

**Universidad de Pinar del Río**

**“Hermanos Saiz Montes de Oca”**

**Facultad de Agronomía y Forestal**

**Departamento de Producción Forestal**

Micropropagación de *Psidium salutare* (HBK) Berg

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Forestales**

**Rogelio Sotolongo Sospedra**

**Pinar del Río  
2000**

**Universidad de Pinar del Río**

**“Hermanos Saiz Montes de Oca”**

**Facultad de Agronomía y Forestal**

**Departamento de Producción Forestal**

Micropropagación de *Psidium salutare* (HBK) Berg

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Forestales**

**Autor**

**Rogelio Sotolongo Sospedra**

**Tutor**

**Dr. Esteban García Quiñones**

**Pinar del Río**

**2000**

Los resultados que se exponen en la presente Tesis se han alcanzado como consecuencia del trabajo realizado por el autor y respaldado por la **Universidad de Pinar del Río**.

---

Ing. Rogelio Sotolongo Sospedra

*A mi familia, amigos  
y a todo al que le pueda ser útil este trabajo*

## Agradecimientos

*Quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a:*

- *Universidad de Pinar del Río por el apoyo en todos los sentidos brindado para la realización de esta tesis.*
- *Todos los compañeros del Laboratorio de Biotecnología de las Plantas, especialmente a el Dr. Esteban García Quiñones y a las MSc. Agueda Caridad Páez Gásquez y Gretel Geada López por su inestimable ayuda y apoyo.*
- *MSc Maurilio García López quien me inició en este campo de investigación.*
- *Lic. Maira Casas Vilardell, apoyo y ayuda durante los días más complicados en la realización de esta tesis.*
- *A mi esposa, Ing. Niurka Falcón por su comprensión y ayuda en todo momento.*
- *A los Doctores Miguel Ramos Leal y Angeles de la Torre Tabares por su contribución a la elaboración de este manuscrito.*
- *A todos los compañeros del Departamento de Producción Forestal*

## Síntesis

La preservación de la diversidad biológica requiere de estudios, que incluyen el uso de las técnicas biotecnológicas para la recuperación de plantas que presentan problemas, las cuales pueden constituir en muchos casos la única vía para su propagación y conservación. La especie ***Psidium salutare*** (HBK) Berg, es endémica de Centroamérica y el Caribe, en Cuba solo se encuentra en Pinar del Río y la Isla de la Juventud, en la actualidad debido a la alteración y destrucción de sus hábitats está declarada en peligro de extinción, por lo que su rescate constituye una tarea de gran importancia, tanto desde el punto de vista biológico como económico, al ser sus frutos la materia prima para la elaboración del licor “Guayabita del Pinar”. Hasta el momento los trabajos llevados a cabo para su reproducción han estado limitados por la baja capacidad germinativa que presentan las semillas, además de que los métodos convencionales de propagación vegetativa no han dado resultado. Es por esto que el presente trabajo se planteó como objetivo el establecimiento de una metodología de reproducción *in vitro* de la especie, para lo cual se ejecutaron diferentes experimentos para determinar el tipo de explante a utilizar, el procedimiento para el establecimiento del cultivo aséptico, los medios de cultivo para inducir la multiplicación y el enraizamiento, las condiciones para llevar a cabo la fase de aclimatación y el posterior desarrollo en vivero así como la caracterización del desarrollo en plantación de las plantas micropropagadas.

El uso de soluciones de PVP como pretratamiento y la adición a los medios de cultivo de Cisteína 25 mg/L permitió el control de la oxidación fenólica y el establecimiento *in vitro* de los explantes. La micropropagación de ***P. salutare*** se logró a partir del cultivo de segmentos nodales de plantas asépticas y de rebrotes de ramas colocadas en agua en el medio MS suplementado con BAP 1.0 mg/L y AIA 0.1 mg/L con un promedio de 4 - 6 brotes después de seis semanas de cultivo. La mejor tasa de enraizamiento se obtuvo cultivando los brotes en el medio WPM a la mitad de la concentración de las sales, carbón activado 1 g/L y ANA 0.2 mg/L solo o en combinación con AIB 0.2 mg/L. Las plantas regeneradas *in vitro* fueron aclimatadas en un ambiente con alta humedad relativa durante cuatro semanas posteriormente continuaron su desarrollo en vivero durante 16 semanas.. Las mezclas de suelo y humus de lombriz constituyeron los mejores substratos durante esta fase.

El estudio del comportamiento de las plantas micropropagadas en plantación reveló que a partir del tercer año ocurrió una estabilización del crecimiento de las variables altura, diámetro de copa y del tallo y de la producción de frutos; se comprobó una alta correlación entre éstas, siendo el diámetro de copa la variable que mayor contribución tuvo sobre la estimación de la producción de frutos.

La determinación de la variabilidad a partir de los parámetros evaluados reveló que existió una alta uniformidad desde el punto de vista morfológico entre las plantas obtenidas por medio de la micropropagación.

Los resultados de la evaluación del desarrollo de las plantas obtenidas en plantación demostró la factibilidad de la aplicación de la biotecnología para el rescate de esta especie.

# Índice

Introducción .....	1
<b>1. Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
1.1 La Especie .....	5
1.1.1 Características Botánicas .....	5
1.1.2 Ecología y Biogeografía .....	7
1.1.3 Situación actual de la especie .....	7
1.1.4 Importancia y utilización de <i>Psidium salutare</i> (HBK) Berg. ....	8
1.2 Importancia de la conservación de la biodiversidad .....	11
1.3 La biotecnología en la recuperación de especies amenazadas .....	12
1.4 La biotecnología en el mejoramiento genético .....	13
1.4.1 El almacenamiento in vitro y la criopreservación .....	14
1.5 Micropropagación .....	17
1.5.1 Fases de la micropropagación .....	20
1.6 Desarrollo de las vitroplantas en condiciones de cultivo .....	26
1.6.1 Análisis del crecimiento .....	26
1.7 Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos a especies amenazadas .....	28
1.8 Aplicaciones del cultivo de tejidos a especies forestales .....	29
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>32</b>
2.1 Obtención del explante .....	32
2.2 Establecimiento del cultivo aséptico .....	32
2.3 Medios de cultivo .....	33
2.4 Multiplicación .....	34
2.5 Enraizamiento .....	35
2.6 Aclimatación .....	36
2.7 Comportamiento de las vitroplantas en vivero .....	37
2.8 Evaluación de las vitroplantas en plantación .....	38
2.8.1 Estudio de la correlación entre las variables estudiadas .....	39
2.8.2 Estimación de la producción de frutos a partir de las variables del crecimiento ....	39
2.8.3 Análisis del crecimiento en plantación de las vitroplantas de <i>P. salutare</i> .....	39
2.8.4 Determinación de la variabilidad de las vitroplantas a partir de los parámetros morfológicos .....	41
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>42</b>
3.1 La obtención del explante .....	42
3.2 Establecimiento del cultivo aséptico .....	43
3.2.1 Desinfección – Control de la oxidación fenólica .....	43
3.3 Medio de cultivo .....	47
3.3.1 Inducción de la brotación .....	48
3.4 Multiplicación .....	50
3.5 Enraizamiento .....	57
3.6 Aclimatación de las plantas regeneradas in vitro .....	60
3.7 Comportamiento de las vitroplantas en vivero .....	62
3.8 Comportamiento de las vitroplantas en plantación .....	65
3.8.1 Estudio de la correlación entre las variables .....	65
3.8.2 Estimación de la producción de frutos a partir de las variables del crecimiento .	66
3.8.3 Análisis del crecimiento en plantación de vitroplantas de <i>P. salutare</i> .....	68
3.8.4 Determinación de la variabilidad de las vitroplantas en plantación a partir de parámetros morfológicos .....	75
3.9 Aplicación de los resultados .....	80
3.10 Valoración económica .....	82
<b>Conclusiones .....</b>	<b>85</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>87</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>88</b>
<b>Anexos .....</b>	



## INTRODUCCIÓN.

Los productos forestales no madereros tienen una considerable importancia a nivel mundial debido a un reconocimiento cada vez mayor de su contribución a las economías nacionales y a la seguridad alimentaria, así como a los objetivos ambientales como la conservación de la diversidad biológica. Algunos constituyen también materias primas para procesos industriales de gran escala, inclusive de productos básicos comercializados a nivel internacional como bebidas y alimentos, aromatizantes, perfumes y medicinas.

El germoplasma contenido en los recursos genéticos y la biodiversidad, es la materia prima fundamental para el desarrollo de productos mediante la biotecnología. América Latina y el Caribe poseen una posición privilegiada en ese sentido, al contar con abundantes recursos genéticos, hoy amenazados por la destrucción de los ecosistemas. Su valorización y aprovechamiento pasa por su identificación, conservación y caracterización. Esta tarea solo puede ser desarrollada en la forma masiva en que se requiere, con la aplicación de las biotecnologías disponibles y por desarrollarse.

En nuestro país la preservación de la diversidad biológica requiere de estudios para su conservación y reproducción, lo cual incluye la factibilidad del uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Estas son una alternativa para la regeneración de plantas que presentan dificultades de reproducción natural y en muchos casos resultan ser la única vía para la propagación vegetativa y la conservación de germoplasma (Texeira y col., 1998).

La especie ***Psidium salutare*** (H.B.K.)Berg., conocida comúnmente en Cuba como Guayabita del Pinar es una especie de la familia Myrtaceae. Su areal está comprendido en la zona de Centroamérica y el Caribe.

En Cuba se encuentra en Pinar del Río e Isla de la Juventud; hace 50 años esta especie ocupaba las sabanas y localidades abiertas en áreas de pinares. En la actualidad la mayoría de sus biótupos están modificados quedando desplazada a lugares poco accesibles. Además sus poblaciones se han

reducido, encontrándose fundamentalmente individuos aislados aparentemente muy envejecidos que en la mayoría de los casos no mantienen un buen desarrollo. Por si fuera poco la regeneración natural es prácticamente nula. Esta situación ha conducido a que el ***P. salutare*** haya sido declarada como especie en peligro de extinción.

Los trabajos llevados a cabo para su recuperación han estado limitados por las serias dificultades que la especie presenta para la reproducción ya que la capacidad germinativa de sus semillas es extremadamente baja y la propagación vegetativa por métodos convencionales no ha sido posible hasta el presente.

La recuperación y conservación de esta especie es una tarea de gran importancia para Pinar del Río, tanto desde los puntos de vista biológico, por ser un componente de la diversidad de especies que esta declarado en peligro, como económico y social ya que sus frutos constituyen un importante producto forestal no maderero utilizado principalmente como materia prima para la elaboración del licor “Guayabita del Pinar”, uno de los símbolos que distinguen a esta provincia nacional e internacionalmente.

Por lo anteriormente expuesto se propone la siguiente **hipótesis**:

Los métodos utilizados hasta el momento para la reproducción no han podido dar respuesta a las necesidades de plantas para llevar a cabo la recuperación de ***P. salutare***, por lo que es de esperar que la inducción de brotes axilares *in vitro* a partir de segmentos nodales tomados de plantas provenientes de áreas naturales y de plántulas asépticas permitirá la regeneración de plantas completas, nueva vía para la reproducción de la especie, proporcionando plantas para la reintroducción a la naturaleza y el establecimiento de plantaciones comerciales.

Teniendo en cuenta la hipótesis, el trabajo se propone los **objetivos generales** siguientes:

Establecer una metodología para la propagación vegetativa de la especie a través de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*.

Caracterizar el desarrollo de las vitroplantas en condiciones de plantación utilizando los métodos de análisis del crecimiento

Los **objetivos parciales** son:

- Definir el procedimiento para el establecimiento del cultivo *in vitro* a través de la determinación del tipo de explante a cultivar, método de desinfección, control de la fenolización y medio de cultivo para el establecimiento.
- Determinar el medio de cultivo para la inducción de la brotación, la multiplicación y el enraizamiento definiendo el balance hormonal, así como las condiciones físicas del cultivo.
- Determinar los factores que más influyen durante la fase de aclimatación de las vitroplantas así como el posterior desarrollo en vivero.
- Caracterizar el desarrollo en plantación de las las plantas obtenidas por micropropagación.

La **importancia** de este resultado radica en que:

- Permite la reproducción del ***P. salutare*** y por tanto su preservación y recuperación, además crea las bases para la conservación del germoplasma de la especie.

- Permitirá al contar con un número suficiente de plantas crear plantaciones con la finalidad de producir frutos para la industria del licor, de una forma mucho más factible económicamente a como se realiza en la actualidad.

La **novedad científica** de este trabajo radica en la aplicación de la biotecnología vegetal con el fin del rescate y preservación de ***P. salutare***, atendiendo a la especie, los resultados del cultivo *in vitro* así como el análisis del crecimiento en plantación tienen total novedad.

Desde el punto de vista práctico el trabajo ofrece una metodología para la micropropagación de la guayabita del pinar, cuya efectividad ha sido comprobada en condiciones de producción o biofábrica como comúnmente se le denomina en Cuba a los laboratorios para la propagación masiva *in vitro* de plantas. Por otra parte la caracterización del crecimiento de las vitroplantas crea las bases para un correcto manejo agrotécnico en plantación.

Este estudio forma parte de un proyecto ramal aprobado por el Ministerio de Educación Superior (MES) llevado a cabo en el Centro de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Pinar del Río.

## 1. Revisión Bibliográfica

### 1.1 La especie

Nombre científico: ***Psidium salutare*** (HBK) Berg, (Berg, 1856, citado por McVaugh, 1963). se reconoce con los nombres comunes de: guayabita del pinar (Cuba), guayabito (Costa Rica), guayabito, arrayan, guayabito del Perú (Panamá).

El género ***Psidium*** de acuerdo a Berg (1856) (citado por McVaugh, 1963) incluye alrededor de 100 especies, es exclusivo de América, principalmente distribuido desde Méjico a Paraguay, Brasil y las Antillas el cual esta incluido en la familia *Myrtaceae*.

#### 1.1.1 Características botánicas (según McVaugh, 1963)

**Porte:** arbustos muy pequeños o subarbustos de 30 – 50 hasta 100 cm de altura (Figura 1a), ramitas jóvenes de redondeadas a cuadrangulares y abcostilladas, los ángulos escasamente alados, esparcidamente pilosa de pelos pálidos amarillentos de 0,5 – 0,8 mm de largo.

**Hojas** sésiles o subsésiles, de ovado – lanceoladas a ovado – elípticas o elípticas o elíptico oblongas de 1 – 6 cm de largo , 1 – 3 cm de ancho, ápice agudo o costumente – acuminado ,base redondeada, nervio central aplanado o ligeramente convexo hacia la base en el haz prominente y esparcidamente pelosa en el envés, nervios laterales de 6 – 9, escasamente elevados en el haz, prominente en el envés, con un ángulo de inclinación de 60 a 65 grados, nervio marginal poco definido y arqueado entre los laterales a 1 o 2 milímetros del margen, coriáceas o subcoriáceas, glabras o muy esparcidamente pelosas, lustrosas, verde oscuro en el haz, adpresa pubescente, principalmente cerca del nervio central y en la base, pardo verdosa a parda en el envés, en ambas superficies con glándulas grandes redondeadas, muy evidentes, peciolo ausente o generalmente subpeciolo a partir del ensanchamiento de la continuación del nervio central, 1 – 2 milímetros de largo y menos de 0.5 de ancho (Figura 1b).



Figura 1- a) Aspecto de una planta de ***P. salutare***, b) Detalle de las hojas.

**Flores** usualmente solitarias, muy raramente en dicasea con la flor terminal sésil, axilares, pétalos blancos de 6 a 7 milímetros de largo muy glanduloso, estambres de 200 a 250 de hasta un centímetro de largo. Floración de marzo a mayo (Figura 2a). **Fruto**, baya subglobosa hasta 1.5 centímetros de diámetro, de verdes a amarillos, al madurar comestibles, semillas numerosas (hasta 9) (Figura 2b).



Figura 2 – Flores (a) y frutos (b) de ***P. Salutare***.

### 1.1.2 Ecología y Biogeografía

De acuerdo a McVaugh (1963) *P. salutare* (HBK) Berg., habita en sabanas, colinas ocupadas por pinares y herbáceas o rocosas, hasta 1 000 metros sobre el nivel del mar. El reporta su distribución en Méjico, América Central (en Panamá), Colombia hasta las Guayanas, Cuba (Isla de Pinos) y La Española. Liogier (1989) reporta su distribución en manigua rasa en República Dominicana, Cuba, Méjico, América Central y Sur América hasta el Amazonas y Sánchez (1990) en Chiapas y Veracruz en Méjico, en Centroamérica, Las Antillas y Colombia hasta las Guayanas.

En Cuba solo habita en el extremo Occidental (Pinar del Río) y en la Isla de la Juventud en localidades abiertas de bosques de pinos sobre suelos ferralíticos, cuarcíticos, generalmente lixiviados y pobres en nutrientes. Suele encontrarse formando pequeños grupos e individuos aislados.

### 1.1.3 Situación actual de la especie

Entre las familias con diez o más especies amenazadas o extinguidas *Myrtaceae* ocupa el primer lugar con 87 (Borhidi, 1989), *P. salutare* está considerada como una especie en peligro<sup>1</sup>, debido fundamentalmente a la alteración, destrucción y fragmentación de sus hábitats por la actividad humana.

En Pinar del Río se señalan 7 areales principales (Figura 3) encontrándose la mayoría de los individuos aislados. Una característica sobresaliente de estas poblaciones es su envejecimiento, que se calcula en más de 70 años. Esto debe estar determinado por el bajo nivel de reproducción de la especie como consecuencia de la baja tasa de germinación de sus semillas (inferior al 30 %) aun en condiciones controladas y a la modificación de sus biotopos.

1

---

<sup>1</sup> Revista Jardín Botánico Nacional Vol. XIV – XV, 1993 - 1994

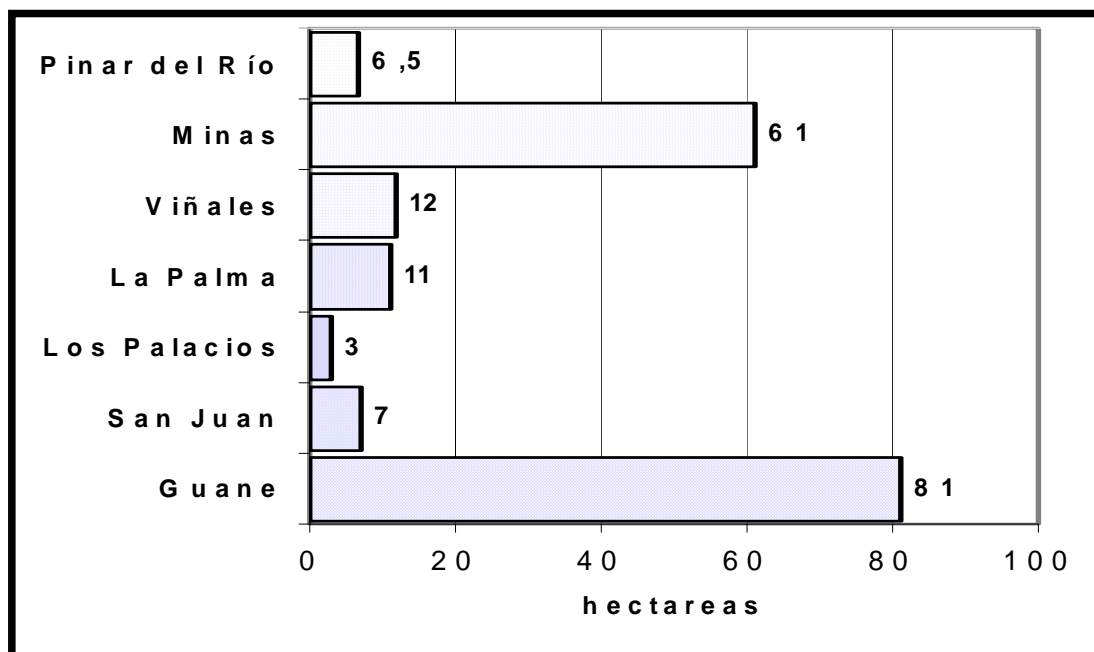


Figura 3- Principales areales del *P. salutare* en Pinar del Río.

