

Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción

Micropropagation of *Dodonea viscosa* (L) Jacq: an endangered plant

Jaime Alonso Pedroza-Manrique¹, Sandra Rocío González-Molina²,
Diana Catalina Téllez-Ortiz²

Resumen

Un eficiente sistema de propagación bajo condiciones *in vitro* fue desarrollado para *Dodonea viscosa* (L) Jacq., un arbusto endémico y en vías de extinción. En este estudio se evaluó el efecto de cuatro fitohormonas en el desarrollo morfogénico de nudos y láminas foliares bajo condiciones *in vitro*. El medio de cultivo básico empleado fue el de Murashige y Skoog (1962), enriquecido con los siguientes fitoreguladores: en el cultivo de nudos el ácido indol butírico y la bencilaminopurina (0, 0,5, 1 y 1,5 mg/l⁻¹); en láminas foliares el ácido 2,4-diclorofenoxy acético y la kinetina (0, 1, 3 y 5 mg/l⁻¹).

El establecimiento de *D. viscosa* bajo condiciones *in vitro* se logra mediante el uso del benlate® al 2% durante una hora, y el hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 minutos. La incubación bajo condiciones de oscuridad controla la oxidación de los explantes de *D. viscosa*, mientras que el ácido cítrico y el ácido ascórbico no controlaron la oxidación de los explantes expuestos a la luz. El nudo es el explante adecuado para micropropagar *D. viscosa* en ausencia de fitohormonas. El mejor tratamiento inductor del proceso morfogénico en láminas foliares fue el ocho (1,0 mg/l⁻¹ de kinetina y 5,0 mg/l⁻¹ de 2,4-D). Este protocolo es un modelo de conservación para especies que se encuentran en vías de extinción, y además permite la propagación a gran escala de *Dodonea viscosa* (L) Jacq.

Palabras clave: *Dodonea viscosa*, micropropagación, plantas en vías de extinción, AIB, BAP, 2, 4-D, kinetina.

Abstract

An efficient *in vitro* propagation system was developed for *Dodonea viscosa* (L) Jacq., this being an endangered endemic shrub. This study was aimed at evaluating the effect of four growth regulators on the *in vitro* morphogenetic development of nodes and leaves. The basic culture medium used was Murashige and Skoog (1962), enriched with the following growth regulators: butyric indol acid and benzylaminopurine (0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L⁻¹) in node culture and 2, 4-dichlorofenoxy acetic acid and kinetin (0, 1, 3 and 5 mg/l⁻¹) in leaves. *D. viscosa* has been propagated in *in vitro* conditions by using 2% benlate for one hour and 0.5% sodium hypochlorite for 5 min. Incubation in the dark has controlled *D. viscosa* explant oxidation, whereas using citric acid and ascorbic acid

1 Biólogo, Esp. M. Sc. Profesor Asociado Universidad Distrital Francisco José Caldas. Correo electrónico: jpedroza@udistrital.edu.co

2 Licenciadas en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas

has not controlled the oxidation of explants exposed to light. The node is a suitable explant for micro-propagating *D. viscosa* in the absence of phytohormones. The best morphogenetic-inducing treatment of leaves was the eighth one assayed (1.0 mg/l⁻¹ kinetin and 5.0 mg/l⁻¹ 2,4-D). This protocol represents a conservation model for endangered species and encourages large-scale *Dodonea viscosa* (L) Jacq. propagation.

Key words: *Dodonea viscosa*, micropropagation, endangered plant, IBA, BAP, 2, 4-D, kinetin.

Recibido: Agosto 18 de 2007 Aceptado: Noviembre 5 de 2007

INTRODUCCIÓN

Día a día, la producción agrícola ha generado un incremento en la actividad antrópica, situación que provoca un rápido deterioro progresivo de los bosques altoandinos, acompañado de procesos erosivos. Ante esta situación, es necesario encontrar elementos que puedan contribuir al manejo sostenible de este importante recurso ambiental, como la aplicación de programas de revegetalización que emplean especies nativas a fin de devolver al suelo sus características primarias. *D. viscosa* es una especie que contribuye con esta medida, por ser un arbusto originario de la cordillera oriental colombiana, ubicado en climas fríos entre 2200 y 2900 msnm, en suelos ácidos y áridos, con la capacidad de soportar sequías y suelos muy pobres, altamente erosionados (Herrera, 1991; Bartholomäus et ál, 1995). Sin embargo, *D. viscosa* presenta problemas tanto en la germinación, como en el crecimiento lento inicial y la baja resistencia a procesos de siembra efectuados a raíz desnuda (Trujillo, 2002).

Además, existen usos irracionales de esta especie a nivel comercial, porque el tallo se usa en la manufactura de bastones y mangos para herramientas, como leña, y para elaborar carbón; la infusión de la corteza se usa contra fiebre, cólicos, gota, reumatismo y enfermedades venéreas. Además, con el agua de cocimiento de esta planta se lavan las heridas agusanadas del ganado. En términos generales, todo esto genera una reducción en el número de individuos de esta población, limitando su aporte ecológico, que consiste en la conservación y recupera-

ción de suelos erosionados. Por estas razones, esta especie ha sido catalogada como amenazada, en vías de extinción (Instituto Alexander von Humbolt, 1997). Por lo anterior se hace necesario encontrar un método para la propagación de esta especie.

