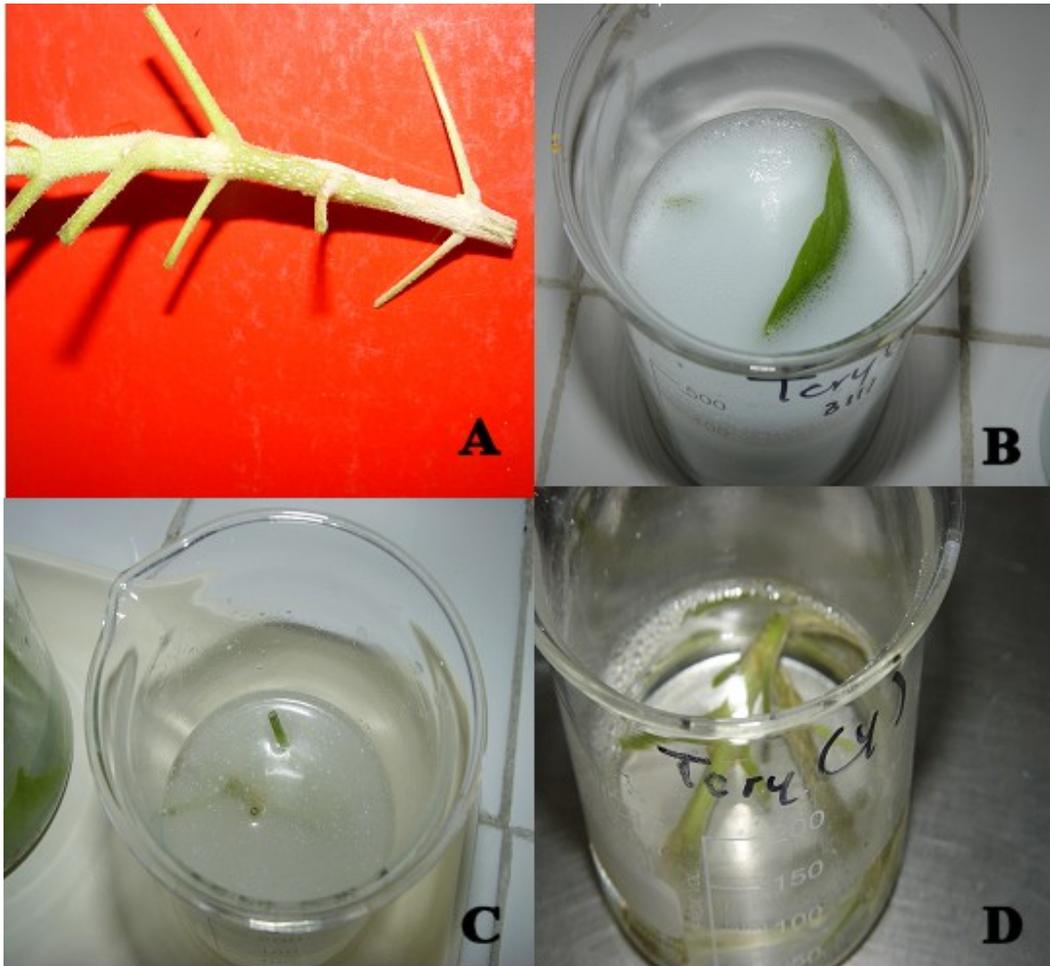


Figura 12: Tratamiento de yemas antes de entrar a campana de flujo laminar.

A) Tallo apical, B) Proceso de limpieza con jabón, C) Segundo proceso de desinfección, D) Yemas en solución anti oxidante.