Esta situación ha provocado que la reposición de los individuos que mueren o son destruidos sea prácticamente nula. Los intentos por reintroducir la especie en sus hábitats naturales han estado limitados por las dificultades de obtener posturas en viveros, debido como se señaló anteriormente, a la baja capacidad germinativa de sus semillas.

#### 1.1.4 Importancia y utilización de *P. Salutare*

De acuerdo a las características de su hábitat, *P. Salutare* debe considerarse como un producto forestal no maderero (PFNM). Esta expresión y otros términos similares como productos forestales “menores” o “secundarios” han surgido como expresiones generales para definir la vasta gama de recursos animales y vegetales diferentes de la madera que se derivan de los bosques o las especies arbóreas forestales.

Vantomme (1999) plantea que la FAO utiliza la expresión PFNM con referencia a todos los productos animales y vegetales derivados de fuentes silvestres y extraídos en zonas boscosas y/o de especies forestales. Los PFNM pueden también obtenerse de plantas semidomesticadas en plantaciones o sistemas



agroforestales, o pueden producirse en sistemas productivos intermedios con diversos grados de domesticación. Su condición de producto silvestre o semidomesticado lo diferencia de los agrícolas ya bien establecidos como la palma de aceite, el cacao, el coco, el caucho o el café.

Los PFNM han despertado un considerable interés a nivel mundial en los últimos años debido a un reconocimiento cada vez mayor de su contribución a las economías domésticas y a la seguridad alimentaria, así como a los objetivos ambientales como la conservación de la diversidad biológica.

Algunos PFNM constituyen también materias primas para procesos industriales de gran escala, inclusive de productos básicos comercializados a nivel internacional como bebidas y alimentos, aromatizantes, perfumes y medicinas. En la actualidad, por lo menos 150 de estos productos tienen una importancia significativa en el comercio internacional, por ejemplo, la miel, las gomas arábicas, el ratán, el corcho, las nueces y setas del bosque, aceites esenciales, y partes de animales o plantas para la elaboración de productos farmacéuticos (Catriona Prebble, 1999).

En Pinar del Río existe hace 105 años una fábrica única de su tipo en el mundo, que realiza el macerado de los frutos de ***P. Salutare*** para la elaboración del licor “Guayabita del Pinar” en sus dos surtidos dulce y seca, hoy comercializado en el mercado internacional. La materia prima para la elaboración de estos licores se colecta en las poblaciones naturales. Debido a la situación actual de la especie la producción de la fábrica en los últimos años se ha visto dañada por el ineficiente abastecimiento de los frutos. lo que ha significado la reducción de la fuente de empleo dentro de la industria y la pérdida de ganancias para el país. La producción actual de la fábrica es de 3 870 hectolitros (hL) y pretende en los próximos años incrementar su producción a 5 400 hL por la demanda que tiene el producto en el mercado y aumentar sus líneas de producciones a otros surtidos.

La cosecha de los frutos de guayabita para la industria se realiza tradicionalmente en las áreas naturales por parte del cuerpo de guardabosques

y campesinos individuales. Actualmente se han vinculado trabajadores forestales o campesinos a las poblaciones más abundantes de la especie con el fin de poder dar atenciones culturales a estas áreas y elevar los rendimientos.

La recolección de la fruta implica recorrer grandes áreas varias veces, pues son plantas dispersas y no todos los frutos tienen la calidad necesaria para ser colectados simultáneamente. Posteriormente los frutos son acopiados en lugares previamente acordados con la industria hasta ser recogidos.

Una característica de la cosecha de guayabita es su irregularidad, presentándose años con buenas producciones y otros con producciones muy bajas (Figura 4).

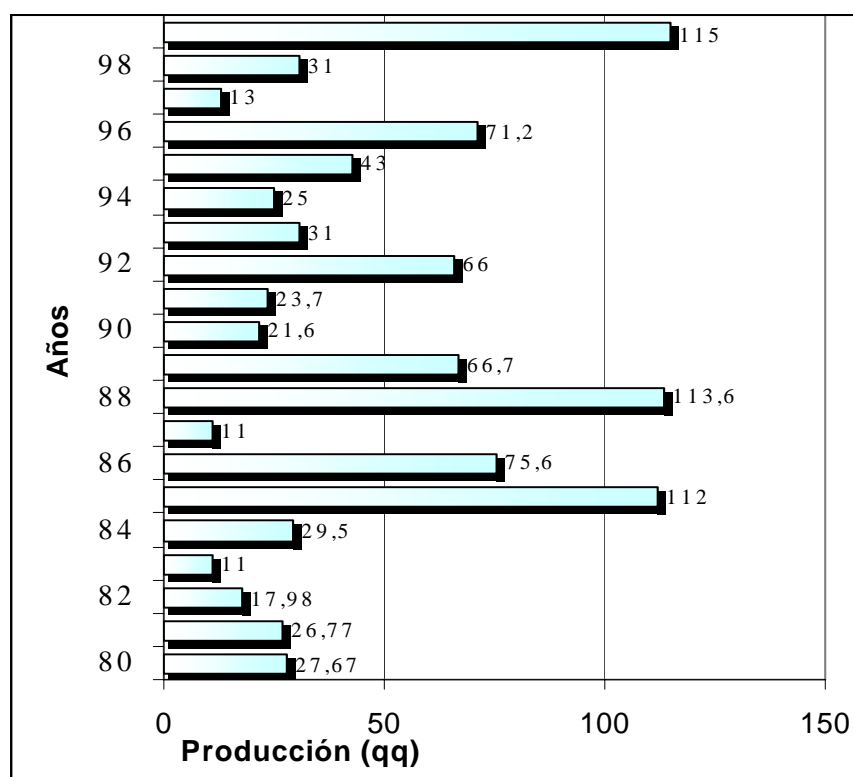


Figura 4 – Producción anual de frutos expresado en quintales (1 qq equivale a 45,35924 kg).

## **1.2 Importancia de la conservación de la biodiversidad**

La biodiversidad a nivel de genes, especies y ecosistemas se debe conservar y mantener a favor del desarrollo sostenible (Namkoong, 1991; citado por Kani y col., 1997). La diversidad de ecosistemas proporciona diferentes hábitats para las diversas especies que los habitan, enriqueciendo la diversidad de especies y procesos dentro de un ecosistema determinado.

La diversidad genética confiere adaptabilidad y potencial evolutivo a las especies que llevan tales genes (Ehrlich, 1990; citado por Kani, 1997). Por ello, en primer lugar hay que mantener los componentes de la diversidad, después hay que estudiarlos y finalmente basándose en estos conocimientos, hay que utilizarlos sosteniblemente (WRI, UICN, PNUMA, 1991; citados por Kani, 1997).

La mayoría de las especies amenazadas sobreviven en poblaciones muy pequeñas y es posible que un número considerable de estas perduren en la actualidad debido a la alta longevidad que presentan ya que la reproducción o reposición de los individuos que mueren es muy escasa.

Bramwell (1996), señala que las poblaciones están severamente amenazadas de extinción por dos razones, una asociada a las características genéticas de las poblaciones muy pequeñas y la otra relacionada con los cambios físicos en el hábitat.

En cuanto al número de individuos presentes en una población Bonet (1996) señala que si nos guiamos solamente por este parámetro, obtenemos una falsa idea de la diversidad genética de dicha población, podemos encontrar en un extremo, en el caso de organismos con reproducción vegetativa, amplias áreas con gran cantidad de individuos que provienen de muy pocos clones, en el otro extremo se pueden encontrar organismos de reproducción sexual que nunca presentan endogamia y que a pesar de su bajo número de individuos mantienen una gran riqueza genética.

Bonet (1996) plantea que cuando el tamaño de una población se reduce a niveles muy bajos, desaparece gran parte de la diversidad genética, y puede

que no sea capaz de sobrevivir y desaparezca a las pocas generaciones como resultado de diversos accidentes genéticos como la acción de genes deletereos que se manifiestan como resultado de la endogamia producida.

En muchas especies, los individuos que integran una población cuyos efectivos han disminuído mucho experimentan una reducción en su viabilidad y éxito reproductivo por motivos que nada tienen que ver con su constitución genética, y puede llegar a existir un umbral de densidad por debajo del cual la población no puede llegar a recuperarse, este efecto denominado “ efecto Allee “ puede ser debido a que los organismos modifican física o químicamente su medio, o a que su éxito de emparejamiento sea dependiente de la densidad (Herrera, 1993).

Como la deriva genética sobre varias generaciones en poblaciones muy pequeñas puede ser erosiva genéticamente, sería muy ventajoso para la recuperación el incremento de la población en el menor tiempo posible. En especies que la producción de semillas es baja y la germinación pobre, la propagación vegetativa juega un importante rol, especialmente el cultivo de tejidos; donde un gran número de plantas pueden ser regeneradas rápidamente (Branwell, 1996).

Texeira y col. (1998) señalan que la conservación genética de árboles nativos requiere el estudio de la propagación sexual y asexual, incluyendo la factibilidad del uso de las técnicas de micropropagación lo cual en muchos casos resulta ser la única vía para la propagación vegetativa y conservación de germoplasma.

### **1.3 La biotecnología en la recuperación de especies amenazadas**

El cultivo de tejidos de plantas es posible porque, aunque son un sistema complejo, integrado e interactuante de células, tejidos y órganos; las células individuales de las plantas son generalmente totipotentes, es decir tienen capacidad potencial de regenerar todo tipo de tejido.

Es por esto, que la formación de órganos de *novo* no depende de la presencia de un meristema pre - existente sino puede formarse a partir de cualquier tejido a través de procesos de dediferenciación y diferenciación celular.

El cultivo *in vitro* se ha utilizado para la propagación de especies amenazadas con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de germoplasma a mediano y largo plazo.

Las definiciones de cultivo de tejidos vegetales se reducen a métodos que producen plantas completas partiendo de fragmentos pequeños de tejidos, o células individuales que son cultivadas en un medio nutritivo artificial aséptico.

En 1988, Perea y Navarro acotando aún más el concepto señalan que el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* consiste en cultivar pequeños segmentos de plantas (explantos) sobre medios sintéticos y en condiciones controladas con el propósito de regenerar plantas enteras.

De acuerdo al origen se distinguen varios tipos de cultivos:

1. Cultivo de órganos.
2. Cultivo de meristemas.
3. Cultivo de células.
4. Cultivo de protoplastos.

Aunque todos pueden ser utilizados con el propósito de propagar especies amenazadas los dos primeros son los de mayor aplicación, mientras que los otros dos son utilizados principalmente en la ingeniería genética.

#### **1.4 La biotecnología en el mejoramiento genético**

El campo de la biotecnología vegetal es una de las áreas de investigación científica sobre plantas en las que se han registrado los avances más rápidos durante los últimos años, los resultados científicos alcanzados demuestran que es una vía factible para resolver los problemas más urgentes en el mejoramiento de los cultivos agrícolas.

En el caso de las especies forestales, los largos ciclos de vida, la talla de los árboles y las limitaciones para el cruzamiento de muchas especies, el uso de la biotecnología para el mejoramiento genético es particularmente atractivo para la propagación acelerada de material mejorado, selección de genotipos en etapas juveniles a través de marcadores moleculares o la conservación de germoplasma.

El alcance que puede lograr la biotecnología aplicada a especies forestales depende de su aplicación conjunta con los programas de mejoramiento ya existentes y que esté basado en conocimientos biológicos y silvícolas básicos de las especies de interés.

Según Haines y Martin (1997) Las principales aplicaciones de la biotecnología en el mejoramiento genético vegetal incluye:

- El almacenamiento "in vitro" y la criopreservación.
- El uso de los marcadores moleculares.
- La selección "in vitro".
- La ingeniería genética.
- El uso de la variación somaclonal.
- La fusión de protoplastos.
- Los cultivos haploides.
- Rescate de embriones *in vitro*.
- El control "in vitro" del estado de maduración.
- La micropropagación.

Por su interés y relación con este trabajo se hace referencia a continuación a dos de estas aplicaciones relacionadas con la conservación de germoplasma y la propagación *in vitro*.

#### **1.4.1 El almacenamiento *in vitro* y la criopreservación.**

El almacenamiento "in vitro" consiste en la micropropagación de material vegetal indiferenciado y totipotente en condiciones de laboratorio sobre medio

de cultivo, a temperatura e intensidad de luz reducida, en un ambiente gaseoso modificado con baja concentración de oxígeno, con vistas a prolongar la duración del ciclo de propagación en el laboratorio. Haines y Martin (1997) reportan que como material vegetal se han empleado diferentes partes de las plantas y semillas, alcanzándose éxito con varias especies arbóreas (*Pinus radiata*, *Alnus glutinosa*, *Eucalyptus sp.*, *Populus sp.*).

Muchas especies de plantas presentan serios problemas pues su germoplasma no puede ser mantenido por las técnicas convencionales. Es por esto, que el segundo campo de aplicación del cultivo de tejidos a la preservación de especies amenazadas, lo constituye la conservación a largo y mediano plazo de las plantas *in vitro*.

La criopreservación consiste en el pretratamiento del material vegetal y la suspensión del metabolismo mediante enfriamiento a temperaturas ultrabajas por etapas sucesivas, para finalmente almacenarlo.

Bramwell, (1996) describe tres métodos básicos para el mantenimiento de los cultivos:

1. Cultivo *in vitro* normal, manteniendo los tejidos como explantes indiferenciados, transfiriendo regularmente a un nuevo medio de cultivo.
2. Crecimiento mínimo, usando inhibidores del crecimiento y bajas temperaturas.
3. Criopreservación o preservación a muy bajas temperaturas como la del nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

En la conservación a mediano plazo se utilizan principalmente las técnicas de crecimiento mínimo *in vitro*, estas han sido desarrolladas en numerosas especies, pero su uso es aún restringido a pesar de que su flexibilidad, simplicidad y práctica están claramente demostradas.

Bertrand y col, (1991) estudiaron la influencia de bajas concentraciones de citocinina en la conservación a través de crecimiento mínimo de germoplasma ***Coffea sp.*** Toledo y Golmirzaie, (1998) reportan períodos entre subcultivos de

1,2,3,4 y 5 años en la conservación de germoplasma de ***Solanum sp.*** bajo condiciones de estrés osmótico. Meristemas de ***Melia azedarach*** son conservados durante 6 meses en medios pobres de nutrientes con bajas temperaturas (4°C) y luego recultivados en condiciones óptimas, posibilitando la regeneración de plantas (Mroginski y col, 1998).

La crioconservación permite el almacenamiento a largo plazo del material vegetal sin modificaciones o alteraciones, protegido de contaminantes y con un mantenimiento mínimo. En años recientes técnicas simples de congelamiento han sido desarrolladas para ápices y embriones de un gran número de especies, incluyendo varias del trópico. González y col. (1998) reportan la crioconservación de ápices de piña por vitrificación, con niveles de recuperación de un 25 a 65 %.

Las Investigaciones en este campo son necesarias para optimizar las técnicas actuales y desarrollar protocolos para una mayor cantidad de especies; así Roca y col. (1998) informan que la crioconservación de ápices de yuca mediante encapsulación – deshidratación , es una técnica que presenta ventajas frente a la congelación programada (protocolo clásico) ya que reduce los riesgos de daño, simplifica el proceso previo a la congelación y elimina el uso de programador entre otros.

Con especies forestales se ha reportado su utilización con embriones de ***Quercus petraea***, ***Fagus silvatica***, ***Aesculus hippocastanum***, ***Araucaria excelsa***, ***Castanea sp.***, ***Artocarpus sp.*** y ***Juglans insularis***; en líneas de células embriogénicas de ***Picea glauca***, ***Acer pseudoplatanus***, ***Picea abies*** y ***Pinus taeda***; en semillas de ***Abies alba***, ***Sequoiadendron giganteum***, ***Larix decidua***, ***Pseudotsuga menziesii***, ***Picea abies*** y ***Pinus sylvestris***; con polen de ***Betula pendula***, ***B. pubescens***, ***Larix decidua***, ***L. kaempferi***, ***Pseudotsuga menziesii***, ***Picea abies***, ***Pinus sylvestris***, ***Quercus petraea*** y ***Q. robur*** y en puntas de raíces encapsuladas de ***Eucalyptus gunnii*** (Haines y Martin 1997).



### 1.5 Micropropagación

Según Roca y Mrogrinski (1993) las vías utilizadas para la micropropagación son las siguientes:

- a) Empleo de yemas axilares.
- b) Empleo de yemas adventicias.
- c) Empleo de embriogénesis somática.

Todas estas técnicas se caracterizan por velocidades potenciales de multiplicación progresivamente crecientes (desde las yemas axilares hasta la embriogénesis somática), cantidades progresivamente decrecientes del número de especies en las que se han reportado éxitos y una restricción a materiales juveniles aparentemente creciente. Más de 1000 especies de plantas pueden ser micropropagadas ahora, incluyendo muchas especies forestales, señalándose más de 70 angiospermas y más de 30 gimnospermas entre las especies arbóreas para las que han sido reportados métodos exitosos de producción de plántulas y sólo entre los Eucaliptos se han relacionado más de 25 especies.

Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro*. En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas y más recientemente en especies leñosas (Thorpe, 1983; citado por Roca, 1993). En algunas especies el propio autor señala que esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, ellas son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajos costos y en tiempo económicamente costeable.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.

- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existen pocos individuos.

a. Estímulo de yemas axilares.

En este caso, el empleo de las yemas axilares permite la formación de una planta por cada yema. Aquí la eficiencia del sistema radica en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el inóculo, además los individuos regenerados muestran una gran estabilidad genética.

La multiplicación de plantas por medio del subcultivo secuencial de explantes de yemas axilares ha sido desarrollado para un gran número de especies y es la base de la mayoría de los sistemas comerciales. En esta categoría está incluido el sistema de yemas axilares del Eucalipto, aunque algunas de las yemas múltiples provenientes del cultivo pueden ser en origen adventicias.

Aún cuando los mejores resultados para las especies forestales han sido obtenidos con plantas jóvenes, el método ha sido aplicado satisfactoriamente con árboles viejos de ciertas especies, al respecto Haraguchi (1998) reporta la propagación clonal *in vitro* de seis árboles seleccionados de la especie ***Zelkova serrata*** de entre 500 y 800 años de edad. .

Comparada con otras técnicas de micropropagación, las proporciones de multiplicación son bajas, 5 a 10 propágulos / ciclo de cultivo. Sin embargo, aún con un factor de multiplicación de este orden, pueden obtenerse millones de plantas por año para muchas especies y para los Eucaliptos las cantidades son frecuentemente mayores. Las respuestas favorables en los Pinos están generalmente limitadas a los árboles jóvenes y las velocidades de propagación son bajas.