No se han reportado investigaciones acerca del desarrollo de protocolos de propagación o conservación de *D. viscosa* (L) Jacq., a pesar de su potencial como una especie que es indispensable en programas de repoblación de áreas naturales.

La propagación a gran escala es un prerrequisito para satisfacer los requerimientos para repoblación de áreas naturales y de esa forma evitar la erradicación de esta planta de gran valor y en vías de extinción. Para los requerimientos ecológicos de repoblación, utilizando plantas pioneras, y para la conservación de esta especie en vías de extinción, es indispensable establecer métodos de propagación rápida y a gran escala. De esta forma, la propagación in vitro permite la producción de gran número de plántulas en un corto periodo de tiempo.

Este estudio describe por primera vez el efecto de cuatro fitohormonas (ácido indol butírico; bencilaminopurina; ácido 2,4-diclorofenoxy acético, y kinetina) en la diferenciación tisular de *D. viscosa*, a partir de dos explantes (nudos y láminas foliares), bajo condiciones in vitro. Con la propagación de *D. viscosa* bajo condiciones in vitro se contribuye con el establecimiento de un protocolo para la propagación masiva de esta especie, como una herramienta para su conservación ecológica, establecimiento

de banco de germoplasma y para su potencial uso sostenido en el ámbito ambiental, que a largo plazo podría ampliarse hacia la recuperación de zonas altamente afectadas por la actividad antrópica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y adaptación a condiciones *in Vitro*

Los nudos y las láminas foliares se colectaron a partir de tejidos fisiológicamente juveniles (ramas apicales de 15 cm) con la ayuda de podas sucesivas, en arbustos adultos de *D. viscosa*, localizados en las instalaciones de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, sede Macarena B. Las ramas fueron sumergidas en una solución de Benlate® al 2% durante una hora, y después se realizaron cuatro enjuagues consecutivos con solución jabonosa y agua destilada, estéril. Posteriormente, se suspendieron en alcohol al 70% durante un minuto. Cada tipo de explante se sumergió en solución de hi-

poclorito de sodio al 0,5, 1,0, 1,5, y 2,0% durante 5, 10 y 15 minutos, para un total de 12 tratamientos. Finalmente se realizaron tres enjuagues en agua destilada y estéril (tabla 1).

Medios utilizados y condiciones de cultivo

Como medio básico en el establecimiento *in vitro* de *D. viscosa* se utilizó el Murashige y Skoog (1962), enriquecido con las siguientes cuatro fitohormonas de acuerdo con el tipo de explantes utilizados: en el cultivo de nudos, el ácido indol butírico (AIB) (0, 0,5, 1 y 1,5 mg/l⁻¹) y la bencilaminopurina (BAP) (0, 0,5, 1 y 1,5 mg/l⁻¹) para un total de 16 tratamientos (tabla 2); en láminas foliares el ácido 2, 4-diclorofenoxi acético (2,4-D) (0, 1,0, 3,0 y 5,0 mg/l⁻¹) y la kinetina (Kin) (0, 1,0, 3,0 y 5,0 mg/l⁻¹) para un total de 16 tratamientos (tabla 3).

A todos los medios se les suministraron 3% (w/v) de sacarosa y 0,8% (w/v) de agar. El pH de los medios fue ajustado a 5,8, an-

Tabla 1. Tratamientos que evalúan el efecto de la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición en la obtención de explantes de *D. viscosa* libres de patógenos bajo condiciones *in vitro*.

Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo (min.)	Tratamiento
0,5	5	1
	10	2
	15	3
1,0	5	4
	10	5
	15	6
1,5	5	7
	10	8
	15	9
2,0	5	10
	10	11
	15	12

Tabla 2. Tratamientos que evalúan el efecto combinado del AIB y del BAP en el desarrollo morfogénico de nudos de *D. viscosa* bajo condiciones in vitro

Ácido indol butírico (mg/l ⁻¹)	Bencil aminopurina (mg/l ⁻¹)	Tratamientos
0,0	0,0	1
	0,5	2
	1,0	3
	1,5	4
0,5	0,0	5
	0,5	6
	1,0	7
	1,5	8
1,0	0,0	9
	0,5	10
	1,0	11
	1,5	12
1,5	0,0	13
	0,5	14
	1,0	15
	1,5	16

tes de ser esterilizados a una presión de 1,06 kg/cm² por 20 minutos. A fin de optimizar las condiciones de siembra, y evaluar el grado de oxidación, se utilizaron los antioxidantes ácido cítrico (0,0, 50 y 100 mg/l⁻¹), y ácido ascórbico (0,0, 50 y 100 mg/l⁻¹), para un total de nueve tratamientos que fueron incubados tanto en la oscuridad como en presencia de la luz.

Tan pronto fueron sembrados los explantes en los diferentes medios, se incubaron en un cuarto de crecimiento a temperatura ambiente de 23 °C, a 25-30 μmol m⁻²s⁻¹ (tubos fluorescentes de luz día FL-20D/18, 20 W, China Electric Co., Taipei), con un fotoperíodo de 12 horas de irradiación lumínica.