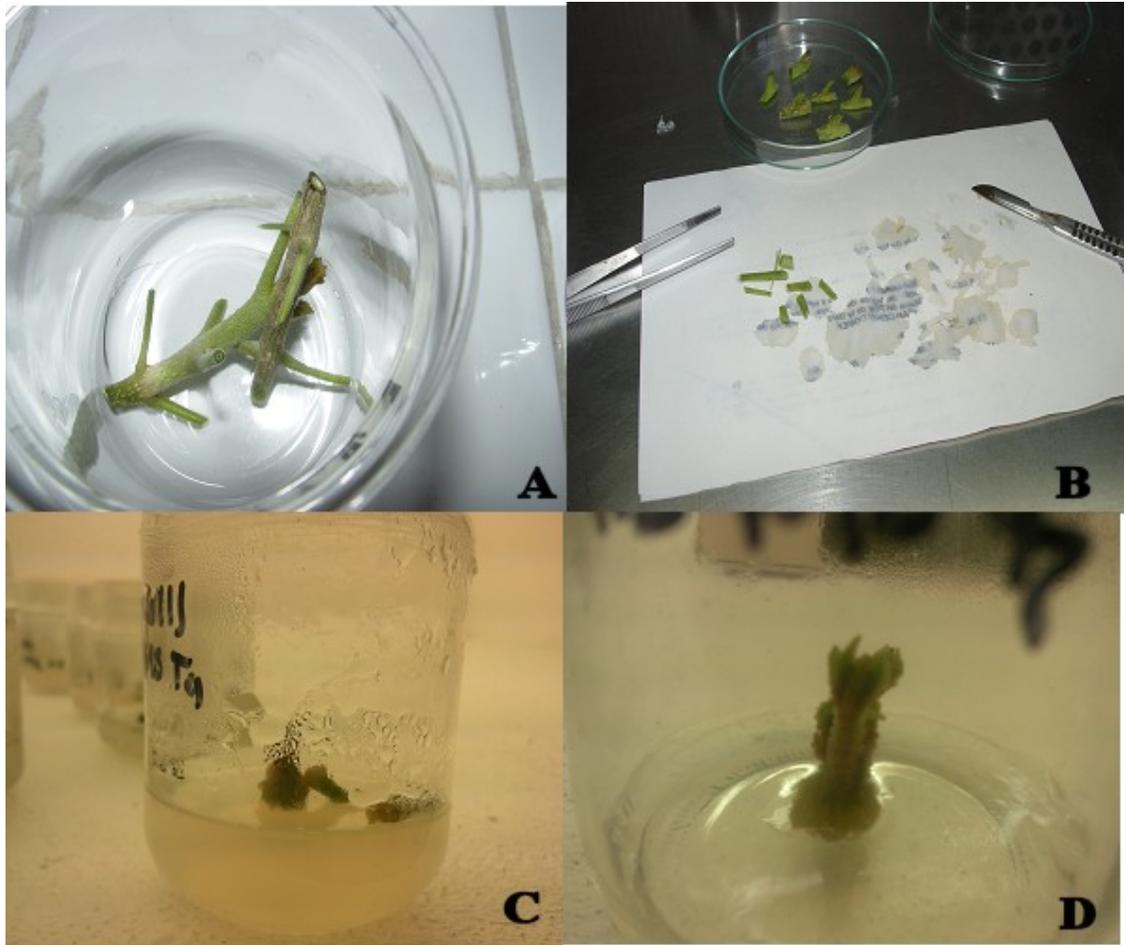


Figura 13: A) Tallo apical de invernadero, B) Segmentación en campana de flujo laminar, C) y D) Yemas establecidas en medio MS 1/2

RESULTADOS

Se presentó contaminación solo en el 10 % de los explantes, predominando la presencia de hongos del género *Fussarium sp.* Se presentaron algunas yemas con presencia de fenoles en el medio, pero se redujo el daño transfiriendo a medio nuevo los explantes. Los resultados de la aplicación de 2iP en las dosis de 1.5, 3 y 4.5 mg/l fueron altamente significativos u al realizar la comparación múltiple de medias mediante la prueba DMS se encontró que la mayor estimulación de yemas axilares se presentó a los 45 días con las dosis de 1.5, 3 y 4.5 mg/l. La mayoría de las yemas axilares solo crecieron 1.5mm, las más grandes se encontraban cerca de la superficie del medio de cultivo, llegando a medir 1cm de longitud. La formación de raíz se presentó en 64 brotes. Varios brotes se dañaron del meristemo apical y murieron posteriormente, los brotes sobrevivientes llegaron a medir 1 cm de largo. Las yemas axilares obtenidas en este experimento se transfirieron a otro medio de cultivo para evaluar su crecimiento de manera aislada.