Para Martínez - Pulido (1990) el sistema de producción a partir de yemas axilares le llaman conservativo, debido a su capacidad relativa de producir plantas genéticamente idénticas a la planta madre. Por esta razón, es la técnica preferida a menudo en los laboratorios comerciales de plantas leñosas, a pesar de su relativo bajo potencial de multiplicación si se compara con otras vías.

b. Diferenciación de brotes adventicios.

Incluye sistemas que contemplan la inducción directa sobre explantes y las que comprenden la diferenciación de yemas adventicias en cultivos de callos. Los protocolos del sistema de nódulos meristemáticos están bien descritos para los Abetos y el Pino radiata, comprendiendo la formación, multiplicación y la regeneración final de plantas a partir de asociaciones de células esféricas que presentan diferenciación tisular y alguna vascularización. Estos son sistemas similares a los reportados para un número de especies herbáceas. En general, los tejidos juveniles han respondido mucho mejor que los adultos y particularmente con las coníferas, los embriones han sido los explantes favoritos. Con especies que responden, las velocidades de multiplicación por medio de yemas adventicias son comúnmente sustancialmente mayores que con yemas axilares. Por ejemplo, en pino radiata se estimó que un embrión de uno de los clones de mejores respuestas podría producir 260 mil plantas listas para plantar en 2,5 años.

Este sistema permite la regeneración de una mayor cantidad de brotes que el sistema de yemas axilares. Los brotes adventicios tienen su origen en la formación de tejidos meristemáticos y la posterior diferenciación de ápices, ya sea directamente o a partir de callo originado también del explante, este último puede traer como consecuencia la variabilidad fenotípica en los clones diferenciados.

c. Embriogénesis somática.

En condiciones *in vitro* es factible diferenciar embriones a partir de células tanto del esporofito como del gametofito. Este proceso de diferenciación se observó por vez primera en células suspendidas de ***Daucus carota*** (Reinert,

1959, citado por Roca, 1993). Desde ese primer descubrimiento se ha incrementado notablemente el número de especies que han mostrado esta capacidad regenerativa.

Aparentemente, los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la fuente y la concentración de nitrógeno y algunas otras sustancias como la sacarosa. Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema más eficiente, si se considera la eficiencia como el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo ya que todo hace suponer que por cada célula suspendida en el medio de cultivo se está diferenciando una planta (Roca, 1993).

Según Haines y Martin (1997) aunque menos empleada que las otras tecnologías, la regeneración por medio de la embriogénesis ha sido reportada para más de 50 especies forestales, incluyendo más de 20 familias de las angiospermas y al menos, una docena de coníferas, estando entre ellas especies de ***Picea***, ***Pinus***, ***Larix***, ***Abies***, ***Pseudotsuga***, ***Sequoia*** y algunos ***Eucalyptus***. Las especies de Pinos han presentado un comportamiento algo recalcitrante comparadas con las de ***Picea***. Para la mayoría de las especies, en particular las coníferas, las respuestas favorables sólo pueden obtenerse empleando explantes de material embrional o de plántulas jóvenes. Las velocidades potenciales de multiplicación, particularmente a partir de cultivos de suspensiones celulares, son muy elevadas; sin embargo, la proporción de conversión de estos embriones en plántulas permanece muy baja y las velocidades de multiplicación alcanzadas están muy por debajo del potencial. Por ejemplo, en ***Picea*** se obtienen 200 embriones/ml de cultivo en 48 h pero sólo un 4 % de plantas, con una eficiencia media máxima. El desarrollo comercial de sistemas de embriogénesis somática aún no ha sido reportado.

### 1.5.1 Fases de la micropropagación

En la actualidad se reconocen cinco fases para el proceso de micropropagación, estas son:

**Fase 0** (Fase preparativa) – Se le reconoce como fundamental para el establecimiento de un sistema de micropropagación eficiente y repetible,

incluye la selección de las plantas donantes de explantes, los pretratamientos a estas plantas, consistentes en la aplicación de tratamientos fitosanitarios y de ser posible su cultivo en ambientes controlados.

**Fase I** (Establecimiento del cultivo) - Esta etapa de la micropropagación tiene como objetivo el establecimiento de cultivos asépticos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación, incluye la selección, la desinfección y el control de la oxidación fenólica de los explantes así como la determinación del medio de cultivo para el inicio del cultivo *in vitro*.

#### El explante

Son pequeños segmentos de tejidos cuya finalidad es su cultivo aséptico. George y Sherrington (1984) señalan que el estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante y Hussey (1986) la estación del año, las condiciones de crecimiento y la edad del donante, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro*.

Es posible utilizar una gran variedad de explantes para iniciar los cultivos *in vitro*, la utilización de uno u otro tipo depende de la especie y de los objetivos de la propagación.

#### Desinfección del explante

El control fitosanitario de las plantas desde donde se obtendrán los explantes favorece el proceso de desinfección, por eso se plantea comúnmente que los donantes deben crecer en un ambiente tan limpio como sea posible.

Para la eliminación de los microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. Generalmente se cortan de un tamaño algo superior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final (Hu y Wang, 1983).

Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaOCl), hipoclorito de calcio (CaOCl), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>). Los tres primeros se emplean en

concentraciones de 1 – 3 % en tiempos de 10 a 20 minutos, el alcohol se usa generalmente al 70 % y se emplea en combinación con otros desinfectantes. El bicloruro de mercurio es el más tóxico y se emplea en dosis bajas y en corto tiempo (0,05 al 0,1 % durante períodos de 1 a 5 minutos). Terminado el tiempo de inmersión en el desinfectante se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos del mismo.

### Oxidación fenólica

Las oxidaciones fenólicas constituyen un serio problema en el establecimiento y supervivencia de los explantes. Este fenómeno es más agudo en las especies leñosas.

En general los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad, los mismos pueden ser fitotóxicos y a la vez incrementar otros procesos oxidativos del metabolismo secundario, consecuencia letal para el explante.

Las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica se pueden resumir de la siguiente forma:

- Enjuagues en soluciones antioxidantes previo y posterior a la disección de los explantes.
- Adición de antioxidantes al medio de cultivo (inhibidores de la polifenoloxidasas o absorbentes).
- Cambios frecuentes de medio de cultivo.
- Disminución de la intensidad luminosa.
- Empleo de medios líquidos.
- Modificación del pH del medio.
- Cambios en el nivel de sacarosa en los medios.
- Regulación de la temperatura.

Los antioxidantes más empleados han sido:

- Ácido ascórbico.
- Ácido cítrico.

- Polivinilpirrolidona (PVP).
- L-Cisteína.
- Dithiotreitol.
- Tiourea.
- Carbón activado.

### Medios de cultivo

López Cristina, (1990) plantea que para un crecimiento adecuado las plantas necesitan tomar del suelo cantidades de macronutrientes y micronutrientes. El medio de cultivo debe contener además carbohidratos (sacarosa como fuente de carbono) para reemplazar el carbono que la planta fija normalmente de la atmósfera por medio de la fotosíntesis e incluir compuestos orgánicos como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento.

Los medios más usados para promover la organogénesis en especies forestales son: Murashige & Skoog, 1962 (MS); Shenck & Hildebrandt, 1975 (SH); Lloyd & McCown, 1981 (WPM).

En dichos medios se incluyen varias vitaminas, aunque la única a la que se le ha demostrado su efecto claro es a la Tiamina ( $B_1$ ), aportada en concentraciones de 0.1 y 1 mg/L (Gamborg, 1984). Asimismo Krikorian, (1991) reporta que se han señalado efectos favorables del ácido nicotínico, la piridoxina ( $B_6$ ) y la riboflavina ( $B_2$ ) sobre el crecimiento.

Otro factor que puede afectar la organogénesis es el pH del medio. Al respecto Jirř, (1993) plantea que los cambios de pH son el mejor factor que controla la desrepresión del DNA y las síntesis de proteínas y por tanto el patrón morfogenético, se ha comprobado que en callos iniciados a pH 3,5 después de transferidos a otro medio era más intensa la formación de brotes, no ocurriendo así en los obtenidos inicialmente a 5,5 o 4,5. Por debajo de 2,5 los callos nunca diferenciaron.

En cuanto a la luz Calvo y Segura, (1989) emplearon tres condiciones de fotoperíodo: 16 horas-luz, solo oscuridad y oscuridad durante 4 semanas, seguidas de 4 semanas de exposición a la luz. Ellos encontraron que el fotoperíodo de 16 horas-luz fue la mejor condición, en términos de porcentaje de yemas regeneradas.

El rol más importante entre los componentes del medio de cultivo es jugado por los reguladores del crecimiento vegetal (fitohormonas), los cuales determinan los procesos de diferenciación o dediferenciación celular. La diferenciación incluye los fenómenos o cambios que conduzcan a la especialización de células, tejidos y órganos (Barceló y col., 1992).

Si bien antes se atribuían efectos específicos en la diferenciación y la morfogénesis a determinado regulador del crecimiento, hoy en día la idea más lógica es que ambos procesos están controlados por los equilibrios entre sustancias hormonales (Barceló y col., 1987).

El hallazgo del factor que promovía la división celular en preparaciones degradadas de DNA, identificada como cinetina condujo a los estudios de inducción de la formación de órganos a partir de cultivos de callos en tabaco. Skoog y Miller, (1958) descubren en estos cultivos que la relación citoquinina/auxina elevada inicia la formación de yemas; mientras que la relación baja favorece la emisión de raíces; demostrándose la importancia de dichas relaciones en la determinación de la respuesta morfogenética *in vitro*.

El papel de los reguladores del crecimiento ha sido ampliamente estudiado sobre todo el balance que debe existir entre auxinas/citoquinina para promover brotes o raíces, sin embargo la importancia de la giberelinas en el cultivo *in vitro* parece ser mucho más débil, aunque generalmente inhiben la diferenciación, estimulando algunas veces la formación de yemas, órganos, etc., (Jarret y Hasegawa, 1981)

**Fase II (Multiplicación)** – Se considera la fase más importante dentro de un programa de propagación *in vitro*. Su objetivo es la producción del mayor



número posible de propagulos. La proliferación de los explantes se logra con la adición al medio de cultivo de hormonas vegetales. Los explantes al ser divididos en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medio fresco emiten nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de propagulos deseados.

**Fase III** (Enraizamiento) – En esta fase cada brote debe ser cultivado de forma individual en un medio de cultivo donde por lo general se adicionan auxinas para la iniciación y crecimiento de las raíces.

**Fase IV** (Aclimatación) - Es una de las etapas más complejas de la micropropagación, las condiciones ecológicas en que se desarrollan las vitroplantas producen una serie de cambios fisiológicos y anatómicos que provocan que una gran cantidad de plantas no sobrevivan el trasplante a las condiciones ambientales, esto hace necesario aplicar técnicas de aclimatación *in vitro* o *ex vitro* que garanticen un retorno gradual de estas a sus características morfológicas normales.

Las técnicas más eficaces durante esta fase, son las que van encaminadas a lograr gradualmente menos humedad relativa, más luz, crecimiento autotrófico y un medio séptico (Agramonte y col. 1998).

Durante las primeras dos semanas después del trasplante es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular en este período las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones.

Para evitar el exceso de transpiración de las plantas, hasta que logren un adecuado desarrollo de los estomas y la cutícula, es necesario mantener una alta humedad relativa (Ziv, 1995). El método más utilizado es el riego en forma de niebla. Otro método se basa en colocar cobertores de polietileno u otros materiales sobre las plantas, los cuales son retirados después de varios días.

Un aspecto importante durante la aclimatación es el sustrato, estos además de ser el sostén mecánico de la planta, deben permitir que las raíces tomen aire y agua. Los materiales más usados son la turba, el humus de lombriz, el compost y la zeolita.

### **1.6 Desarrollo de las vitroplantas en condiciones de cultivo.**

Sin dudas, en última instancia el aspecto que decide la factibilidad de la aplicación de la biotecnología es el comportamiento del crecimiento y desarrollo las vitroplantas en condiciones de cultivo.

Son de esperar de acuerdo a las ventajas que se le atribuyen a la micropropagación, incrementos en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento y a la uniformidad de las plantas producidas. El análisis del crecimiento de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* debe constituir una herramienta eficaz para comprobar las ventajas antes señaladas.

#### **1.6.1 Análisis del crecimiento.**

Caso (1980) plantea que durante mucho tiempo los fitofisiólogos de distintos países trataron de encontrar una ley única que permitiese expresar, en forma matemática, el incremento de masa o volumen de un sistema en crecimiento. Se suponía que, en caso de hallarse dicha expresión matemática, sería posible predecir el crecimiento final, o sea el posible rendimiento de una planta o cultivo. Este mismo autor continúa planteando que la búsqueda de esa ley ha sido infructuosa ya que el crecimiento es el resultado de reacciones muy complejas del metabolismo, sujetas a controles en diferentes niveles (intracelular, extracelular, intercelular) y que depende de diferentes sustratos ( $O_2$ ,  $H_2O$ ,  $CO_2$ , nutrientes minerales).

Es posible analizar matemáticamente el crecimiento de todo órgano, individuo, colonia o población y expresar el aumento en forma de peso, volumen, altura, etcétera.

Al representar el tamaño de un individuo en un sistema de coordenadas en función del tiempo, se obtiene una curva de forma sigmoidea. Armas y col. (1988) señalan que estas curvas son expresión del crecimiento en general.

Las características de las tres fases en que se divide toda curva sigmoidea del crecimiento son:

Fase 1 – El aumento se produce en forma exponencial, o sea en una progresión geométrica. Durante esta fase el crecimiento ocurre con la máxima intensidad, virtualmente no limitado por los factores externos.

Fase 2 – Se caracteriza porque a períodos iguales de tiempo corresponden aumentos iguales de crecimiento, sin que importe el tamaño del sistema considerado. Esta fase se denomina lineal o rectilínea y es característica de los aumentos de longitud, volumen, peso, etc.

Fase 3 – Se caracteriza por un crecimiento desacelerado, en su transcurso el sistema se vuelve cada vez menos efectivo hasta que cesa completamente. Se le denomina también fase de envejecimiento o senescencia.

Las curvas del crecimiento que se obtienen experimentalmente pueden representarse mediante una fórmula matemática, es decir, mediante modelos que facilitan la realización de comparaciones entre los diversos materiales que se estudian o las diferentes condiciones experimentales que afectan a ese crecimiento (Barceló y col., 1982).

Armas y col. (1988) indican que en la actualidad se reconocen dos métodos de cálculo de los índices del crecimiento, denominando clásico al que utiliza los valores medios de los índices y funcional o de regresión, al que emplea las funciones matemáticas para el ajuste de los datos y deriva los índices de estas.

Torres (1984) refiere que el método funcional, o de regresión, del análisis del crecimiento, ha sido criticado sobre la base, fundamentalmente, de criterios en contra de la formulación de modelos del crecimiento.

Necas (1965) citado por Torres ha planteado que el método clásico del análisis del crecimiento, pudiera reservarse para estudios de naturaleza ecológica; mientras que el funcional pudiera emplearse cuando se requiera tener una visión general del fenómeno del desarrollo, como en el caso de los estudios genéticos, de nutrición, etc.

Por otra parte, Hunt (1979) citado por Torres (1984) puntualizó una serie de ventajas que se logran en el ajuste de las curvas del crecimiento por medio de funciones matemáticas; entre las que se pueden señalar:

- A. La comparación equitativa de grupos de datos de orígenes diferentes, pero tratados de forma similar.
- B. No resulta necesario realizar las diferentes suposiciones relacionadas con el cálculo de la tasa de asimilación neta y la relación de área foliar.
- C. La información de todos los momentos de muestreo se tienen en cuenta para el cálculo de las variables que se deriven de las curvas del crecimiento.
- D. El procedimiento no depende de un gran número de plantas y en cada muestreo la cantidad de información a riesgo es mínima.
- E. La evaluación de plantas con diferentes tratamientos que crezcan simultáneamente, no tiene que estar sincronizada, ya que es factible la comparación por interpolación.

### **1.7 Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos a especies amenazadas**

Son varias las motivaciones que inducen a los estudios para la aplicación del cultivo de tejidos y son varios los trabajos llevados a cabo con este fin.

Martín y Pérez (1992), reportan la multiplicación *in vitro* de ***Limonium estevei*** Fdez. Casas, especie clasificada como vulnerable con solo una población conocida y severamente amenazada por proyectos de urbanización, logrando la micropropagación a partir de segmentos nodales cultivados en el medio MS con BAP solo o con AIB, logrando el enraizamiento en el medio MS sin reguladores del crecimiento.

Daquinta y col. (1998), reportan la morfogénesis *in vitro* de callos de flores inmaduras y yemas del tallo floral de ***Dyckia dystacha***, bromelia ornamental de lenta multiplicación y en peligro de extinción, en el medio MS, con diferentes concentraciones de picloran, logrando flores o brotes en dependencia de los reguladores utilizados.

Ribas y col. (1998), inducen la formación de embriones somáticos de ***Aspidosperma polyneuron*** Muell. Arg., árbol en peligro de extinción con dificultades para propagarse por lo irregular de la fructificación y lo difícil de cosechar las semillas, a partir de embriones de semillas inoculadas en el medio con 2,4 D, combinado o no con Kin, BAP o TDZ (Tidiazuron).

Morte y Honrubia (1996), describen un protocolo de micropropagación para ***Tetraclinis articulata***, especie relict, en el medio SH con 2,2 micro Moles de BAP para yemas como explantes y 22 micro moles de BAP para cotiledones y el enraizamiento en el mismo medio con 9,8 micro  $\mu\text{m}$  de AIB y 10,7  $\mu\text{m}$  de ANA.

Morales y col. (1998), trabajan en el establecimiento de ***Diospyros crassinervis*** (Krug y Urb) Standl, árbol tropical cuya madera tiene un alto valor comercial, considerado en peligro de extinción por la reducción de las poblaciones.

### 1.8 Aplicaciones del cultivo de tejidos a especies forestales.

La aplicación de los métodos convencionales de propagación vegetativa de especies forestales ha estado bastante limitada por la dificultad que presentan la mayoría de estas, particularmente los individuos maduros o adultos, para propagarse por estos medios, lo que se suma a la considerable elevación de los costos cuando se pretende propagarlos en proporciones comerciales.

En las especies forestales, la utilización de la propagación vía asexual para garantizar el clonaje, se ha reducido al establecimiento de huertos semilleros clonales a partir de la selección individual de árboles superiores

fenotípicamente y en menor escala a la realización de ensayos clonales para evaluar la aptitud recombinante o estimar la varianza genética. No obstante, alrededor de 50 especies diferentes de plantas leñosas han sido exitosamente propagadas a escala industrial (Morris, 1990).

El uso de las técnicas de micropropagación, fusión de protoplastos, mutagénesis, cultivos de embriones o embriogénesis somática, bien sea para los planes de mejoramiento o de rescate de las especies forestales con semillas recalcitrantes, constituyen las principales líneas de trabajo en los últimos años, por lo que en la actualidad se han iniciado programas de investigación con miras a la propagación aséptica de especies forestales leñosas de importancia económica, que permitan obtener mayores cantidades de plántulas mejoradas, a niveles económicos con una mayor uniformidad genética.