Análisis estadístico

Los experimentos fueron desarrollados bajo un diseño al azar, con arreglo factorial 4 x 4, con concentraciones de 0, 0,5, 1 y 1,5 mg/l⁻¹ para el ácido indol butírico (AIB) y 0, 0,5, 1 y 1,5 mg/l⁻¹ para la bencilaminopurina (BAP), en la adaptación de nudos. En el cul-

tivo de láminas foliares se utilizaron el ácido 2,4-diclorofenoxy acético (2,4-D) (0, 1,0, 3,0 y 5,0 mg/l⁻¹) y la kinetina (Kin) (0, 1,0, 3,0 y 5,0 mg/l⁻¹) para un total de 16 tratamientos, que evaluaron el desarrollo morfogénico de *D. viscosa*.

En cada uno de los 16 tratamientos se trabajaron diez réplicas, donde cada réplica estaba representada por un frasco de cultivo, con un explante, para un total de 160 frascos en cada experimento.

Los datos fueron estadísticamente analizados en términos de porcentaje, y los promedios de los tratamientos fueron comparados empleando la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1985) a fin de establecer el mejor tratamiento de micropropagación de *D. viscosa*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los experimentos del cultivo de nudos, yemas y láminas foliares, los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente sig-

Tabla 3. Tratamientos que evalúan el efecto combinado del ácido 2, 4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y la kinetina en el desarrollo morfológico de láminas foliares de *D. viscosa* bajo condiciones in vitro.

Kinetina (mg/l ⁻¹)	Ácido 2, 4-diclorofenoxi acético (mg/l ⁻¹)	Tratamientos
0,0	0,0	1
	1,0	2
	3,0	3
	5,0	4
1,0	0,0	5
	1,0	6
	3,0	7
	5,0	8
3,0	0,0	9
	1,0	10
	3,0	11
	5,0	12
5,0	0,0	13
	1,0	14
	3,0	15
	5,0	16

nificativas ($P < 0,01$). A continuación se describen los diferentes resultados logrados en la adaptación y micropropagación de *D. viscosa*.

Adaptación a condiciones in vitro

Los desinfectantes escogidos para el proceso de control de la contaminación respondieron satisfactoriamente, eliminando en un alto porcentaje (95-98%) y con rapidez tanto los hongos como las bacterias (figura 1). De acuerdo con los resultados obtenidos, el tratamiento uno, que corresponde a la más baja concentración de NaOCl (0,5%) durante el menor tiempo (5 minutos), es el tratamiento potencialmente idóneo para la fase de desinfección porque causa menos daños a los explantes, situación que se evidencia cuando el 98% de láminas foliares y el 95% de nudos estuvieron libres de patógenos y en excelentes condiciones fisiológicas. Es importante resaltar que a medida que se incrementan las concentraciones

del hipoclorito de sodio, aunque el control de los agentes infecciosos es muy bueno, las condiciones fisiológicas de los explantes son fuertemente alteradas, generando la necrosis y la muerte de los tejidos cultivados. Además, de acuerdo con Jiménez y cols. (2004), desde el punto de vista mecánico, la zona del tejido que se utiliza para iniciar el cultivo in vitro tiene gran influencia en la eficiencia de la desinfección. Los explantes tomados de plantas en crecimiento son más fáciles de desinfectar que los explantes de plantas adultas, donde la desinfección se hace muy difícil (Pérez y Jiménez, 1995). Por esta razón, el empleo de tejidos fisiológicamente juveniles (ramas apicales de 15 cm) de *D. viscosa* evidenció niveles de contaminación muy bajos (figura 1).

De otra parte, según Carmona (2003) y Navas y Subero (1995), las combinaciones de diferentes desinfectantes como el benlate® y el hipoclorito de sodio son ampliamente

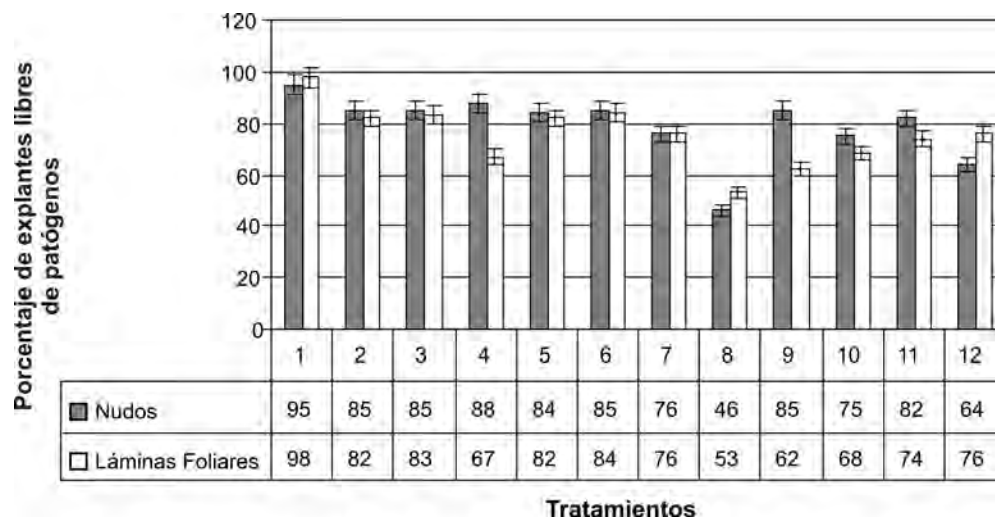


Figura 1. Efecto del hipoclorito de sodio en el porcentaje de explantes de *D. viscosa* libres de patógenos (Desviación estándar = 4).

usadas por el alto grado de control que ejercen contra los agentes contaminantes.