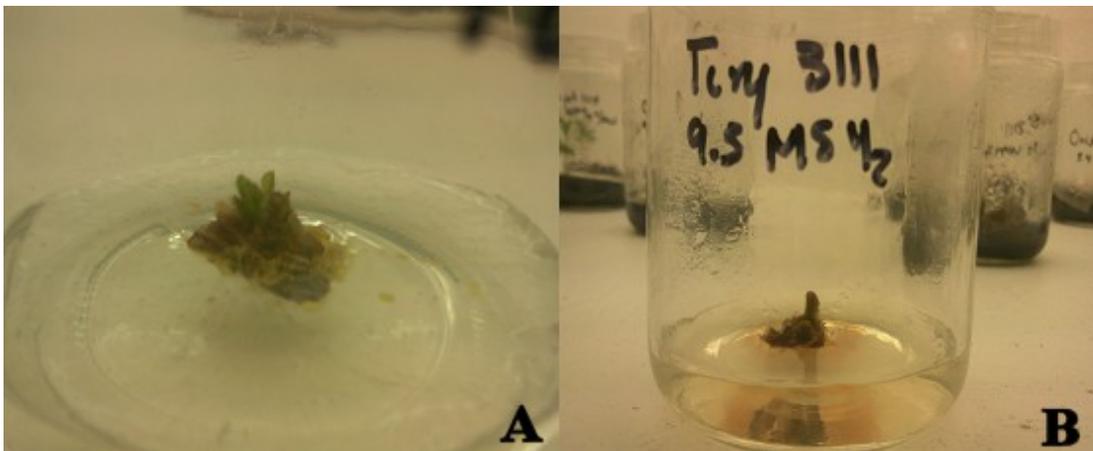


Figura 14: A) Contaminación del medio por bacterias sistémicas, B) Yema con producción de fenoles

CONCLUSIONES

- La ruta de desinfección utilizada para establecer yemas de *T. Crysantha* logró la desinfección del 90% del material establecido.
- La utilización de 2iP en las dosis de 1.5, 3.0 y 4.5 mg/l promueve la formación de brotes con un promedio de 1.5 y 1.7 por explante.
- La auxina ANA en 1 mg/l promueve la formación de raíz en yemas axilares de *T. Crysantha*.

BIBLIOGRAFIA

- Auge, R y Beauchesne, G; Boccon-Gibod J; Decourtye, L; Digat, B; Galandrin, Cl; Minier. R; Morand, Cl; Vidalie,H. 1984. La culture In Vitro. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris. 151 p.
- Ávila M. 2004. Eficiencia del hipoclorito de sodio como desinfectante superficial en segmentos nodales de roble (*Tabebuia rosea*), cedro (*Cedrela odorata*) y abarco (*Cariniana pyriformis*) a nivel in vitro. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Córdoba. Montería.
- Caso O. H. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies ñosas. Agriscientia 9 (1): 5-16.
- Daquinta M., Cid M., Lezcano Y., Pina D., Rodríguez R. 2004. Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en Cedro (*Cedrela odorata*) y Caoba híbrida.
- Ellena, M.1998. Aspetti fisiological e biochimici associati al processo rizogenético del Castagno da frutto e Nocciolo. Universidad de Bologna. Departamento de Cultivos Arbóreos. Italia. 157 p.
- George, E; Sherrington, P 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. 1ª ED. London, Handbook and directory of comercial Laboratories. 309 p.
- González A., Oropeza M., Vargas C. T., García E. 2006. Embriogénesis somática en dos especies del género *Plantago* (*Plantago major* L. Y *Plantago hirtella* Kunth).
- Hartman and Kester.1983. Plant Propagation. 4ª ed. Prentice-Hall, INC., Englewood Cliffs, New Jersey. 702 p.
- Margara, J. 1986. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. 230 p.