Para Villalobos y Engelman (1995) la propagación y conservación *in vitro* de especies con cierto grado de deterioro es determinante para los programas de protección *ex situ*, mantenimiento de la diversidad biológica y la reforestación.

El alcance que puede lograr la biotecnología aplicada a especies forestales depende de su aplicación conjunta con los programas de mejoramiento ya existentes y que esté basado en conocimientos silvícolas básicos de las especies de interés.

En Cuba estas actividades se encuentran en una etapa primaria de desarrollo, por ser las que más recientemente han comenzado, aunque ya se han alcanzado algunos resultados básicos relacionados fundamentalmente con las técnicas de micropropagación de ***Hibiscus elatus*** (Gil y col.1989), ***Eucalyptus pellita*** (Noda,1998), ***Eucalyptus saligna*** (García y col.1998), ***Eucalyptus citriodora*** (García y col.(1998), ***Eucalyptus grandis*** (Delgado y col. 1999).

En la actualidad se trabaja en poner a punto las tecnologías de micropropagación de ***Pinus caribaea*** var. *caribaea*, ***P. tropicalis***, ***Swietenia sp.*** y ***Cedrela odorata***.

***P. caribaea*** var. *caribaea* es la especie que más avanzado tiene su programa de mejoramiento genético. Alvarez (1998) plantea que tal nivel de desarrollo ya amerita el comienzo de la propagación masiva in vitro para la aplicación de los principios de la silvicultura clonal mediante la cual se pueden aprovechar simultáneamente las ventajas alcanzadas en la varianza genética aditiva por la selección y el componente de la varianza genética no aditiva que escapa al programa de mejoramiento, lo cual constituiría el objetivo inmediato de la aplicación de la biotecnología en esta especie.

## 2. Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas perteneciente a la Facultad de Agronomía y Forestal de la Universidad de Pinar del Río.

### 2.1 Obtención del explante

Como explantes se utilizaron segmentos nodales, obtenidos a partir de las siguientes fuentes:

- Plántulas asépticas (obtenidas por la germinación *in vitro* de semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% de cloro activo).
- Brotes juveniles de plantas adultas en poblaciones naturales.
- Rebrote emitidos de ramas leñosas colocadas en recipientes con agua en el Laboratorio, colectadas en las poblaciones naturales de la especie.

### 2.2 Establecimiento del cultivo aséptico

Teniendo en cuenta la alta susceptibilidad a la fenolización de los explantes, en esta etapa se combinaron simultáneamente la desinfección superficial y el control de la oxidación fenólica, para cumplir estos objetivos se ensayaron los siguientes procedimientos:

#### Procedimiento 1:

- Colecta del material en solución de ácido cítrico 200 mg/L + ácido ascórbico 150 mg/L .
- Seccionado de los rebrote en segmentos nodales.
- En el flujo laminar, desinfección con solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% de cloro activo durante 20 minutos.
- Enjuagues con solución estéril de Cisteína 25 mg/L .

#### Procedimiento 2:

- Colecta del material en solución de Cisteína 25 mg/L .
- Desinfección con solución de fungicida Benomil 0.5 g/L durante 30 minutos.
- Seccionado de los brotes en segmentos nodales.



- Desinfección con NaOCl al 2% de cloro activo durante 15 minutos.
- Inmersión en solución de sacarosa al 2% + Polivinilpirrolidona (PVP) 2 g/L durante 1 hora.
- En el flujo laminar, desinfección con solución de bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) a 0.1% durante 5 minutos.
- Cinco enjuagues con solución estéril de Cisteína 25 mg/L .

### Procedimiento 3:

- Pretratamiento a los rebrotes desde la colecta de las ramas con solución de oxícloruro de cobre 1% cada dos días.
- Colecta del material en solución de Cisteína 25 mg/L .
- Seccionado de los rebrotes en segmentos nodales.
- Desinfección con NaOCl al 1% de cloro activo durante 10 minutos.
- Inmersión en solución de sacarosa al 2% + PVP 2 g/L durante 1 hora.
- En el flujo laminar, desinfección con solución  $\text{HgCl}_2$  a 0,1% durante 4 minutos.
- Cinco enjuagues con solución estéril de Cisteína 25 mg/L .
- Inmersión en solución estéril de sacarosa al 2% + PVP 2 g/L durante 1 hora.

### 2.3 Medios de cultivo

En el establecimiento e inducción de la brotación se utilizaron los medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementados con vitaminas Gamborg (1984) y sacarosa 3%. En estos se probó el efecto de la Cisteína y el PVP como antioxidantes a diferentes concentraciones (Tabla 1) así como diferentes niveles de 6 – benzilaminopurina (BAP) (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,6 y 1,0 mg/L) para la inducción de la brotación. El pH fue ajustado a 5,7 con hidróxido de sodio NaOH o ácido clorhídrico HCl (1N).

Tabla 1. Antioxidantes empleados y concentraciones en los medios de cultivo.

Cisteína mg/L	25	50	75
PVP g/L	2	5	7

Los experimentos fueron evaluados a los 7 días teniendo en cuenta:

Porcentaje de explantes contaminados (C).

Porcentaje de explantes fenolizados (**F**).

Porcentaje de explantes establecidos (**E**).

Además se cuantificó el porcentaje de explantes que emitieron brotes por cada concentración de BAP añadida al medio de cultivo.

Como agente solidificante utilizó Agar Tipo E 5 g/L.

Los medios de cultivo se distribuyeron en tubos de ensayo con capacidad de 60 ml (15 ml/tubo) o en frascos con capacidad de 200 ml (25 ml/frasco) y se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 120°C de temperatura y 1,5 atmósferas de presión.

## 2.4 Multiplicación

Los segmentos nodales obtenidos a partir de plantas asépticas y de los brotes inducidos en la etapa anterior se cultivaron en medios constituidos por las sales del medio MS, suplementado con vitaminas Gamborg, 3% de sacarosa y Cisteína 25 mg/L , pH 5,7, solidificado con agar Tipo E 5 g/L. Para definir el balance hormonal más adecuado para esta fase de multiplicación se estableció un diseño con tres niveles de BAP y cuatro niveles de ácido indolacético (AIA) (Tabla 2).

Tabla – 2 Diseño para determinar el balance hormonal más eficaz para la multiplicación. (cada letra representa una variante o tratamiento)

VARIANTES mg/L		AIA			
		0	0.1	0.3	0.5
<b>B A P</b>	1	A	D	E	F
	1.5	B	G	H	I
	2	C	J	K	L

En esta etapa se evaluó a las 6 semanas: Número de brotes por explante.

Longitud de los brotes (mm).

Análisis biométrico: El experimento siguió un diseño completamente al azar con análisis de varianza bifactorial (Factor 1 BAP, Factor 2 AIA), a través del paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows, versión 8, 1998 (SPSS) , para  $\alpha = 5\%$  y  $N=12$ .

## 2.5 Enraizamiento

Los brotes se individualizaron y se cultivaron en tubos de ensayos con soporte de papel o en frascos sobre medio sólido. Se utilizó como medio base el WPM (Lloyd & Mc Cown, 1981) a la mitad de la concentración de las sales complementado con vitaminas Gamborg, (1984), 1,5% de sacarosa y Cisteína 25 mg/L. Para la inducción del enraizamiento se probaron las siguientes variantes hormonales :

Tabla 3 – Variantes hormonales probadas para inducir el enraizamiento.

Auxina		Concentración mg/L					
Testigo		Sin auxina					
AIA	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	1,0
AIB	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	
ANA	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	
2,4 D	0,1	0,2	0,3	1,0			
AIB + ANA	0,1 + 0,1		0,2 + 0,2				

En cada una de las variantes se probó la adición o no de 1% de carbón activado. El pH de los medios fue ajustado a 5,7.

El experimento se evaluó a través de la determinación del porcentaje de brotes enraizados en cada variante hormonal. Para el análisis estadístico los valores fueron transformados calculando la raíz cuadrada ( $\sqrt{x}$ ).

Análisis biométrico: El experimento siguió un diseño completamente al azar con análisis de varianza simple, a través del paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows, versión 8, 1998 (SPSS) , para  $\alpha = 5\%$  y  $N=20$ .

#### Condiciones físicas del cultivo

Los cultivos se mantuvieron en cámaras con temperaturas entre 23-27°C con un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa entre 3-4 klx obtenida de lámparas fluorescentes .

### **2.6 Aclimatación**

La etapa post *-in vitro* se llevó a cabo en condiciones de umbráculo (malla plástica 70% de sombreado) durante las primeras 4 semanas. Se utilizaron plántulas enraizadas de ***P. salutare*** tanto en medio de cultivo líquido como sólido.

Se probaron dos condiciones ambientales para la aclimatación:

a.- *Con cobertor de nylon*

b.- *Sin cobertor de nylon*

Antes de pasar al suelo, las raíces de las vitroplantas fueron lavadas con agua corriente para eliminar restos de medio de cultivo, ya que estos pueden favorecer la ocurrencia de infecciones con microorganismos, con la consiguiente mortalidad de las plantas.

La adaptación se realizó en en bolsas de polietileno de 100 cm<sup>3</sup> de capacidad. Se realizaron riegos con microaspersores cada dos horas durante 10 minutos en el período diurno.

Se probaron diferentes variantes de sustratos, constituidos por mezclas de suelo y materia orgánica en diferentes proporciones como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4. Diferentes sustratos empleados en la adaptación.

Substrato	Proporción de la mezcla	
Suelo	100 %	
Suelo + Turba	4:1	
Suelo + Humus de Lombriz	3:1	4:1
Suelo + Cachaza descompuesta	3:1	

El cobertor de nylon se retiró gradualmente a partir de la cuarta semana de adaptación durante una semana.

La adaptación se evaluó a las cinco semanas teniendo en cuenta el porcentaje de supervivencia sobre cada substrato. Después de cuatro semanas de retirado el nylon las plantas fueron trasladadas al vivero donde se efectuó un riego diario.

## 2.7 Comportamiento de las vitroplantas en vivero.

Para el estudio del efecto de los diferentes substratos utilizados (Tabla 4) se evaluaron los parámetros:

- Altura de la planta
- Longitud de la raíz
- Número de hojas

Las mediciones se realizaron a las 16 y 26 semanas de estancia de las plantas en vivero.

Análisis biométrico: El experimento siguió un diseño completamente al azar con análisis de varianza simple, a través del paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows, versión 8 S de 1998 (SSPS) , para  $\alpha = 5\%$  y  $N=20$ .

## 2.8 Evaluación de las vitroplantas en plantación

Para la realización de estos estudios se estableció una plantación de *P salutare* con plántulas obtenidas por cultivo *in vitro*, en la propia área experimental de campo del Laboratorio de Biotecnología de las Plantas de la Universidad de Pinar del Río.

Los datos de la plantación son los siguientes:

Ubicación – Km. 6 Carretera a San Juan y Martínez, Pinar del Río

Fecha de plantación – Noviembre de 1994

Suelo – Ferralítico cuarcítico amarillo. (Hernández, 1979)

Marco de plantación – 1 m x 1 m.

Número de plantas – 152

Al momento de la plantación se midió la altura y el diámetro de copa de cada planta y cada individuo fue identificado con un número. Las mediciones se realizaron a partir del mes de mayo del año 1995, con una periodicidad anual. Las variables medidas fueron:

- |                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| - altura de la Planta (metros) | - diámetro del Tallo (metros)   |
| - diámetro de Copa (metros)    | - producción de Frutos (gramos) |

La primera floración ocurrió en Mayo de 1995, en esta ocasión no se tuvo en cuenta la producción de frutos, debido al poco tiempo de establecida la plantación. Por esta razón la producción de frutos se comenzó a contabilizar a partir del año 1996, o sea al año y medio de edad.

La evaluación se realizó sobre una muestra de 113 plantas ya que no se consideraron los individuos que estaban en los bordes de la plantación.

### **2.8.1 Estudio de la correlación entre las variables estudiadas**

Se determinaron las correlaciones entre todas las variables en estudio a través de la determinación del coeficiente de correlación de Pearson. Este estadígrafo permite estudiar la fuerza de la asociación lineal entre dos variables.

### **2.8.2 Estimación de la producción de frutos a partir de las variables del crecimiento.**

Se probó la utilización de un modelo de regresión lineal múltiple con las variables independientes altura de la planta, diámetro de copa y diámetro del tallo. Se tuvo en cuenta la existencia o no de multicolinealidad entre las variables independientes.

Para la obtención del modelo de regresión se utilizó el método “stepwise” del procedimiento de regresión del paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows versión 8, 1998 (SPSS). Este método comienza el proceso incluyendo como primera variable independiente aquella cuyo coeficiente de correlación en valor absoluto con la variable dependiente sea mayor, siempre y cuando el coeficiente de regresión correspondiente a dicha variable tenga un nivel de significación menor que el indicado, que por defecto es 0,05. En el segundo paso, se introduce en la ecuación la variable con mayor correlación parcial con la variable dependiente. Si en alguno de los pasos el coeficiente de regresión de alguna de las variables ya introducidas en la ecuación tiene un nivel de significación mayor que 0,1, que suele ser el nivel de exclusión, la variable se elimina.

### **2.8.3 Análisis del crecimiento en plantación de las vitroplantas de *P. salutare***

El método funcional fue empleado para estudiar el crecimiento de la altura, el diámetro de copa, diámetro del tallo y la producción de frutos. La dinámica del crecimiento de cada una de las variables se ajustó a ocho funciones matemáticas (Tabla 5) por medio del análisis de regresión.

Se tomó como variable independiente la edad de las plantas y como independientes las demás variables.

Tabla 5. Funciones matemáticas probadas en el ajuste de la dinámica del crecimiento.

Función		Ecuación
Lineal	LIN	$Y = b_0 + (b_1 * t)$
Logarítmico	LOG	$Y = b_0 + (b_1 * \ln(t))$
Cuadrático	CUA	$Y = b_0 + (b_1 * t) + (b_2 * t^{**2})$
Cúbico	CUB	$Y = b_0 + (b_1 * t) + (b_2 * t^{**2}) + (b_3 * t^{**3})$
Compound	COM	$Y = b_0 * (b_1^{**t})$
Potencia de tiempo	POW	$Y = b_0 * (t^{**b_1})$
Exponencial polinómica	GRO	$Y = e^{**}(b_0 + (b_1 * t))$
Exponencial	EXP	$Y = b_0 * (e^{**}(b_1 * t))$

La elección de la función que mejor representó la asociación entre la edad y el crecimiento se realizó en base al valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Se tuvo en cuenta también que, el modelo de regresión tiene valor científico si es significativa la F, correspondiente al modelo global ( $F < 0,05$ ), y son significativos los coeficientes de regresión ( $T < 0,05$ ).

Para la selección del modelo se tuvo en cuenta también el análisis de los residuales.

Tanto para el estudio de la correlación como para el análisis de regresión se utilizó el paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows, versión 8 S de 1998 (SSPS).

### Índices del crecimiento

Se calcularon para cada variable:

- Incremento del material vegetal por unidad de tiempo (Tasa Absoluta de crecimiento. TAC)

$$TAC = \frac{dp}{dt}$$



- Incremento del material vegetal por unidad de material vegetal presente, por unidad de tiempo (Tasa Relativa de Crecimiento TRC)

$$TRC = \frac{1}{P} \frac{dp}{dt}$$

#### **2.8.4 Determinación de la variabilidad de las vitroplantas en plantación a partir de los parámetros morfológicos.**

Para comprobar el comportamiento de la variabilidad desde el punto de vista morfológico de las vitroplantas en plantación se llevo a cabo un análisis de discriminantes. Para el estudio se utilizó el paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows, versión 8 S de 1998 (SSPS).

Este análisis permite determinar la pertenencia de cada planta a un grupo en función de las variables disponibles, en este caso, la altura, el diámetro de copa, el diámetro del tallo y la producción de frutos de cada planta. Para la clasificación se consideraron como grupos los años de evaluación o sea la edad de las plantas.

Las funciones discriminantes se obtuvieron a partir de la combinación lineal de las variables señaladas anteriormente, a través de éstas funciones se pudo explicar la pertenencia de cada caso a un grupo u otro, por otra parte el poder discriminante de cada variable se obtuvo a partir del valor los coeficientes estandarizados.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 La obtención del explante

La fuente de explantes para el cultivo *in vitro* del ***Psidium salutare*** (HBK) Berg estuvo determinado por las posibilidades de poder acceder a una fuente estable de donantes, inicialmente sólo se contaba con individuos de la especie en las poblaciones naturales, la utilización de explantes colectados directamente de estas plantas fue muy poco satisfactorio debido a la pérdida de la mayor parte de este material vegetal por fenolización y por contaminación.

Por esto fue necesario probar otras fuentes de explantes que favorecieran el establecimiento del cultivo aséptico, así se llegó a la obtención de rebrotes a partir de ramas leñosas colocadas en agua (Figura 5) que permitió contar con material vegetal rejuvenecido muy favorable para el cultivo de tejidos además de que se pudo establecer un buen control fitosanitario sobre los mismos, aspecto que como señala Leifert y col. (1997) determinan la eficacia del proceso de desinfección así como del cultivo *in vitro*. Resultado similar reporta Haraguchi (1998) para la obtención de explantes de ***Zelkova serrata*** a partir de árboles de entre 500 y 800 años de edad



Figura 5 – Rebrotos de *P. Salutare* utilizados como fuente de explantes.

La utilización de plántulas asépticas como fuente de explantes aunque resulta muy útil, pues se eliminan los efectos indeseables de la contaminación, estuvo muy limitado ya que menos del 10 por ciento de las semillas germinaron *in vitro* tardando hasta siete meses en germinar además, al no contar con semillas genéticamente confiables, se desconoce el potencial del material a propagar.

### **3.2- Establecimiento del cultivo aséptico**

#### **3.2.1- Desinfección – Control de la fenolización**

La contaminación y fenolización de los explantes son procesos difíciles de evitar, el primero de estos está condicionado por la presencia de “contaminantes” superficiales y endógenos, hongos y o bacterias latentes en los espacios inter - celulares, los cuales aparecen bajo las condiciones ecológicas favorables del cultivo *in vitro*. Leifert y col. (1994) señala que aunque en su mayoría son organismos saprófitos de la flora microbiana, limitan la utilización del explante. En el caso de la fenolización además de estar determinada por las características de la especie y del propio explante, está muy influenciado por los productos habitualmente utilizados para la desinfección del material vegetal.

El objetivo de esta etapa es lograr establecer cultivos asépticos, fisiológicamente sanos y vigorosos para iniciar el proceso de multiplicación. Muchos procedimientos para el establecimiento han sido descritos, pero en el caso de especies leñosas se hace más complejo pues deben combinar tanto la desinfección superficial como el control de la fenolización del explante.

La evaluación de los experimentos para el establecimiento *in vitro* de explantes de guayabita del pinar se realizó a los siete días después de inoculados los explantes en el medio de cultivo de establecimiento.

Los resultados obtenidos revelaron que el origen del explante así como, el procedimiento de desinfección y control de la fenolización determinaron el porcentaje de explantes contaminados, fenolizados y establecidos como puede ser observado en la Tabla 6.

Se comprobó que la posibilidad de establecer material de campo es muy baja ya que al estar expuestos los donantes a las condiciones ambientales tienen una mayor presencia de contaminantes difíciles de eliminar durante los procesos de desinfección. Además no fue posible aplicar tratamientos fitosanitarios previos ya que no se contó con plantas cultivadas bajo condiciones controladas como comúnmente se reporta en otros trabajos de este tipo.

Tabla 6 - Porcentaje de explantes de *P. salutare* contaminados (C), fenolizados (F) y establecidos (E) .

Fuente de explantes	Procedimiento 1 (%)			Procedimiento 2 (%)			Procedimiento 3 (%)		
	C	F	E	C	F	E	C	F	E
Rebrotos	10	85	5	6.7	61	33	10	24	66
Brotos de campo	39	61	0	45	55	0	53	13,5	35

En cuanto a la efectividad de los procedimientos el análisis de estos resultados demostró que la desinfección con hipoclorito de sodio al 2% de cloro activo durante 15 y 20 minutos proporcionó una menor tasa de contaminación pero provocó un aumento considerable del número de explantes que se pierden por fenolización y necrosis, lo que demuestra el efecto dañino que tienen estos desinfectantes sobre los tejidos vegetales. Un análisis similar se puede realizar en cuanto al uso del bicloruro de mercurio, al comparar los procedimientos 2 y 3 donde se utiliza este desinfectante al 0,1% durante 5 minutos y al 0,05% durante 4 minutos respectivamente.

Al respecto Mantovani, (1997) reporta que la desinfección de segmentos nodales de *Didymopanax morototoni* en hipoclorito de sodio durante 15 y 20 minutos proporciona menores tasas de contaminación, pero provoca la necrosis de los tejidos provocando la muerte de los explantes. Camargo y Pascual (1995) reportan que al utilizar hipoclorito de sodio durante 20 minutos

para la desinfección de explantes de *Bertholletia excelsa* provocó la inhibición del crecimiento y la muerte de los explantes.

En el procedimiento número 3 el porcentaje de explantes de campo contaminados es ligeramente superior con respecto a lo obtenido en los dos procedimientos anteriores pero disminuye significativamente el de explantes fenolizados. En cuanto a los explantes provenientes de rebrotes el nivel de contaminación se mantiene bastante similar al de los procedimientos 1 y 2 y se reduce el porcentaje de explantes fenolizados.

El tratamiento previo en solución de Benomyl en el procedimiento 2 contribuye también a la disminución de la contaminación, pero de acuerdo a los resultados obtenidos se comprobó una mayor efectividad de los fungicidas al utilizarse para el control sanitario de los donantes en el procedimiento 3.

Los tratamientos fitosanitarios aplicados a los rebrotes influyó significativamente en el menor porcentaje de contaminación de estos explantes aun al utilizar el procedimiento número 3 donde se aplica la menor concentración de los desinfectantes así como el menor tiempo de exposición, esto se puede explicar ya que se pudo partir de un donante más sano.

Al respecto Haldeman y col. (1987) señalan que la utilización de fungicidas de contacto como el oxiclورو de cobre y los sistémicos como el Benomyl son muy utilizados por presentar un amplio espectro de acción sobre los hongos de naturaleza exógena y endógena, los cuales no quedan expuestos a la acción de los agentes utilizados durante la desinfección superficial de los explantes.

La oxidación fenólica, aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes y de la acción de los desinfectantes sobre el tejido dañado, constituye un serio problema para la supervivencia de meristemos y ápices sobre todo de especies leñosas. Estos compuestos oxidados son altamente reactivos y fitotóxicos (Hu y Wang, 1983), lo cual resulta letal para los explantes.

La guayabita del pinar se caracteriza por un intenso proceso de oxidación en las zonas de corte, por esta razón es necesario coleccionar los explantes e inmediatamente sumergirlos en una solución de cisteína, antioxidante con el cual se logró aminorar la fenolización durante esta fase en comparación a cuando se emplea una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico.

Se comprobó que la inmersión de los explantes en solución de PVP (2 g/L) + sacarosa (2%) durante una hora en el procedimiento 3 después del seccionado de los brotes contribuyó a retener la oxidación fenólica; este tratamiento también es aplicado por Amin y Jaiswal (1987) en el establecimiento de explantes de *Psidium guajava* pero con una concentración de PVP de 5 g/L durante 30 minutos.

Puchooa y col. (1998) al analizar la efectividad del PVP como antioxidante para el establecimiento de yemas axilares de *Rochetia boutoniana* obtienen los mejores resultados al aplicarlo en soluciones a una concentración de 2 g/L, afirmando que altas concentraciones de este compuesto no fueron efectivas.

Durand – Creswell y col. (1985) comprueban que el uso del PVP en soluciones retiene los fenoles y otros compuestos exudados por el explante, que constituyen factores inhibidores de procesos morfogénicos como el enraizamiento. Muchos autores refieren usar estos antioxidantes pues inhiben la actividad de la polifenoloxidasas la cual se encarga de oxidar los fenoles y transformarlos a quinonas (Salisbury, 1994).

En los procedimientos 1 y 2 en los cuales se hizo menor énfasis en el control de la oxidación fenólica en el caso de los explantes cuyo origen son los rebrotes más del 50 por ciento estaban fenolizados al momento de la evaluación, en el caso de los obtenidos de brotes de campo la fenolización es mayor ya que la mayoría de los explantes contaminados estaban además fenolizados.

Teniendo en cuenta los 2 objetivos principales de esta etapa, el procedimiento 3 resultó ser el más efectivo pues en él se logran los valores más bajos de contaminación y oxidación fenólica.

En cuanto al origen del explante se puede observar que los provenientes de rebrotes muestran siempre un mayor porcentaje de establecimiento en comparación con el material proveniente de plantas adultas en el campo; lo cual está relacionado con el estado de desarrollo del donante y la edad fisiológica del explante los cuales son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro* (George y Sherrington, 1984). Una ventaja de la utilización de rebrotes es que se evade el efecto de la época de recolección de los explantes

### 3.3 Medio de cultivo

En el caso de los medios de cultivo utilizados durante esta primera etapa para el establecimiento y la inducción de la brotación, se comprobó que la variante donde no se aplicó ningún antioxidante la fenolización afectó al 100 por ciento de los explantes. Los mejores resultados se obtuvieron en los medios donde se adicionó Cisteína, se comprobó que el efecto antioxidante de este compuesto fue independiente a la concentración utilizada decidiéndose utilizar la concentración menor de las probadas, o sea 25 mg/L.

En este sentido de la Torre, (1994) reporta un resultado similar en el establecimiento de explantes de ***Swietenia mahagoni***. Santana y col. (1988) reportan también una concentración de 25 mg/L de Cisteína para el establecimiento de explantes foliares de ***Coffea arabica***.

El efecto del PVP en los medio de cultivo no tuvo una acción significativa en el control de la fenolización. Resultados similares reportan Puchooa y col.(1998) en el establecimiento de explantes de ***Rochetia boutoniana***. Guevara y col. (1992) obtienen los resultados más bajos de establecimiento de explantes de ***Cedrela tonduzii*** al usar 7 g/L de PVP en el medio de cultivo.

### 3.3.1 Inducción de la brotación

En el caso de los segmentos nodales de plantas asépticas no fue necesario una etapa previa de inducción, por lo que fueron pasados directamente a la fase de multiplicación, esta respuesta se asoció a las características juveniles de este tipo de explante, entre ellas un nivel hormonal endógeno bajo y por tanto una mayor capacidad de reacción a la inducción morfogénica exógena.

Lo contrario ocurrió con los explantes de campo establecidos, estos no respondieron a la inducción de la brotación y pasadas cuatro semanas se secaron por lo que fueron desechados.

En el caso de los segmentos nodales provenientes de rebrotes fue posible la inducción en un 20 por ciento de los explantes inoculados inicialmente, lo cual representó el 60 por ciento del total de los explantes establecidos (Tabla 7). La brotación solo ocurrió en presencia de BAP obteniéndose entre 1 y 2 brotes por explante que alcanzaron su mayor desarrollo a las seis semanas de iniciado el cultivo.

Los resultados obtenidos demostraron la necesidad de una fuente exógena de citoquininas para la inducción de la brotación. Krikorian, (1995) señala que la etapa de inducción incluye la designación de un medio para estimular el inicio del desarrollo de las yemas, en esta fase del cultivo las auxinas y las citoquininas pueden ser suprimidas, solo si el sistema es capaz de sintetizarlas, de lo contrario será necesario su adición al medio de cultivo.

Como se observa en la propia Tabla 7, se pudo inducir la brotación solamente en un rango de BAP entre 0.1 y 0.3 mg/L (Figura 6), a diferencia de otras especies como *Dydimopanax morottotonii*, donde se logra la estimulación de la brotación con concentraciones de BAP que van desde 0,01 hasta 10 mg/L (Mantovani, 1997). En el caso de *P. salutare* concentraciones de esta citoquinina superiores a 0,3 mg/L indujeron la formación de callo en la zona de abscisión de la hoja lo que impidió el desarrollo del brote.



Tabla 7 - Porcentaje de explantes de *Psidium salutare* (HBK) Berg que emitieron brotes.

Concentración de BAP (mg/L)	Segmentos Nodales con Brotes (%)
0	0
0,1	12
0,2	80
0,3	7
0,6	formación de callo
1,0	formación de callo



Figura 6 – Brotes inducidos in vitro en medio con BAP 0,1 mg/L (detalle), a las dos semanas de cultivo.

La mejor respuesta de los explantes de rebrote en relación a los de campo debió estar asociada al rejuvenecimiento del material. Al respecto Jiménez (1998) señala que a medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*. Hammat, (1992) plantea que la dificultad durante esta fase se centra en romper el estado de quiescencia de las yemas axilares, lo cual en muchos casos no es posible, pues depende de la época o estación del año en que es tomado el explante y del estado fisiológico y por consiguiente del balance hormonal endógeno. Otro factor determinante es el envejecimiento fisiológico (Franclet y col., 1987), que

dificulta seriamente la manipulación del material adulto *in vitro* debido a alteraciones y modificaciones dependientes de la edad de la planta.

### 3.4- Multiplicación

La multiplicación se llevó a cabo con segmentos nodales obtenidos de plántulas asépticas y de brotes obtenidos durante la etapa anterior de inducción de la brotación. Para el diseño del experimento se tuvo en cuenta que para concentraciones de BAP inferiores a 1 mg/L la tasa de multiplicación se comporta muy baja pues fue inferior a tres brotes por explante; por otra parte una concentración de BAP superior a 2 mg/L provoca la formación de callo sobre todo el explante.

La formación de nuevos brotes se indujo en todas las variantes hormonales probadas, existiendo diferencias en cuanto al inicio de la brotación en función del origen del explante. Los tomados de plantas asépticas inician la brotación a los siete días y los tomados de rebrotes, durante el primer subcultivo, a las dos semanas aproximadamente, posteriormente se comportaron igual que los primeros, esta respuesta debió estar asociada tanto a la propia edad fisiológica como al nivel hormonal endógeno de los explantes.

El análisis de varianza multifactorial reveló significación estadística para los efectos de las concentraciones de BAP y AIA analizados, así como a la interacción de estos dos factores sobre el número y la longitud de los brotes formados.

En la Figura 7 se puede observar que en las variantes donde solo se adicionó BAP al medio de cultivo (variantes A, B, y C), el número de brotes inducidos fue significativamente inferior a los tratamientos donde se combinaron el BAP y el AIA.

En el caso del *P. salutare* de forma general se obtienen los mejores resultados en cuanto a este parámetro y con este tipo de explante en las variantes H e I

con un balance BAP – AIA de 1,5 mg/L – 0,3 mg/L y 1,5 mg/L – 0,5 mg/L respectivamente.

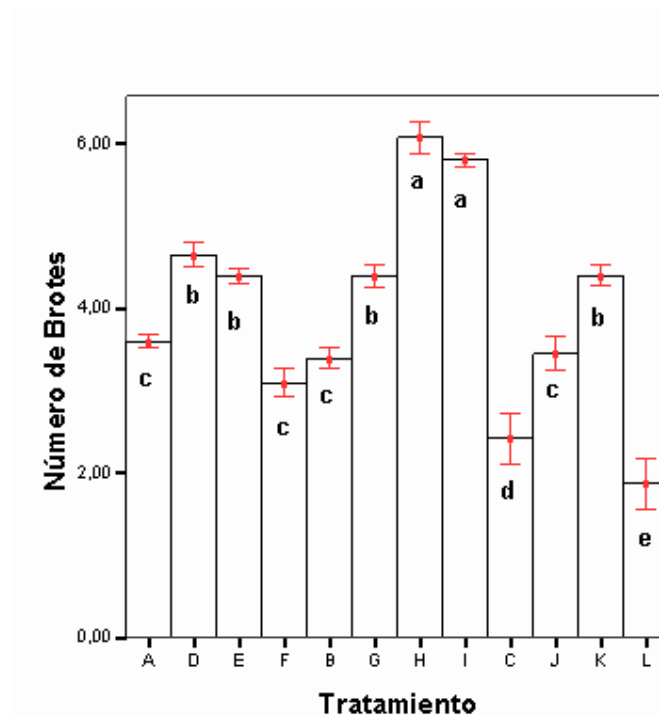


Figura 7 - Número promedio de brotes por explante provenientes de plántulas asépticas en cada variante hormonal.

Barras verticales representan el error estandar

Letras iguales no difieren entre si a un nivel del 5% de significación para la prueba de Duncan.

Muchos autores señalan que la combinación de ambos tipos de hormonas (citoquininas y auxinas) son necesarias para inducir un mayor número de brotes. Ajisthkumar y Seení (1998) reportan que la propagación clonal *in vitro* de ***Aegle marmelos*** sólo fue posible cuando se combinó BAP y AIA, induciendo la brotación con un balance de 2,5 mg/L + 1,0 mg/L respectivamente con 12,1 brotes por explante.

Se comprobó también que el balance y la concentración hormonal ejercen un efecto significativo sobre el crecimiento de los brotes, como se puede observar en la Figura 8 las variantes donde los brotes alcanzan una menor longitud son

las que tienen BAP 2 mg/L , seguidos por los medios donde no se adicionó AIA, por lo que se puede plantear que la presencia de esta auxina tuvo un efecto estimulante sobre el desarrollo de los brotes.

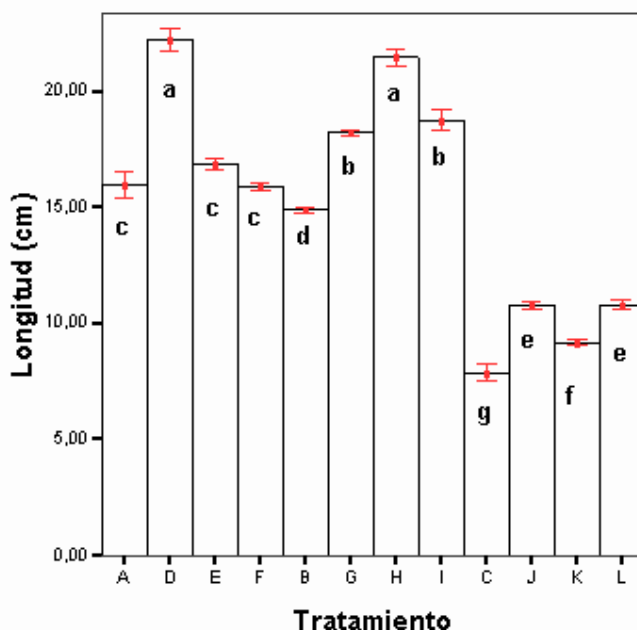


Figura 8 – Longitud promedio de los brotes provenientes de explantes de plántulas asépticas en cada variante hormonal.

Barras verticales representan el error estandar

Letras iguales no difieren entre si a un nivel del 5% de significación para la prueba de Duncan

Según Debergh y Read (1991) el alargamiento de los brotes y la reducción de los efectos residuales de las citoquininas, pueden ser rebasados con la utilización de reguladores del crecimiento del grupo de las giberelinas y las auxinas así como, con la adición al medio de cultivo de carbón activado. El uso combinado de BAP y ANA proporciona las mejores tasas de multiplicación y también un mayor crecimiento de los brotes de algunas especies del género *Eucalyptus* (Pinedo y col., 1990).

Inicialmente, como en la variante H se obtuvo el mayor número de brotes por explante así como que es una de las dos variantes donde se alcanzó una

mayor longitud de los mismos, se eligió este medio para ser utilizado en la micropropagación a partir de segmentos nodales de plantas asépticas.

Los subcultivos sobre este medio fueron satisfactorios o sea mantuvieron una tasa de multiplicación de 5,5 a 6,5 brotes por explante y una longitud de 20 a 25 mm hasta el cuarto subcultivo. A partir de este momento aparece una multiplicación muy intensa de hasta 50 brotes por explante con la formación de brotes anormales con hojas muy pequeñas y con muy poco desarrollo en longitud, que surgieron de una estructura en forma de callo en la base de los explantes. Pinto y Avello (1994) reportan también la formación de brotes anormales y de menor tamaño sobre segmentos nodales de *Kielmeyera coriacea* con concentraciones de BAP por encima de 8 mg/L.

Mantovani (1997) trabajando en la multiplicación de *Didimopanax morototoni* comprueba que una concentración de BAP de 10 mg/L provoca la formación de brotaciones atípicas, con entrenudos cortos, hojas curvadas, quebradizas y de tamaño reducido. Según Ziv, (1991) estos síntomas son provocados por desordenes fisiológicos, denominados como vitrificación, que ocurren frecuentemente en el cultivo de muchas especies *in vitro* y son atribuidas principalmente a un exceso de citoquininas en los medios de cultivo.

En este tipo de brotes debido a su origen es posible la aparición de variantes somaclonales por lo que de este material no se continuaron realizando los subcultivos. Al respecto Peschke y Phillips (1992) señalan que: aunque durante la fase de multiplicación se trata de mantener o incrementar el nivel de producción de brotes por el incremento de los niveles de citoquininas, es preferible optar por una menor tasa de multiplicación usando bajos niveles de este tipo de hormonas ya que un incremento puede provocar cambios genéticos.

Teniendo en cuenta lo anterior se eligió la variante D como la más factible para la multiplicación aunque se obtuviera un menor número de brotes (4,6) por explantes. Sobre este medio de cultivo se alcanzaron los mejores resultados en

cuanto a la estabilidad de la multiplicación, crecimiento y calidad de los brotes de *P. salutare* durante 12 subcultivos.

En relación a la respuesta obtenida del material proveniente de rebrotes, en la Figura 9 se puede observar que en las variantes donde solo se adicionó BAP se obtuvieron los valores más bajos de multiplicación, respuesta similar a la obtenida de los explantes provenientes de plántulas asépticas.