Además, las soluciones que contienen cloro son empleadas de manera regular por su seguridad, adecuado costo, simplicidad de uso, rapidez de acción y gran espectro antimicrobiano. Este compuesto es activo frente a bacterias, virus, hongos y esporas bacterianas; por tanto, una solución de hipoclorito de sodio, en la concentración adecuada, puede emplearse como un desinfectante químico. Sin embargo, la aplicación práctica de tan útiles propiedades se contraponen por la acción oxidante que estas soluciones exhiben y que provocan daño en las superficies sobre las que actúa (Princ, 1998).

El benlate® actúa como un fungicida sistémico, controlando los hongos patógenos antes de su penetración en la planta (acción preventiva) o bien cuando la infección comienza (acción curativa) (Carmona, 2003). Trabajos relacionados con especies forestales como *Salix sp.* y *Aniba perutilis*, han comprobado que el empleo de una mezcla de fungicidas (Benlate®-Captam) y NaOCl al 10% por 30 y 20 minutos permiten mantener niveles de asepsia mayores al 70% (Chung y Carrasco, 2002; Marulanda, 2002). Esta situación evidencia que el Benlate® posee un efecto de control sobre una

amplia gama de enfermedades causadas por hongos en diversos cultivos de importancia económica.

En términos generales, se puede asegurar que tanto los desinfectantes como el estado fisiológico de los explantes influyeron en el buen control de la contaminación. Es de resaltar que el efecto desinfectante de los agentes es equivalente a su acción agresiva; en el caso del material de *D. viscosa*, el uso de elementos como el benlate® e hipoclorito de sodio alternadamente, causa un daño irreversible, que se demuestra en el ennegrecimiento de los explantes con su posterior muerte, perdiendo así la posibilidad de aprovechar este recurso en la fase de proliferación.

De hecho, la obtención del explante para iniciar un cultivo in vitro implica invariablemente la necesidad de causar heridas en el tejido vegetal. Además, estas heridas facilitan la respuesta del tejido al permitir la entrada de nutrientes y fitoreguladores, como por ejemplo en la organogénesis. Sin embargo, cualquier tejido vegetal herido excreta una gran cantidad de compuestos que intervienen en el proceso de cicatrización y defensa contra patógenos, la mayoría de los cuales pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos. Estos compuestos, al contacto con la atmósfera, tienden a ser oxidados causando

un oscurecimiento del tejido. Esta oxidación conlleva la generación de radicales como las quinonas que resultan altamente tóxicas para los tejidos vegetales (Pedroza et ál, 2005).

Oxidación de nudos y hojas de *D. viscosa*

El mayor inconveniente que se presentó en estos ensayos fue el alto grado de oxidación que oscila entre el 38 y el 98% en los diferentes tratamientos, situación que sucedió en algunos casos desde el momento mismo de la siembra. De acuerdo con los resultados obtenidos, la ausencia de los antioxidantes evaluados (tratamiento 1), y la incubación de los explantes bajo condiciones de oscuridad fueron las más óptimas en el control de proceso de oxidación (figura 2). De hecho, el proceso de oxidación en los nudos se controló cuando fueron incubados en la oscuridad tan pronto inició el proceso, hasta que se produjeron las dos primeras hojas.

Después de la primera semana de incubación, tanto los nudos como las láminas foliares expuestos a la luz, en los nueve tratamientos evaluados, se oxidaron completamente, efecto que concuerda con lo expuesto

por Pérez y Jiménez (1995), y López (2002) quienes recomiendan la incubación en condiciones de oscuridad como método que evita la síntesis de fenoles, porque los productos de la oxidación fenólica se forman bajo condiciones de iluminación.

Es importante tener en cuenta que los tejidos de especies leñosas, particularmente de angiospermas como *D. viscosa*, liberan al medio de cultivo polifenoles y taninos, donde la síntesis de los precursores de fenoles es más activa y compleja en tejidos maduros que en tejidos jóvenes, y está influenciada por el contenido de sales y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo; si las sustancias fenólicas permanecen en el medio del cultivo pueden inhibir el desarrollo de brotes y ocasionar la muerte del material vegetal, el control de la oxidación puede lograrse mediante la adición de antioxidantes en diferentes concentraciones al medio de cultivo (Carrizosa, 1994).