- Maruyama E., Katsuaki I., Saito A., Migita K. 1989. Micropropagation of Cedro (*Cedrela odorata*) by shoot-tip Culture.
- Matos A., Acuerero. 2007. Inducción de callo en plantas silvestres de Sábila (*Aloe vera*) con diferentes combinaciones de 2,4-D, BA y kinetina.
- Mora A., Valdéz J., Ágeles G., Musálem M., Vaquera H., 2006. Establecimiento y desarrollo de plántulas de *Tabebuia rosea* (Bignoniaceae) en una selva subcaducifolia manejada de la costa Pacífica de México.
- Murashige and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15. 473-497.
- Murashige, T.1968. Starch accumulation in shoot forming tobacco callus cultures. *Science*, Vol 160: Pp 421-422.
- Pieerik, R. 1987. *In vitro* culture of higher plants. 321 p.
- Quak, F. 1977. Meristem culture and virus-free plants. In : reinert, J and Bajaj, Y.P.S, Eds. Applied and fundamental aspects of plants cell, tissue, and organ culture. Berlin, Germany, Springer-Berlag. Pp 598-615.
- Roca, W y Mrognski, L.1991. Fundamentos y aplicaciones. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos, embriogenesis somáticas y organogénesis. 970 p.
- Suárez I., Jarma A., Ávila M. 2006. Desarrollo de un protocolo para micropropagación in vitro de Roble (*Tabebuia rosea* Bertrol DC).
- Shculer I., Baquero O., Gaona D., Vega E., Rodríguez J., Ramírez C., Nieto V., Hodson E. 2005. Propagación in vitro de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertrol) DC. Ocobo y *Cordia allidora* (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal cafetero).

- Toro M. 2004. Establecimiento de protocolos para la regeneración in vitro de cerezo dulce (*Prunus avium* L) Var. Lambert. P 7 – 21.
- Torres, K.1988. Tissue Culture Techniques for horticultural crops. Published by Van Nostrand Reinhold. New York. Pp 30-55.
- Thorpe, T.1981. Plant Tissue Culture. Academic Press. Inc. 379p.
- Villalobos V., T Thorpe. 1991. Propagación: Conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia 127 - 143.
- Villegas, L; Bravato, M.; Zapata, C.1988. Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción agrícola. Pp 25-39.

ANEXOS

ANEXO I: Glosario.

AIA : Acido 3 Indolacético.

ANA : Acido Naftalenacético.

BAP : 6-Bencilaminopurina.

GA3 : Acido giberelico-3.

Hr . humedad relativa

μM : micro Molar 0.000001 Molar.

MIXa : mezcla formada por BAP 1mg/L + GA3 0,1mg/L + ANA 0,01 mg/L.

MiXb : mezcla formada por AIA 1mg/L + BAP 0,01 mg/L.

MIX 1,5 : mezcla formada por BAP 1,5 mg/L + GA3 0,1mg/L + ANA 0,01 mg/L.

MS : medio Murashige y Skoog.

MS 1/2 : medio Murashige y Skoog con los macronutrientes reducidos a la mitad.

pH : acidéz del medio

PVP : Polyvinilpolypyrrolidona.

T° : temperatura

Anexo II:

Medios cultivo:

Medio MS ½

Medio inicial para crecimiento de *T. Crysantha*.

Macroelementos	50	ml/l
Microelementos	50	ml/l
Quelatos	5	ml/l
Vitaminas	2.5	ml/l
Mioinositol	0.1	g/l
Sacarosa	30	g/l
Tiamina	10	mg/l
Sulfato de adenina	40	mg/l
Ácido indol acético	3	mg/l
Agar	8	g/l
Fosfato de sodio	0.5	g/l
2iP	0	mg/l
	1.5	mg/l
	3	mg/l
	4.5	mg/l

pH 5.8 (ajustado con NaOH 1N y HCl 1N)

Medio para segmentación y cambio de medio de callo *T. Crysantha*.

MS ½

Macro elementos	50	ml/l
Micro elementos	50	ml/l
Quelatos	5	ml/l
Y.t	2.5	ml/l
Tiamina	10	mg/l
Mioinositol	0.1	g/l
Ac. nicotínico	1	mg/l
Piridoxina – Hcl	1	mg/l
Extracto de malta	0.4	g/l
Caceina hidrolizada	0.1	g/l
2ip	0.5	mg/l
2,4-D	1	mg/l
Sacarosa	20	g/l
Phytigel	3	g/l
pH	5.8	

Anexo III:

DIAGRAMA GENERAL PARA ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES