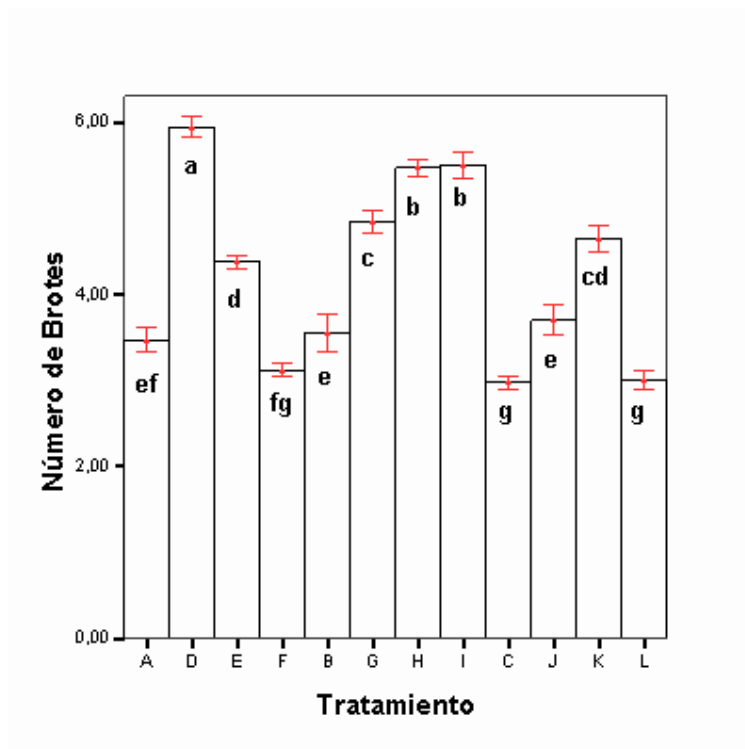


Figura 9 - Número promedio de brotes por explante provenientes de rebrotes en cada variante hormonal.

Barras verticales representan el error estandar

Letras iguales no difieren entre si a un nivel del 5% de significación para la prueba de Duncan.

Por lo contrario la mayor tasa de multiplicación desde el principio se obtuvo en el tratamiento D (BAP 1 mg/L y AIA 0,1 mg/L); en las variantes con 2 mg/L de BAP ocurrió la formación de callo basal, presentándose la menor brotación por explante.

En cuanto al parámetro desarrollo de los brotes (Figura 10), para este tipo de explante se alcanzan los mejores resultados también en la variante D (Figura 11), al igual que en el caso de la multiplicación, los valores más bajos se obtuvieron en los tratamientos con 2 mg/L de BAP (C,J,K y L) respuesta que se atribuyó al nivel hormonal endógeno que por su origen presentan estos explantes.

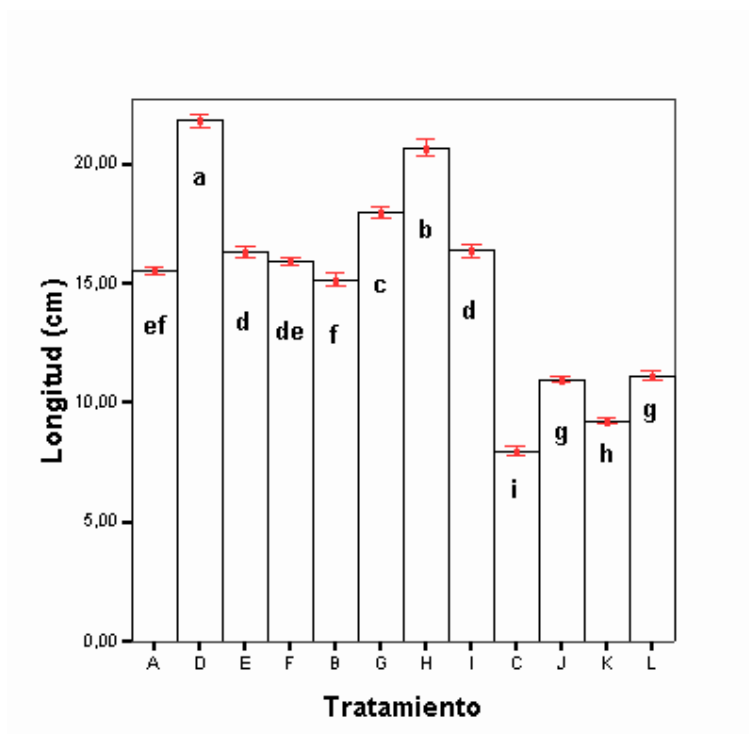


Figura 10 - Longitud promedio de brotes provenientes de rebrotes en cada variante hormonal.

Barras verticales representan el error estandar

Letras iguales no difieren entre si a un nivel del 5% de significación para la prueba de Duncan.

El tiempo óptimo entre subcultivos se mantuvo similar, seis semanas, al igual que cuando se emplearon explantes provenientes de plantas asépticas, pero a partir del sexto subcultivo la tasa de multiplicación desciende bruscamente a menos de tres brotes por explante y estos no alcanzan más de 1 cm caracterizándose además por presentar una coloración amarillenta.



Figura 11 – Aspecto de la brotación sobre la variante D (BAP 1mg/L y AIA 0,1 mg/L) a las 4 semanas de cultivo.

Muchos autores plantean que algunos tipos de explantes muestran un alto potencial regenerativo al inicio de los cultivos declinando a través de los subcultivos. Esto puede estar provocado según Narayanaswamy, (1977) debido a la toxicidad causada por un exceso de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo o por la exposición durante un prolongado período de tiempo de los cultivos a estos reguladores, ocasionando alteraciones genéticas, fisiológicas y morfológicas que resultan en una reducción de la tasa de multiplicación.

Orellana, (1998) plantea que el principal problema de multiplicar los explantes durante muchos ciclos de propagación, está relacionado con el aumento de la frecuencia de aparición de variantes somaclonales, mayor a medida que se hacen más subcultivos.

Las variaciones más comunes son poliploidía, aneuploidía y aberraciones cromosómicas. En la actualidad los programas de propagación masiva de especies por multiplicación, solo de yemas axilares, se aplica el principio de no prolongar mucho los cultivos *in vitro*, aun siendo estos métodos de regeneración los que deben tener la mayor estabilidad genética. En el cultivo de ***Solanum tuberosum*** se ha encontrado que largos períodos de propagación provocan variabilidad y se recomienda cambiar todos los años los meristemas.



En el género *Musa*, una de las medidas para mantener la estabilidad genética es no producir más de 5 000 vitroplantas por explante (Pérez Ponce, 1998).

### 3.5- Enraizamiento

La evaluación del enraizamiento de los brotes obtenidos de la multiplicación arrojó como resultado que, en todos los tratamientos se indujo la emisión de raíces, variando el porcentaje en cada caso según puede observarse en la Tabla 8.

De acuerdo a los resultados obtenidos se demostró la necesidad de una fuente exógena de auxinas para el enraizamiento de los brotes, de forma general las más usadas en esta fase son el ANA, AIB, AIA y 2-4D, en el 53%, 29%, 11% y 3,6% de los medios de cultivo respectivamente (Orellana, 1998).

Los mejores resultados correspondieron a los tratamientos donde se empleó AIB 0,2 mg/L + ANA 0,2 mg/L (90%) , ANA 0,2 mg/L (86,3%) y 2,4 D 0,1 (85,16%) y los valores más bajos de inducción se produjeron en los tratamientos que contenían AIA y AIB.

Tabla 8 - Porcentaje de brotes enraizados en las diferentes variantes  
Letras iguales no difieren entre si a un nivel del 5% de significación para la prueba de Duncan.

	mg/L	Media Valores Transformados	Error estandar	%Enraizamiento Valores Retransformados
<b>AIA</b>	0.1	5,96 e	,007	35,53
	0.2	7,21 c	,007	51,99
	0.3	8,08 b	,161	65,28
	0.4	7,83 bc	,118	61,30
	0.5	7,82 bc	,046	61,16
	0.6	5,91 e	,098	34,98
Concentración superior, formación de callo basal				
<b>AIB</b>	0.1	6,89 cd	,021	47,49
	0.2	7,30 c	,099	53,31
	0.3	7,85 bc	,042	61,66
	0.4	7,12 c	,084	50,65
Concentración superior, formación de callo basal				
<b>ANA</b>	0.1	8,46 b	,073	71,55
	0.2	9,29 a	,078	86,28
	0.3	7,48 c	,102	55,97
	0.4	7,59 c	,058	57,65
Concentración superior, formación de callo basal				
<b>2-4 D</b>	0.1	9,23 ab	,024	85,16
	0.2	8,14 b	,041	66,32
	0.3	6,63 d	,116	43,97
Concentración superior, formación de callo basal				
<b>AIB+ANA</b>	0.1+0.1	8,60 b	,058	73,99
	0.2+0.2	9,50 a	,018	90,33

El AIB en concentraciones de 0,1 a 10 mg/L o la combinación de diferentes auxinas o someter a los tejidos a altas concentraciones (120 mg/L) durante 10 o 12 horas ha dado buenos resultados. Algunas veces las bajas concentraciones de citoquininas (0,01 – 0,1 mg/L) benefician la formación de raíces. Altas concentraciones de auxinas inducen una excesiva formación de callos y la senescencia de los brotes (Boulay, 1985). Rancillac, (1979) trabajando con *Pinus pinaster* encontró que altas concentraciones de ANA inducen la formación de muchas raíces en la base de los brotes, pero induce también la formación de callo, lo cual impide el establecimiento de la conexión vascular entre la raíz y el brote.

En cuanto a la concentración de auxina Villalobos (1990) recomienda AIA y AIB en rangos desde 0,1 – 10 mg/L, siendo 0,25 – 3 mg/L los valores medios. Lakshmi y col. (1986) reportan que en *Eucalyptus grandis* se probaron concentraciones de ANA y AIB en un rango de 0,5 a 2,0 mg/L obteniendo que las bajas concentraciones de ANA produjeron pocos o ningún callo basal y promovieron el enraizamiento. En esta misma especie Major y col.(1995) utilizaron 1g/L de AIB para inducir el enraizamiento, en cambio, Agramonte y col. (1998) reportan el enraizamiento al utilizar 0,5 mg/L de AIA.

En cuanto al efecto de estas hormonas sobre la rizogénesis de brotes de *P. salutare* se comprobó que existen diferencias en cuanto al efecto de éstas sobre el porcentaje de brotes enraizados, y para cada una hubo un rango de concentración donde se logró inducir el enraizamiento por encima del cual apareció la formación de callo basal y raíces deformadas (Tabla 8). El mejor resultado al combinar ANA y AIB (Figura 12) debió estar relacionado al efecto sinérgico sobre la morfogénesis de raíces al actuar simultáneamente ambas auxinas. Resultados similares obtiene Noda, (1999) en el enraizamiento de brotes de *Eucaliptus pellita* con 0,2 mg/L de AIA y 0,2 mg/L de AIB.

Se comprobó que en los medios donde no se adicionó carbón activado apareció la formación de callo basal cualquiera fuera la concentración de auxina empleada. Krikorian (1995) señala que la adición de carbón activado al medio absorbe los excesos de hormonas y otros compuestos favoreciendo el

enraizamiento. Según Fridborg y col. 1978 este producto estimula la embriogénesis somática y el enraizamiento. Margara (1988) plantea que ejerce un efecto favorable sobre el crecimiento debido a la absorción de sustancias inhibitorias exudadas por el explante.

En relación al empleo de las sales minerales, Wang y Hu (1983), recomiendan disminuir la concentración de las sales de los medios de cultivo para inducir un abundante enraizamiento, el procedimiento más empleado es la reducción de las sales a la mitad, ya que una mayor reducción provocaría el agotamiento temprano de las mismas, lo que frenaría el desarrollo de las plantas.

Con el empleo de las sales minerales del WPM a la mitad de la concentración se logra un buen enraizamiento y desarrollo de los brotes de Guayabita del Pinar; en cuanto a la consistencia del medio de cultivo, líquidos con soportes de papel de filtro o sólidos, no tuvo influencia sobre la rizogénesis aunque en este caso es preferible el medio en estado líquido pues se ahorra agar que encarece los costos por concepto de medios de cultivo en un 90% (Pérez Ponce, 1998), además la raíz se daña menos al ser extraída del tubo y llevada a la bolsa para su aclimatación.

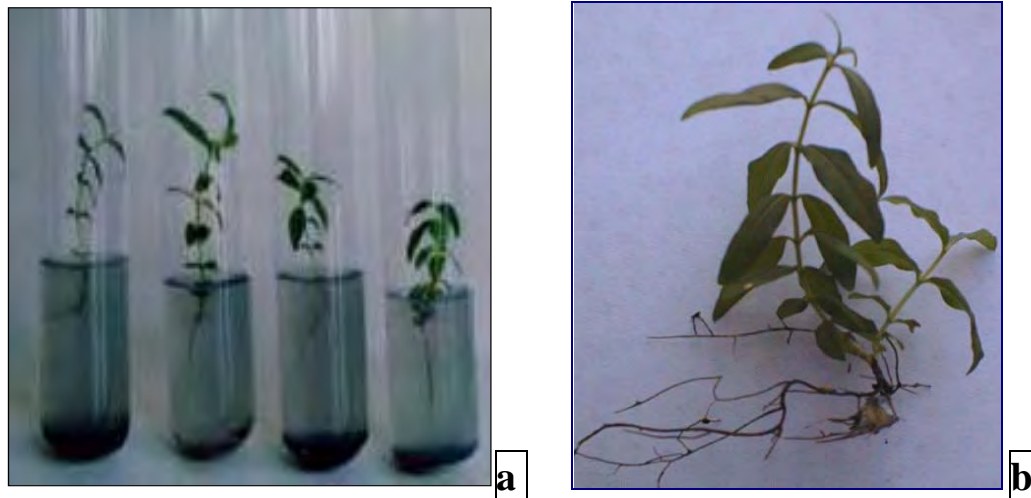


Figura 12 – a) Brotes en la fase de enraizamiento a las tres semanas en medio con ANA 0,2 mg/L y AIB 0,2 mg/L. b) planta enraizada después de 6 semanas de cultivo.

### 3.6- Aclimatación de las plántulas regeneradas *in vitro*

El éxito de la propagación *in vitro* radica en lograr la aclimatación de las vitroplantas a las condiciones ambientales. Durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico de las vitroplantas así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales, en la misma las plántulas sufren un estrés provocado por el cambio de las condiciones de humedad y temperatura, por lo que la transferencia debe realizarse de forma gradual.

El mayor porcentaje de sobrevivencia (75 por ciento) de vitroplantas de ***Psidium salutare*** (HBK) Berg se logró cuando estas fueron mantenidas durante las primeras cuatro semanas después de la transferencia a suelo en umbráculo, protegidas con un cobertor de polietileno transparente y efectuando riegos con microaspersores cada dos horas durante el período diurno. Esto permitió mantener una elevada humedad relativa así como una reducción de la iluminación.

Bajo umbráculo, pero sin la utilización del cobertor de polietileno transparente, la mortalidad fue superior al 90 por ciento.

No se observaron diferencias en la sobrevivencia entre vitroplantas provenientes de medio de enraizamiento líquido o sólido. Geada (1999) si encontraron diferencias en el porcentaje de plantas adaptadas en función de la edad de las vitroplantas.

La sobrevivencia de las vitroplantas regeneradas durante el período de adaptación depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto al desarrollo *in vitro*, lo cual permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa) y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Preece y Sutter, 1991; Teixeira, 1995).

Entre los principales problemas que presentan las vitroplantas se encuentran: ineficiencia fotosintética debido a los bajos contenidos de pigmentos del aparato fotosintético y el desarrollo de cloroplastos con granas desorganizadas (Inoue y col.,1990; Preece & Sutter, 1991); capacidad reducida de formar cutículas cerosas (Amar y col., 1995), estomas poco funcionales debido a la alteración en la forma de las células oclusivas (Ziv, 1991); ineficiencia de los tejidos de sustento debido a la reducida presencia de colénquima y esclerénquima (Preece & Sutter, 1991); absorción y transporte de agua ineficiente debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote.

Estas características de las vitroplantas, sobre todo en especies leñosas, hacen muy complejo el proceso de adaptación o aclimatación, por lo que el control estricto de las condiciones ambientales durante esta fase es determinante en el proceso de la micropropagación.

Se pudo comprobar que, el efecto de las características de los sustratos utilizados sobre el porcentaje de vitroplantas de ***P. salutare*** sobrevivientes durante estas cuatro primeras semanas de la adaptación no fue significativo. Se considera que estos resultados se debieron a que en general los sustratos utilizados en este experimento se caracterizaron por tener una buena estructura, permeabilidad y aireación o sea poseían características físicas, químicas y biológicas adecuadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos la aclimatación de vitroplantas de ***P. salutare*** se logró en un período de cinco semanas, el control de los factores ambientales es el aspecto de mayor importancia durante esta etapa, de estos, el que más influyó en el éxito de la aclimatación de vitroplantas de ***P. salutare*** fue la humedad relativa ya que el desarrollo de la plántula y dentro de éste, el proceso de alargamiento celular depende estrictamente de la turgencia de las células que no se garantiza si las pérdidas por transpiración (cuticular y estomática fundamentalmente) son mayores que la absorción de agua.

Un elemento climático que no debe soslayarse es la temperatura, ya que debido al uso del cobertor de polietileno, éstas pueden alcanzar valores extremos muy elevados. Las condiciones de iluminación no limitaron la adaptación, esto está dado por que, todavía en esta etapa la acumulación de masa seca no es intensa y predominan la división, alargamiento y diferenciación celular.

De hecho, solo se adaptarán a las nuevas condiciones las vitroplantas, si respiran lo menos posible y no agotan las reservas que poseen antes de que se autoabastezcan de fotoasimilatos o sea que logren un funcionamiento autotrófico.

La permanencia en el umbráculo durante cuatro semanas de las plantas, permitió una adaptación gradual a condiciones ambientales menos controladas. Durante esta etapa el riego se efectuó solo una vez al día, además hay mayor iluminación, mayor temperatura y la humedad relativa es significativamente menor. Esta etapa preparó la plantas desde el punto de vista fisiológico y morfológico para enfrentar el posterior desarrollo en vivero.

### **3.7 Comportamiento de las vitroplantas en vivero.**

#### Substrato

En este estudio se comprobó que las características de los substratos tuvieron un efecto significativo sobre el desarrollo de las vitroplantas en vivero. En general cuando solo se utilizó suelo, el desarrollo de las plantas fue inferior en comparación con los substratos constituidos por mezclas de suelo con materia orgánica. (Tabla 9)

Se considera que estos resultados se debieron a la mejor estructura, permeabilidad y aireación que le confiere al substrato la materia orgánica, características que permiten un adecuado desarrollo de las raíces, lo que implica una mejor absorción de nutrientes y por tanto una mayor calidad de la planta.

Los mejores resultados en el desarrollo alcanzado en altura, longitud de las raíz y número de hojas de las plantas se obtuvo en los substratos constituidos por mezclas de suelo y humus de lombríz, tanto a las 16 como a las 26 semanas de iniciada esta etapa de vivero.

La mayoría de los protocolos para la aclimatación de vitroplantas utilizan mezclas ya sean de materia orgánica o de ésta con zeolita u otros componentes. Pérez Ponce y col. (1999) reportan como mejores substratos en un estudio llevado a cabo para evaluar el comportamiento de vitroplantas de caña y bananos, los constituidos por humus de lombriz y zeolita. Con respecto al humus, es considerado el abono orgánico más completo e integral que se conoce, de fácil manejo y obtención. En dependencia de los componentes empleados para su producción, se han comprobado que existen diferencias en la sobrevivencia de las vitroplantas con valores elevados que oscilan entre el 80% y el 98,4%.

En la actualidad existe la tendencia a la utilización de substratos orgánicos para la adaptación de vitroplantas, en general se señalan como los de mejores resultados el humus de lombríz y el compost. Un componente muy utilizado también es la zeolita, de la que se señala, que es capaz de retener agua utilizable por la planta.

En el caso de la guayabita del pinar los resultados de la utilización de substratos orgánicos solamente no ha sido factible, las plantas que se han logrado adaptar en estos substratos presentaron signos evidentes de una mala nutrición después de las primeras semanas de la adaptación.