Trabajando en condiciones óptimas, y muy poco agresivas, los tejidos que forman el explante sufren situaciones de estrés como desecación, daños mecánicos y daños en la desinfección; cambios en los potenciales hídricos, salinos y osmóticos al ser incuba-

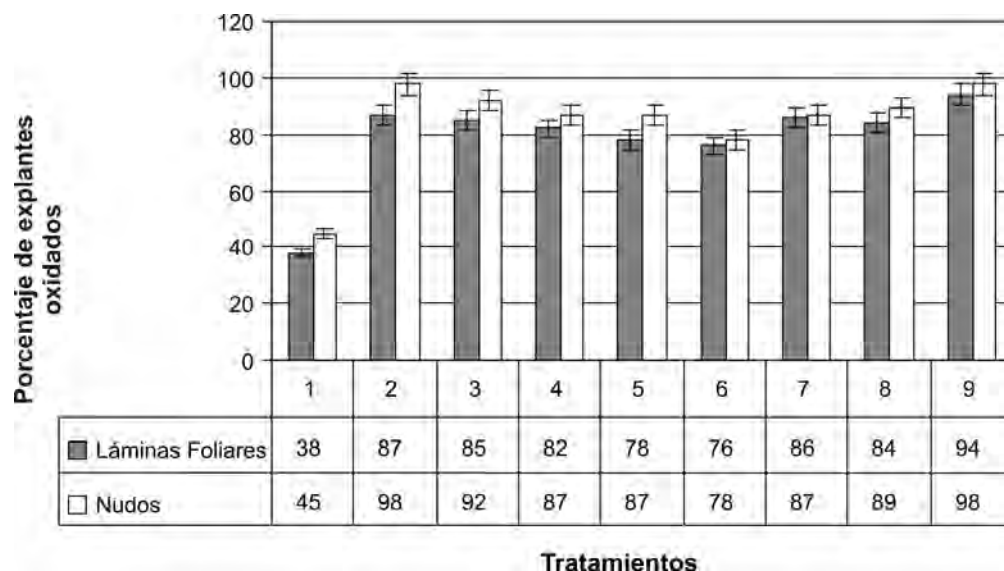


Figura 2. Efecto del ácido ascórbico y el ácido cítrico en el control del porcentaje de oxidación de los explantes de *D. viscosa* que fueron incubados bajo condiciones de oscuridad (Desviación estándar = 5).

dos en el medio de cultivo, y cambios de pH, estos factores provocan la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos, sustancias que van a provocar reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas, reacciones de estrés en las células vecinas a las dañadas, incluso aunque esas células no parezcan estar dañadas, o una muerte prematura de células específicas de esa zona o del lugar de la infección (López, 2002).

En el caso de *D. viscosa*, es muy posible que el empleo del hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección contribuyera con el efecto oxidante en los explantes trabajados. De hecho, Chung y Carrasco (2002) han demostrado que el uso de cloro comercial indujo oxidación de los tejidos en todas las procedencias estudiadas de *Salix spp.* Además, es importante resaltar la ineficiencia de los antioxidantes usados, porque las concentraciones empleadas no causaron un efecto positivo.

Así mismo, se evidenció que a medida que se incrementan las concentraciones de los antioxidantes, ellos se convierten en elementos tóxicos para los explantes, provocando su muerte.

De los dos tipos de explantes utilizados, las láminas foliares presentaron la mayor resistencia al proceso de oxidación. Bajo esta visión, los nudos poseen una resistencia media y el explante que mayor viabilidad presenta es la hoja, especialmente cuando son cultivados bajo condiciones de oscuridad.

En términos generales, los explantes sometidos al tratamiento uno (0 mg/l^{-1} de ácido ascórbico y $0 (\zeta) \text{ mg/l}^{-1}$ de ácido cítrico), incubados bajo condiciones de oscuridad, llegarían a ser potenciales explantes usados en la fase de multiplicación.

Cultivo de nudos

En la décima semana de incubación, el tratamiento uno ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de AIB y $0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de BAP) reportó la mayor cantidad de brotes regenerados a partir de nudos bajo condiciones in vitro. Este tratamiento proliferó 15

brotes que luego enraizaron sin la adición de ninguna fitohormona (figura 3A). Situación que significa que el proceso de rizogénesis está íntimamente ligado con la multiplicación celular, proceso que es favorecido por la presencia de auxinas (Vidales, 2002). Además, es posible que esta especie sintetice la cantidad adecuada de hormonas, puesto que para su proliferación efectiva no es necesario agregar ningún fitoregulador de crecimiento al medio de cultivo; además, las células meristemáticas son sitios activos para la biosíntesis o la liberación de citoquininas naturales favoreciendo el crecimiento celular. Según Kantolic y Carmona (2005), el grado de absorción y posterior liberación de auxinas y citoquininas puede variar según el genotipo de la planta y según la auxina utilizada (Hartman et ál, 1997), lo que indica que quizás *D. viscosa* sintetice la cantidad adecuada de hormonas, puesto que para su proliferación efectiva no es necesario agregar ninguna fitohormona.

De otra parte, las auxinas desempeñan un papel decisivo en muchos procesos del desarrollo vegetal como crecimiento, tropismos, enraizamiento de esquejes, diferenciación vascular, etc. Teniendo en cuenta la localización de la biosíntesis de la auxina, se debe considerar que el transporte de la hormona desde los lugares de biosíntesis hasta los tejidos y órganos implicados en las respuestas puede resultar clave en estos procesos (Acosta, 2004).

De igual forma, la presencia de citoquininas de distinta naturaleza dependen en su acción del estado de desarrollo de la planta o de un tejido concreto, sugiriendo que el metabolismo de citoquininas y las interconversiones de las hormonas en otras podrían estar directamente implicadas en la regulación de los procesos de maduración y envejecimiento de la planta (Fernández, 2004).