En otras especies leñosas ha sido posible la utilización de estos substratos, así Delgado y col., (1999) reportan la aclimatación de vitroplantas de ***Eucalyptus grandis*** en un substrato formado por una mezcla de casting y zeolita logrando un 80% de sobrevivencia.

En el caso de ***P. salutare*** Páez y col. (1999) han logrado estimular el desarrollo de las vitroplantas durante la fase de adaptación inoculando cepas puras o mezcladas de micorrizas lo que se ha expresado en un mayor crecimiento del tallo y de la raíz así como un mayor número de hojas destacándose las asociaciones de especies micorrizicas del género *Glomus*.

### Edad

La determinación del tiempo en vivero antes de ser llevadas las posturas a la plantación es un aspecto de gran interés en aras optimizar el cultivo de cualquier especie. La magnitud de este período estará en dependencia de que las plantas alcancen determinados parámetros morfológicos que garanticen la sobrevivencia y el desarrollo en plantación.

De acuerdo a los resultados obtenidos del desarrollo en vivero de las vitroplantas de ***P. salutare***, a las 16 semanas, en los tres primeros substratos (Tabla 9) las plantas están aptas para ser llevadas a la plantación. Aunque no se han determinado los parámetros de calidad de las posturas de esta especie, el crecimiento alcanzado en altura y longitud de la raíz a esta edad permiten asegurar la sobrevivencia en plantación.

A las 26 semanas el desarrollo alcanzado es superior, independientemente del substrato utilizado, pero se extiende innecesariamente la estadía en vivero. Por otra parte se corre el riesgo de que la raíz de la planta sobrepase la capacidad del envase utilizado, con el consiguiente deterioro de la calidad de la planta.

Estos resultados demuestran que con la utilización de un substrato adecuado se pueden obtener plantas con calidad en un menor tiempo, con el consiguiente ahorro que desde el punto de vista económico esto representa.

Resumiendo esta etapa, desde que la planta es transferida del recipiente de cultivo *in vitro* a suelo hasta que está lista para ser llevada a plantación transcurren 24 semanas, o sea 6 meses, tiempo inferior que el que se necesita



para producir una postura de ***P. salutare*** por los métodos convencionales, que es de más de 9 meses

Tabla 9 – Parámetros morfológicos a las 16 y 26 semanas de desarrollo en vivero.

Letras iguales no difieren entre si a un nivel del 5% de significación para la prueba de Duncan  
Números entre paréntesis (\*), error estandar de la media

Substrato	Evaluación a las 16 semanas			Evaluación a las 26 semanas		
	Altura (cm)	Longitud de la Raíz (cm)	Número de Hojas	Altura (cm)	Longitud de la Raíz (cm)	Número de Hojas
Suelo + Humus de Lombríz (3:1)	25,8 <sup>a</sup> (2.9)*	17,6 <sup>a</sup> (2.0)	20,1 <sup>a</sup> (4.6)	35,0 <sup>ab</sup> (1.6)	22,9 <sup>ab</sup> (1.9)	24,1 <sup>a</sup> (1.9)
Suelo + Humus de Lombríz (4:1)	25,6 <sup>a</sup> (2.0)	15,4 <sup>a</sup> (1.2)	14,6 <sup>b</sup> (3.8)	36,2 <sup>a</sup> (3.2)	27,2 <sup>a</sup> (3.2)	22,4 <sup>a</sup> (0.9)
Suelo + Turba (4:1)	22,5 <sup>a</sup> (3.1)	19,2 <sup>a</sup> (2.2)	15,2 <sup>b</sup> (5.8)	28,7 <sup>bc</sup> (2.3)	19,5 <sup>b</sup> (1.7)	22,4 <sup>a</sup> (1.9)
Suelo + Cachaza Descompuesta (3:1)	16,1 <sup>b</sup> (1.2)	9,8 <sup>b</sup> (0.5)	12,6 <sup>b</sup> (2.2)	28,6 <sup>bc</sup> (1.3)	21,6 <sup>ab</sup> (1.2)	22,1 <sup>a</sup> (0.6)
Suelo	13,6 <sup>b</sup> (1.1)	7,7 <sup>b</sup> (0.6)	7,6 <sup>c</sup> (0.8)	23,4 <sup>c</sup> (1.6)	16,8 <sup>b</sup> (0.7)	8,3 <sup>b</sup> (1.4)

### 3.8 Comportamiento de las vitroplantas en plantación

Los resultados que se obtuvieron en este estudio son los primeros que se reportan para ***P. salutare***, en este caso el análisis se centró en caracterizar el desarrollo en plantación de plantas propagadas *in vitro* sobre la base de las mediciones de las variables diámetro del tallo, diámetro de copa, altura de la planta y la producción de frutos durante 5 años, a una muestra de 113 individuos.

#### 3.8.1 Estudio de la correlación entre las variables

Al analizar la relación existente entre las diferentes variables del crecimiento estudiadas se pudo apreciar que estas presentaron correlaciones positivas altamente significativas (Tabla 10). En cuanto a la relación entre estas variables y la producción de frutos, aunque la correlación es también significativa, el valor

del coeficiente es inferior, lo cual indica que la asociación lineal entre estas variables y el rendimiento es inferior.

De acuerdo a estos resultados un análisis más preciso deberá tener en cuenta el estudio de la correlación del rendimiento con otros parámetros morfológicos de las plantas de ***P. Salutare***. Al respecto Montes y Miliam (1985) encuentran una correlación altamente significativa entre el número de ramas y el rendimiento en híbridos de ***Coffea arabica*** L.

Tabla 10 – Matriz de correlación entre las variables morfológicas y entre éstas y la producción de frutos.

\*\* Correlación es significativa a un nivel de 0.01 (2-colas)

	Coeficiente de Correlación		
	Altura	Diámetro de Copa	Diámetro del Tallo
Producción de los Frutos	,653**	,690**	,632**
Altura		,916**	,907**
Diámetro de Copa			,881**

### 3.8.2 Estimación de la producción de frutos a partir de las variables del crecimiento.

Como se comprobó anteriormente, existe una alta correlación entre cada una de las variables comprendidas en este estudio, de ahí que la producción de frutos podría ser estimada a través de la altura de la planta, el diámetro de la copa o el diámetro del tallo.

Como ninguna otra función matemática que no fuera la lineal fue capaz de describir correctamente la relación entre las diferentes variables independientes y la producción de frutos, se determinó realizar un análisis de regresión de este tipo.

Para la determinación del modelo de predicción de producción de frutos se realizó un análisis de regresión múltiple con las variables independientes altura,

diámetro de copa y diámetro del tallo. De acuerdo al método utilizado solo se incluyó en la ecuación la variable diámetro de copa. Esta fue la de mayor coeficiente de correlación con la variable dependiente, las otras dos variables no cumplieron con el criterio de inclusión ya que la significación de T fue mayor que 0,05. (Tabla 11)

Tabla 11 – Valores de TStudent correspondientes a cada coeficiente.

Coeficientes no estandarizados			
B	Error estandar	t	Sig.
74,585	73,239	1,018	,309
439,831	74,171	5,930	,000
1638,079	3049,728	,537	,591

Se comprobó la existencia de multicolinealidad, esto ocurre cuando las variables independientes implicadas en el modelo llevan información redundante y la información de una o más variables también la aportan otras (Alvarez, 1995). Por esto los coeficientes de regresión de las variables altura y diámetro del tallo no son significativos.

La ecuación definitiva del modelo es la siguiente:

$$\text{Producción de Frutos} = 439,8 * \text{Diámetro de Copa}$$

$$R^2 = 0,831$$

No se incluyó en el modelo la constante ( $b_0$ ) de la ecuación con el fin de elevar el valor del coeficiente de determinación. Esto no debe tener mayor trascendencia, solo indica que la recta pasa por el origen, en este caso si el diámetro de copa fuera 0 la producción de frutos por supuesto, es 0.

Cortes (1986) encontró que para el estimado de los rendimientos en el cafeto a altas densidades de plantación debe considerarse en primer lugar, la altura así como también el área foliar. Xonia Xiques y col. (1986) encontraron que el

rendimiento de ***Datura candida*** (Pers.) tiene una relación directa con la altura y el número de hojas.

### 3.8.3 Análisis del crecimiento en plantación de vitroplantas de ***P. salutare***

La descripción del crecimiento de las plantas o sus órganos reviste una gran importancia, primero para conocer las características de la dinámica del crecimiento de una especie y segundo para analizar la influencia de diferentes factores sobre el desarrollo de la propia especie o para correlacionarlo con el rendimiento.

Para estos análisis se ha prestado mucha atención al empleo de funciones matemáticas para ajustar la dinámica del crecimiento. La exactitud en el ajuste matemático es de gran importancia cuando se aplican estas técnicas aunque resulta igualmente importante tener en cuenta, si desde el punto de vista biológico la función escogida es la que describe correctamente el índice en cuestión.

El comportamiento durante cinco años del crecimiento de las variables altura, diámetro de copa, diámetro del tallo y producción de frutos de las vitroplantas desarrolladas en plantación se puede observar en la Figura 13.

Las curvas de las cuatro variables semejan en gran medida las sigmoides del crecimiento, estas se diferencian entre sí debido fundamentalmente a la extensión de las diferentes fases, por otra parte tienen en común que la magnitud de las variables tienden a permanecer constantes a partir del cuarto año de edad.

Esta tendencia a la estabilidad en el caso de la altura debió estar determinada por las características genéticas de la especie; ***P. salutare*** de acuerdo a las descripciones botánicas alcanza alrededor de un metro de altura, en Cuba en condiciones naturales la altura promedio debe estar alrededor de 1,50 metros,

rara vez se encuentran individuos de más de dos metros. De acuerdo a lo señalado, no cabría esperar un crecimiento significativo en altura después de los cinco años de realizada la plantación.

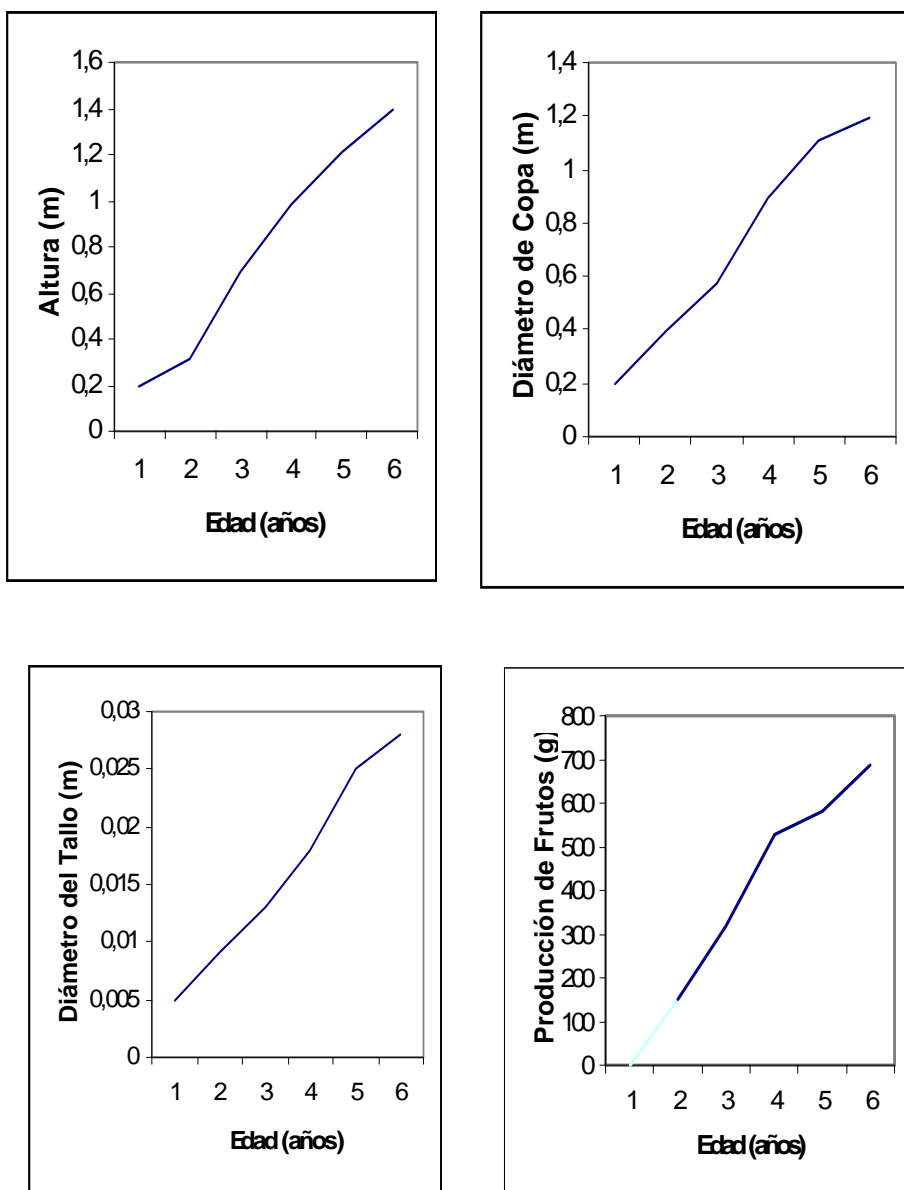


Figura 13 - Comportamiento de la altura, diámetro de copa, diámetro del tallo y la producción de frutos en función de la edad de la plantación.

Al respecto Vásquez y Torres (1981) señalan que las características genéticas de una especie o variedad determinan cuáles son sus hábitos de crecimiento, aun cuando puedan ser alterados por la influencia del ambiente.

A diferencia de la altura, la estabilización del crecimiento del diámetro de copa estuvo determinado principalmente por el efecto del marco de plantación (1m x 1 m), factor externo de comprobada influencia sobre la forma y crecimiento de las copas en la mayoría de las plantas.

A los tres años de edad el diámetro de copa medio era de 1,11 metros, de acuerdo al espaciamiento entre plantas a partir de este momento ocurrió solape entre las copas de las diferentes plantas limitándose su crecimiento. (Figura 14)

Los coeficientes de determinación obtenidos producto del ajuste a las distintas funciones matemáticas aparecen en la Tabla 12. Se destaca que el valor de todos los coeficientes para las variables altura, diámetro de copa y del tallo son superiores al 90 por ciento, lo que indica que un alto porcentaje de su variación es explicada por la variación de la edad de la plantación. En el caso de la producción de frutos las cuatro primeras funciones son capaces de explicar más del 95 por ciento de la variación, el resto presentan ajustes mucho más bajos.



Figura 14 – Aspecto de la plantación a los tres años de edad. (Vista superior, obsérvese el solape entre las copas de las plantas).

Tabla 12- Coeficientes de determinación obtenidos en el ajuste de las diferentes variables a las distintas funciones matemáticas.

Modelo	Variables			
	Alt	DC	DT	PF
Lineal	0.984	0.981	0.990	0.974
Logarítmico	0.916	0.927	0.903	0.960
Cuadrático	0.984	0.984	0.991	0.989
Cúbico	0.995	0.997	0.995	0.992
Compuesto	0.928	0.932	0.962	0.631
Potencia de tiempo	0.969	0.992	0.992	0.841
Exponencial polinómica	0.928	0.932	0.962	0.631
Exponencial	0.928	0.932	0.962	0.631

Alt – Altura  
 DC – Diámetro de Copa  
 DT – Diámetro del Tallo  
 PF – Producción de Frutos

Si nos basamos solamente en la exactitud del ajuste matemático, cualquiera de estas funciones con coeficientes de determinación superiores al 90 por ciento serviría para describir el comportamiento de estas cuatro variables, pero al hacer un análisis de los residuales o al plotear los datos, nos damos cuenta que algunas de ellas sobreestiman o subestiman los valores observados.

Al respecto Soto (1986) señala que resulta imprescindible tener en cuenta a la hora de escoger una función matemática, no solo la relación que exista entre las variables analizadas, reflejado por el coeficiente de determinación, sino que debe hacerse un análisis de los residuales, o sea de la variación de los valores observados con respecto a los estimados en la regresión. Más importante aun resulta tener en cuenta, si desde el punto de vista biológico la función escogida describe correctamente el índice en cuestión.

Sobre el ajuste por análisis de regresión de los datos primarios García y col. (1998) señalan que la utilización de este método tiene como ventaja que, en su análisis, se toman en consideración todos los puntos evaluados, así como que

su solución se verifica a partir de polinomios de bajo orden que simplifican su manejo, facilitando las inferencias necesarias para el estudio del crecimiento.

Pooter (1989) citado por García y col. (1998) plantea que la clave fundamental para el uso exitoso de este método es la selección de un polinomio de grado adecuado para el ajuste de los datos.

Teniendo en cuenta lo señalado anteriormente, se pudo determinar que la función matemática que mejor describe el crecimiento de la altura, el diámetro de copa, el diámetro del tallo y la producción de frutos en relación a la edad de la plantación es la cúbica, con esta función se encontraron las estimaciones más cercanas a los valores reales observados.

Las ecuaciones de regresión determinadas para cada variable fueron las siguientes:

Altura	<b><math>Alt = 0,2123 + -0,1565 * t + 0,1423 * t^2 + - 0,014 * t^3</math></b>
Diámetro de Copa	<b><math>DC = 0,2367 + -0,1411 * t + 0,1262 * t^2 + - 0,0127 * t^3</math></b>
Diámetro del Tallo	<b><math>DT = 0,0047 + -0,0011 * t + 0,0018 * t^2 + - 0,0002 * t^3</math></b>
Producción de Frutos	<b><math>PF = - 123,53 + 93,3022 * t + 31,5873 * t^2 + - 4,1435 * t^3</math></b>

En la Figura 15 se presentan las gráficas las curvas de los valores observados y de los valores estimados por las funciones obtenidas para cada variable donde se comprueba la significación de los ajustes.