Aunque el tratamiento dos ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de AIB y $0,5 \text{ mg/l}^{-1}$ de BAP) presentó ocho brotes y los tratamientos 3 ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de AIB y 1 mg/l^{-1} de BAP) y 12 ($1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de AIB y $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ de BAP) presentaron siete brotes cada uno, posteriormente exhibieron síntomas de hiperhidratación. Por esta razón, resulta más conveniente utilizar el tratamiento uno

que produce mayor cantidad de brotes no hiperhidratados y posteriormente formación de raíz sin necesidad de realizar transferencia a otros medios.

Además, diferentes sinergismos de las fitohormonas en el momento de actuar sobre los explantes de nudo causan una baja considerable en todos los casos en el número de brotes regenerados, sin tener en cuenta, por supuesto, factores cualitativos como la hiperhidratación reflejada en los explantes. Sólo las concentraciones de 0,5 mg/l⁻¹ y 1,0 mg/l⁻¹ de AIB en presencia de 1,0 mg/l⁻¹ y 1,5 mg/l⁻¹ de BAP respectivamente presentan incrementos abruptos con posteriores pérdidas de eficacia en la producción de brotes (figura 3B). Dadas estas condiciones, entre los tratamientos se escogió el tratamiento uno, medio MS sin adición de fitoreguladores de crecimiento, en el cual se obtienen brotes viables y enraizados.

De otra parte, en la décima semana de incubación, el tratamiento uno (ausencia de fitohormonas) presentó plantas completas con hojas normales, desde el punto de vista morfológico, presentando una hoja por yema con un total de cinco a diez hojas por planta y formación de raíz a partir de pequeños callos en la base (Figura 3A), siendo éste el trata-

miento con mejores perspectivas comparado con tratamientos como el cuatro (0,0 mg/l⁻¹ de AIB y 1,5 mg/l⁻¹ de BAP), que presentó hojas anormales de crecimiento abundante (trece en dos nudos) y yemas desarrolladas a partir de callo. De hecho, la inducción de tejido calloso se produce cuando la proporción de citocininas es superior a la de las auxinas (Woodward y Bartel, 2005).

En la quinta semana de incubación, en el tratamiento dos (0,0 mg/l⁻¹ de AIB y 0,5 mg/l⁻¹ de BAP) los nudos manifestaron un 50% de desarrollo de las yemas axilares, mientras que 1,5 mg/l⁻¹ de AIB en combinación con 0 mg/l⁻¹ y 1,0 mg/l⁻¹ de BAP presentaron un crecimiento del 20 y 30% respectivamente. Los tratamientos 10, 11 y 12 con 1,0 mg/l⁻¹ de AIB en combinación con 0,5, 1,0 y 1,5 mg/l⁻¹ de BAP presentaron un 10% de crecimiento, con hojas anormales. Los demás tratamientos comenzaron a formar callo en la base en el lugar donde se efectuó el corte, y algunos presentaron clorosis o necrosis.

Los nudos no crecieron y se necrosaron cuando fueron cultivados con 1,0 mg/l⁻¹ de BAP en ausencia y en combinación con 1,0 mg/l⁻¹ de AIB. De igual forma, 1,0 mg/l⁻¹ de AIB provocó en las plántulas crecimiento anormal, nudos muy cortos y callo verde cla-

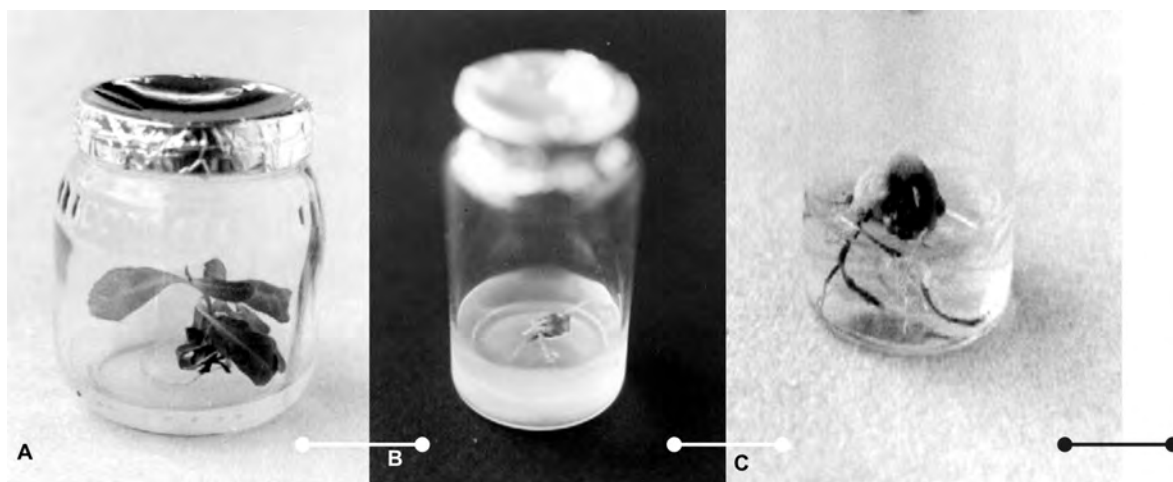


Figura 3. Desarrollo morfogénico de *D. viscosa* bajo condiciones in vitro. **A.** Efecto del tratamiento uno sin reguladores de crecimiento en el desarrollo de nudos (barra = 2,5 cm.). **B.** Efecto de la combinación entre auxinas y citoquininas en el desarrollo de yemas (barra = 0,5 cm.). **C.** Efecto del tratamiento ocho (1 mg/l⁻¹ de kinetina y 5,0 mg/l⁻¹ de 2,4-D) en la formación de callo y diferenciación de raíces sobre láminas foliares (barra = 0,5 cm.).

ro en la base, mientras que $1,5 \text{ mg/l}^{-1}$ de AIB indujo un callo oscuro en la base del nudo con aspecto compacto, nudos cortos e hinchados y, en algunos casos, hojas anormales y cloróticas.

Cultivo de láminas foliares

A partir de la cuarta semana de incubación, la respuesta morfogenética obtenida de los explantes foliares, expuestos a tratamientos donde se combinaron los reguladores 2,4-D y kinetina, fue la formación de callo, parámetro que se tomó como punto de evaluación de este ensayo.

El tratamiento ocho (1 mg/l^{-1} de Kinetina y $5,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de 2,4-D) presentó un 90% de formación de callos con la formación de raíces adventicias (figura 3C), mientras que el tratamiento cuatro ($0,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de kinetina y $5,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de 2,4-D) formó un 70% de callos, siendo éste un buen resultado teniendo en cuenta que utiliza un solo fitorregulador de crecimiento.

Cabe resaltar el comportamiento del tratamiento uno, que en ausencia de reguladores de crecimiento presenta un porcentaje de formación de callo del 40%, efecto elevado comparado con tratamientos como el cinco (1 mg/l^{-1} de kinetina y 0 mg/l^{-1} de 2,4-D) y el doce (3 mg/l^{-1} de kinetina y 5 mg/l^{-1} de 2,4-D), que presentan los niveles más bajos en la formación callosa.

Los valores obtenidos muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) en la interacción entre el 2,4-D y la kinetina. Estos resultados evidencian que las fitohormonas evaluadas presentan un efecto sinérgico en la formación de callo sobre los explantes de hoja, elemento fundamental en el proceso de desdiferenciación celular. Además, al elevarse las concentraciones de 2,4-D aumenta el porcentaje de formación de callos. Este comportamiento, de acuerdo con las observaciones, está influenciado por la acción del 2,4-D que como auxina se considera el elemento neoformador o activador de la desdiferenciación celular (Margara, 1998).

Entre las respuestas importantes se observó la aparición de procesos rizogénicos en los tratamientos uno, dos, tres y cuatro, que son aquellos que carecen de la citoquinina y contienen concentraciones de 0,0, 1,0, 3,0 y $5,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de 2,4-D, resultado que muestra la importancia de las proporciones auxinas-citoquininas en la determinación de la respuesta morfogenética in vitro, donde una proporción alta favorecía el desarrollo de raíces mientras que una proporción baja favorecía la formación de brotes. En la organogénesis, para que se forme una planta ya sea por vía directa o indirecta se requiere una secuencia de medios de cultivo porque aquellos que favorecen el desarrollo de los brotes son excluyentes para la formación de raíces y viceversa (Herman, 2005).

Además, es importante señalar que en la mayoría de los tratamientos las concentraciones de auxina-citoquinina evaluadas manifiestan un grado de intoxicación en los explantes cultivados a través de procesos necróticos que condujeron a su muerte.

Adicionalmente, la respuesta de formación de callo en láminas foliares de *D. viscosa* depende en gran parte del 2,4-D, auxina muy fuerte que se hace tóxica en concentraciones elevadas y, con frecuencia, resulta poco eficaz sobre la organogénesis, pero es un potente activador del funcionamiento cambial (?) empleándose eventualmente en asociación con citoquininas (Palni et ál, 1993).

En términos generales, la técnica de cultivo de tejidos in vitro se puede utilizar como una herramienta en la propagación efectiva de *D. viscosa* (L) Jacq. siendo una alternativa de multiplicación y conservación de germoplasma de esta importante especie.

CONCLUSIONES

El establecimiento in vitro de plantas de *D. viscosa* se logra mediante el uso del benlate® al 2% durante una hora, y el hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.

El control de la oxidación de los explantes de *D. viscosa* cultivados in vitro se logra al incubarlos en la oscuridad hasta el momento en que se inicie el proceso morfogénico esperado. Además, el empleo del ácido cítrico y el ácido ascórbico no controló la oxidación de los explantes expuestos a la luz.

El explante adecuado para propagar *D. viscosa* por medio de técnicas in vitro es el nudo, debido a que produce brotes vigorosos que posteriormente enraízan en medio MS (1962) sin fitohormonas. Además, en presencia de las fitohormonas AIB y BAP los brotes de nudo sufren de hiperhidratación. Las yemas cultivadas en $0,5 \text{ mg/l}^{-1}$ de AIB y en ausencia de BAP regeneran brotes muy pequeños.

Las láminas foliares solamente manifestaron la formación de callo desdiferenciado acompañado de raíces adventicias. El mejor tratamiento inductor del proceso morfogénico fue el ocho ($1,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de Kinetina y $5,0 \text{ mg/l}^{-1}$ de 2,4-D).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Facultad de Ciencias y Educación de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. 2004. Función del transporte polar y lateral en la formación de gradientes longitudinal y radial de auxina. Relación con el crecimiento, el enraizamiento y los valores de ploidía celular. Universidad de Murcia. En: *Metabolismo y modo de acción de Fitohormonas*. España: Universidad de Salamanca.
- Bartholomäus, A.; De la Rosa, A.; Santos, J. O.; Acero, L. E. 1995. *El manto de la tierra: Guía de 150 especies de la flora andina*. Bogotá, D. C.: Lerner Ltda.
- Carmona, M. 2003. Daños y pérdidas causadas por enfermedades. Importancia del Manejo Integrado. Ubicación estratégica de fungicidas foliares. Actas Jornadas Técnicas de Manejo Integrado de enfermedades en cultivos extensivos, p: 10- 15.
- Carmona, M. 2005. Enfermedades de fin de ciclo y roya asiática de la soja. Un análisis de sus daños y el uso estratégico de fungicidas. Jornada soja 2005 con sustentabilidad (INTA; CREA; AAPRESID). Trabajo completo publicado en actas. Córdoba, 4 de agosto de 2005, p. 12.
- Carrizosa, M. S. 1994. Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de las especies forestales. En: Congreso de investigación en la Universidad Javeriana, Bogotá: Simposio de Ciencias básicas, Ecoe, tomo I, pp. 547-559.
- Chung, P.; Carrasco, B. 2002. Micropropagación de *Salís spp* a través de meristemos foliares. [online] [citado 13 de julio 2007], www.aldeaforestal.d/ñemu/webLemu-mayo.01/ciencia/articulos2htm.Fernández, B. 2004. Niveles de citoquininas endógenas y actividad citoquinina oxidas/deshidrogenada en estados juveniles de *Pinus sylvestris*. Universidad de Oviedo. En: *Metabolismo y modo de acción de fitohormonas*. España: Ed. Universidad de Salamanca.
- Hartman, H.; Kester, D.; Davies, F.; Geneve, R. 1997. Plant propagation: principles and practices. Sixth edition. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., pp. 125-144.
- Herman, E. 2005. Recent Advances in Plant Tissue Culture IX: Media and Techniques for Growth, Regeneration and Storage 2002-2005. Estados Unidos: Agritech Consultants, INC.
- Herrera, L. J. 1991. Prácticas de producción y plantación de 19 especies forestales aptas para la recuperación de suelos en el piso montano bajo. Inderena: Ministerio de Agricultura. Colombia. 41: 32.
- Instituto Alexander von Humbolt. 1997. Informe nacional sobre el estado de biodiversidad: Especies de plantas superiores amenazadas. Colombia.
- Jiménez, V. M.; Castillo, J.; Tavares, E.; Guevara, E.; Montiel, M. 2004. Micro propagación de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de explantes nodales. Memorias del Simposio Internacional Guadua 2004. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia; septiembre 27 a octubre 2 de 2004. p. 68.
- Kantolic, A. G.; Carmona, M. A. 2005. Bases eco-fisiológicas de la generación de rendimiento: relación con el efecto de las enfermedades

- foliares y el uso de fungicidas en el cultivo de soja: Manual para el manejo de las enfermedades de soja. Brasil: Ed. Universidade de Passo Fundo (en prensa).
- López, E. C. 2002. Reacciones de hipersensibilidad en plantas cultivadas *in vitro* [online], [citado 13 de julio 2007], www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS26/26reacciones.htm/ Margarita, J. 1988. Multiplicación Vegetativa *in vitro*: los meristemas y la organogénesis. España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Marulanda, M. L. 2002. Micropropagación *in vitro* y caracterización molecular de la especie forestal *Aniba perulitis* Hemsley y la especie *Musa acuminata*. [online], [citado 13 de julio de 2007]. <http://www.utp.edu.ec/internos/español/ciencia/Laborat/microporpagacion.html>.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Navas, M.; Subero, L. 1995. Efecto de 5 fungicidas sobre *Corynespora cassilaca* wei en semilla de ajonjolí (*Sesamun indifugio*) [online], [citado 13 de julio de 2007]. www.redpav-fpolar.infove/fagro/v213a030.html
- Palni, L. M.; Burch, L. R.; Jorgan, R. 1993. The effects of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. En: Azcon y Talon (eds.). *Fisiología y bioquímica vegetal*. 1 ed. España: Interamericana McGraw-Hill.
- Pedroza, J.; Fernández, C.; Suárez, A. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compositella falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 838-843.
- Pérez, P.; Jiménez, G. E. 1995. Micropropagación y fundamentos teóricos prácticos del cultivo *in vitro*. En: Conferencias en biotecnología agrícola. pp. 1-10.
- Princ., G. F. 1998. Fundación para el desarrollo de la esterilización en la Argentina (online) [citado el 13 de julio 2007]. www.drwebsa.com
- Steel, R.; Torrie, J. 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2 ed. Bogotá: McGraw Hill.
- Trujillo, E. 2002. *Manual de Árboles*. Bogotá D. C.: Dayber.
- Vidales, I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana mill*). México: Universidad de Colima.
- Woodward, A.; Bartel, B. 2005. Invited Review. Auxins: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany.* 95: 707-735.