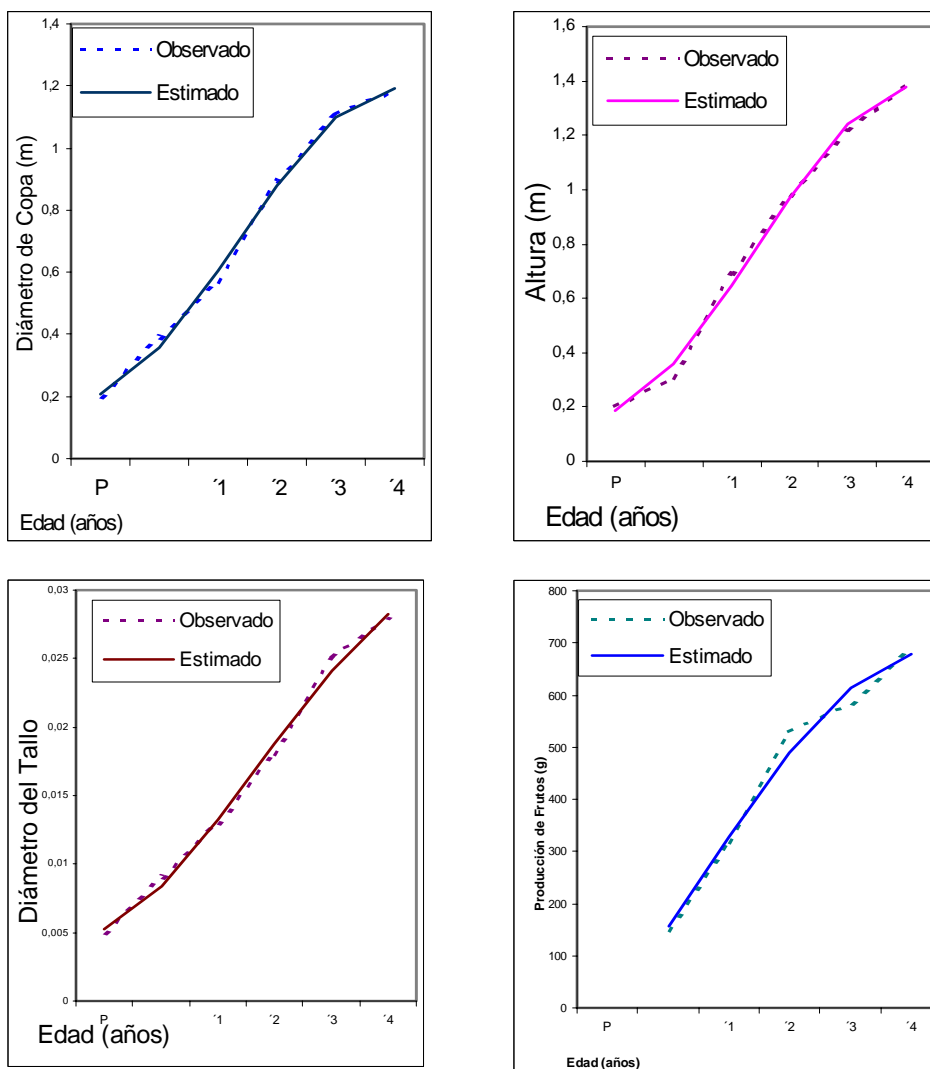


Figura 15– Valores observados y estimados según funciones matemáticas.

Las curvas de incremento o de la tasa absoluta de crecimiento (Figura 16) siguieron en todos los casos la forma típica de campana, alcanzándose los valores más altos entre el tercer y cuarto año para luego decrecer. Por su parte la tasa relativa de crecimiento se mantuvo constante hasta el segundo año para luego disminuir a partir del tercer año.

Estos resultados indican que estas plantas han alcanzado a los 5 años de plantadas un nivel de desarrollo a partir del cual no cabría esperar incrementos significativos en altura y diámetro de copa y por tanto de la producción de frutos, a menos que sean modificados los factores externos que limitan el crecimiento, o sea el espaciamiento entre plantas. En el caso del diámetro del tallo el crecimiento deberá continuar, aunque a niveles muy bajos.

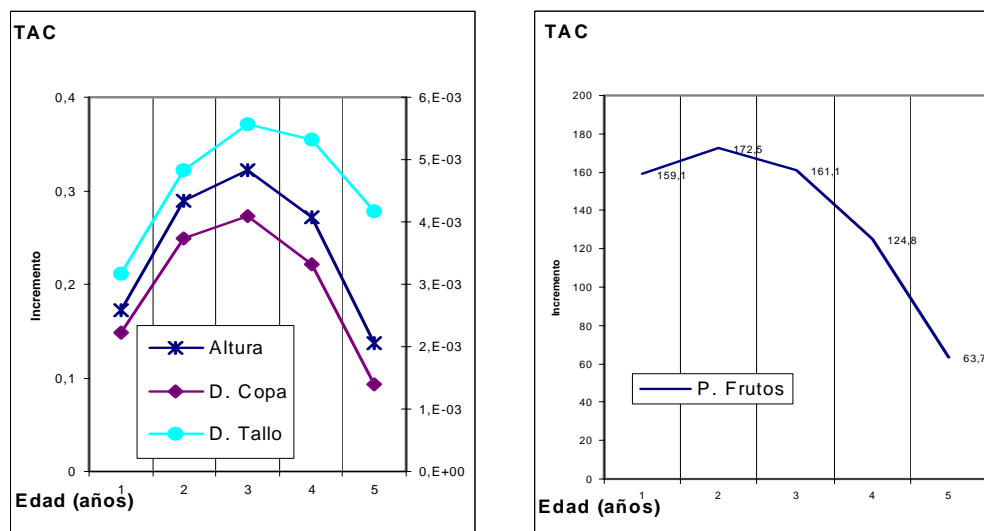


Figura 16 – Incremento anual o tasa absoluta de crecimiento (TAC) de la altura, diámetro de copa, diámetro del tallo y de la producción de frutos.

Una alternativa para propiciar la continuación del crecimiento en esta plantación, sin tener que eliminar plantas para aumentar el espaciamiento, deberá ser la poda, que por demás llevaría aparejado el rejuvenecimiento y revigorización de los individuos. Este tipo de tratamiento es común en especies frutales leñosas como el mango y la guayaba por poner un ejemplo.

Lino y Edson (1994) señalan que las podas tienen el objetivo de mejorar o regularizar las producciones, aumentando la productividad, mejorando la apariencia de los frutos y manteniendo un equilibrio entre la fructificación y el crecimiento vegetal normal.

Una aplicación práctica de estos resultados deberá ser el de poder determinar el momento adecuado para aplicar las podas, el cual estará determinado por las características de la plantación y de los efectos de factores externos como las condiciones ambientales (suelo, clima, etcétera) y el marco de plantación.

Los resultados de este estudio indican la factibilidad del ajuste de los datos de las variables del crecimiento por medio de funciones matemáticas, mediante el análisis de regresión y correlación así como la aplicación práctica de estos.

#### **3.8.4 Determinación de la variabilidad de las vitroplantas en plantación a partir de parámetros morfológicos.**

La aparición de variantes producto a cambios genéticos es uno de los principales problemas asociados a los métodos de reproducción *in vitro*. Estas variantes pueden traer consigo desordenes en las plantas a nivel de campo tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico, las cuales se pueden manifestar, como en el caso de la fresa, en ausencia o pobre rizogénesis, número excesivo de flores, deformación o tamaño pequeño de los frutos y plantas heterogéneas (Rancillac y col., 1987 citado por Orellana, 1998).

En el caso de las vitroplantas de guayabita del pinar aunque no se han presentado variaciones significativas en campo, se realizó un estudio del comportamiento de los principales caracteres morfológicos desde el momento de la plantación y durante cinco años. El estudio se llevó a cabo a través de un análisis de discriminantes, partiendo de que de acuerdo a la edad de las plantas se cumplirán determinados parámetros morfológicos; de ocurrir algún tipo de variación éstos no se corresponderán con el valor esperado de acuerdo a la edad de la planta.

Alvarez (1994) señala que éste análisis es útil para situaciones donde se quiere obtener un modelo de predicción de pertenencia a un determinado grupo basado en las observaciones de las características de cada caso. El procedimiento genera una función discriminante (o más de una si son más de dos grupos) basada en combinaciones lineales de las variables independientes

las cuales ofrecen la mejor discriminación entre los grupos, lo que permite la clasificación de los casos.

Las funciones fueron generadas a partir de una muestra de casos cuya pertenencia a un grupo es conocida, o sea, un grupo de plantas cuyas características morfológicas están en correspondencia con la edad, esta función puede ser aplicada para la clasificación de nuevos casos cuyos valores sean conocidos, pero el grupo al cual pertenecen sea desconocido.

A través del análisis de discriminantes se determinaron cuatro funciones, de estas, la primera explicó el 97,4 por ciento de la varianza, las otras 3 explicaron el 1,7152; 0,8292 y 0,0266 por ciento respectivamente. El máximo poder discriminante correspondió a la variable altura, que fue la de mayor coeficiente en las funciones discriminantes estandarizadas, le siguieron las variables diámetro de copa y diámetro del tallo.

Los coeficientes de las funciones lineales discriminantes aparecen en la Tabla 13, las ecuaciones de regresión canónicas quedaron definidas para las diferentes funciones como sigue:

$$Y = a + b * \text{altura} + c * \text{diam. de copa} + d * \text{diám. del tallo} + e * \text{p. de los frutos}$$

Tabla 13 - Coeficientes de las funciones discriminantes. (Coeficientes no estandarizados)

	Función			
	1	2	3	4
ALTURA	5,649	-7,450	-,720	-2,150
DCOPA	2,477	5,470	6,356	-1,912
DTALLO	71,954	195,087	-248,383	82,548
PF	-,001	-,001	,001	,004
(Constante)	-8,280	-,746	-,292	,117

A partir de los grupos centroides (Tabla 14) se obtuvieron las coordenadas de la proyección del centroide de cada grupo sobre la función discriminante. Este valor se utiliza como patrón de clasificación para cada grupo.

Tabla 14 – Grupos Centroides por Función

Grupos Centroides				
Año	Función 1	Función 2	Función 3	Función 4
1,00	-5,048	,518	-6,725E-02	3,474E-02
2,00	-2,252	-,612	-,233	-4,329E-02
3,00	,363	-,263	,526	2,679E-02
4,00	2,633	,434	4,090E-02	-7,472E-02
5,00	4,045	-3,399E-02	-,307	6,827E-02

En la Figura 17 (Anexos) se muestran los casos para cada grupo en correspondencia al valor de la función discriminante de cada uno. En esta gráfica se pudo apreciar como durante los tres primeros años de la plantación hay una mayor agrupación de los valores alrededor del centro de cada uno de estos tres grupos, durante el cuarto y quinto hay mayor dispersión lo que indica mayor variación de los parámetros evaluados.

En la Figura 18 se muestra en un mismo gráfico los valores de las puntuaciones discriminantes para los cinco grupos. Aquí se pudo apreciar como desde el primer al tercer año hubo una definición clara de cada grupo alrededor del centroide, lo que demostró una mayor uniformidad de los parámetros incluidos en el estudio a estas edades. Lo contrario ocurrió entre el cuarto y quinto año, aquí la diferenciación es menor por lo que no se puede establecer un límite claro entre ambos grupos. De hecho varios individuos a los cuatro años presentan características de individuos de cinco años y viceversa, de ahí que se presente esa indefinición.

Estos resultados están relacionados con las propias características de estas plantas, como se pudo determinar anteriormente, a partir del tercer año la

tendencia del crecimiento es a la estabilización, por lo que durante el cuarto y quinto año de establecida la plantación no deben presentarse grandes diferencias morfológicas entre las plantas.

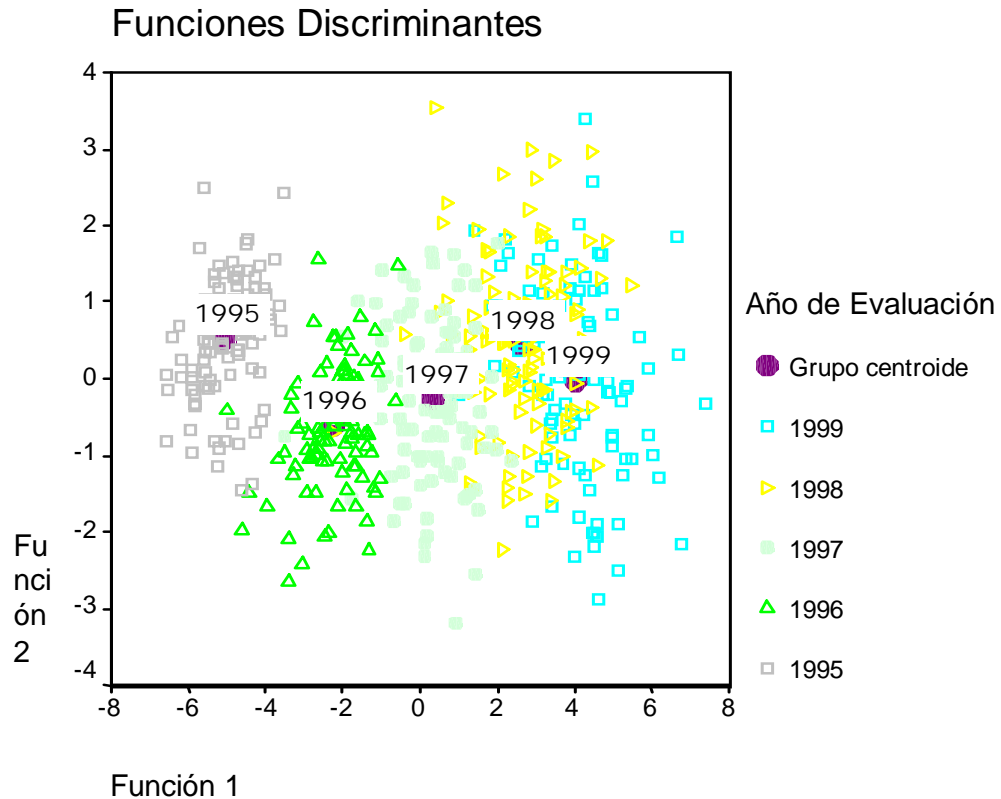


Figura 18 – Resultados de la clasificación a partir de las funciones discriminantes.

Por último en la Tabla 15 se presenta el número de casos de cada grupo que cumplen con los parámetros definidos por las funciones discriminantes para cada edad así como el porcentaje que representan. Se destaca que durante los tres primeros años hay una estrecha relación entre la edad y las características morfológicas de los individuos por lo que la mayoría de estos quedan correctamente clasificados.

Tabla 15 – Resultados de la clasificación a partir de las funciones discriminantes.

		Grupo de pertenencia estimado				
	Año	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
Número	1,00	98	0	0	0	0
	2,00	3	103	4	0	0
	3,00	0	8	93	10	0
	4,00	0	1	17	65	30
	5,00	0	0	2	24	74
%	1,00	100,0	,0	,0	,0	,0
	2,00	2,7	93,6	3,6	,0	,0
	3,00	,0	7,2	83,8	9,0	,0
	4,00	,0	,9	15,0	57,5	26,5
	5,00	,0	,0	2,0	24,0	74,0

A los cuatro años de edad de las plantas es cuando ocurre mayor variación, solo el 57,5 por ciento de los individuos son correctamente clasificados, el 26,5 por ciento tienen características de plantas de 5 años de edad y el 15 por ciento conservó los parámetros de plantas de 3 años. Al quinto año hay un mayor porcentaje de casos correctamente clasificados aunque quedó un 26 por ciento de plantas con características del año anterior.

En general el 81,4 por ciento de los casos fueron correctamente clasificados en los diferentes grupos, lo que demostró una elevada correspondencia entre la edad de los individuos y sus parámetros morfológicos, por otra parte se comprobó una elevada uniformidad desde el punto de vista fenotípico, sobre todo durante los tres primeros años, de lo que se puede inferir que este sistema de propagación no debe haber inducido variabilidad genética.

Rockwood y Warrag (1994) evalúan la talla, supervivencia y maleza asociada a plantas micropropagadas y plantas obtenidas de semillas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, para lo que desarrollan dos líneas de plantas obtenidas por micropropagación directa, planteando que la micropropagación produjo árboles más uniformes en cuanto a la altura, que las plantas provenientes de semillas a los 57 meses de iniciadas las observaciones.

Las principales características de las plantas propagadas *in vitro* de ***P. salutare*** fue el incremento en la producción de frutos con respecto a las plantas regeneradas por semillas además de un mayor crecimiento de las plantas en general.

Los resultados obtenidos en plantación probaron la factibilidad desde el punto de vista biológico de la metodología de micropropagación de ***P. Salutare***. Aunque no existe un patrón para comparar con plantaciones realizadas a partir de plantas obtenidas de semillas, las vitroplantas demostraron un alto vigor en su desarrollo. La producción de frutos de las plantas micropropagadas supera cinco veces a la de las plantas de las áreas naturales.

Esta revigorización de las plantas se asocia al rejuvenecimiento y el saneamiento que se obtiene, a través del cultivo *in vitro*. Perez (1998) refiere que en el caso de árboles, se reporta en manzanos que la floración se retarda un año, pero en el segundo y tercer año las plantas micropropagadas superan en 10 kilogramos la producción de plantas multiplicadas vegetativamente.

Por su parte Delgado (1999) reporta una altura de 6,05 metros y un diámetro de 5,3 centímetros a los 11 meses de edad de plantas micropropagadas de ***Eucalyptus grandis***, valores muy superiores a los de plantas regeneradas de semillas.

### 3.9 Aplicación de los resultados.

La metodología de micropropagación de ***P. salutare*** es aplicada en la actualidad para la propagación masiva de la especie, miles de plantas han sido obtenidas en una pequeña biofábrica en la Escuela Vocacional de Ciencias Exactas Federico Engels de la provincia de Pinar del Río. En la biofábrica del Ministerio de la Agricultura esta metodología fue introducida con éxito y se produjeron alrededor de 20 000 vitroplantas. En la actualidad se crean las condiciones necesarias para acometer nuevamente la micropropagación en esta misma instalación.



Kitto (1997) citado por Orellana (1998) plantea que, la micropropagación es una industria joven con un excelente futuro, pero su incremento dependerá del desarrollo de nuevas técnicas para la automatización de los procesos y del mejoramiento de los sistemas de aclimatación de las plantas. El mismo autor refiere que una de las limitantes para el desarrollo de esta tecnología, ha sido su gran expansión sin haber tenido una base científica sólida, pues cada especie tiene sus particularidades y en cada fase de la micropropagación existen aspectos importantes a tener en cuenta, entre los que se encuentran desde el saneamiento hasta las características agronómicas de las plantas que se adapten al proceso de producción.

Orellana (1998) señala que el desarrollo de protocolos eficientes y científicamente sustentados, la simplificación de los procesos y la reducción de los costos de producción, posibilitarán el incremento de la propagación in vitro, tanto en las especies de plantas actualmente micropropagadas como a nuevas especies, sobre todo, en las ramas de forestales y frutales perennes, donde aun su uso es muy limitado.

### 3.10 Valoración económica

La valoración económica se hizo en función del cálculo de los costos para producir las vitroplantas siguiendo la metodología de micropropagación propuesta. La ficha de costos se determinó en base a los gastos en que se incurren por cada elemento para producir 1 000 vitroplantas (Tabla 16) (Ortega, 1993).

Tabla 16 – Ficha de costos para producir 1 000 vitroplantas de ***P. Salutare***.

Elemento	Importe (\$)
Materias primas y materiales fundamentales	0,03
Materiales auxiliares	0,02
Energía eléctrica	8,52
Salario directo	34,60
Vacaciones	3,15
Aporte a la seguridad social	4,53
Amortización	0,66
Gastos indirectos	6,36
Gastos de organismos superiores	21,67
Otros gastos	0,85
Total	80,38

El costo total para producir el millar de vitroplantas de ***P. Salutare*** es sensiblemente inferior si lo comparamos con el de otras especies leñosas. Smith, (1986) reporta un gasto de \$ 303 por cada 1 000 plantas producidas de ***Pinus radiata*** en Nueva Zelandia, mientras que Hasnain y col. (1986) determinaron un gasto de \$ 491 para obtener 1 000 vitroplantas de especies de coníferas en Canadá. Estas diferencias se deben fundamentalmente a que los ciclos de multiplicación de ***P. Salutare*** son más cortos y los coeficientes de multiplicación son superiores, por otra parte, la etapa de aclimatación que significa el 21 por ciento de los gastos se realiza también en un período de tiempo menor que los reportados para estas especies.

En general los componentes que más contribuyen al costo final son los relacionados con la mano de obra para la realización de las diferentes labores del proceso, representando entre el 65 y el 80 por ciento del costo total. Hasnain y col. (1986) obtienen por este concepto el 68 por ciento, mientras que los costos por concepto de energía e instalaciones y consumo de materias primas incluyendo el material gastable significan el 5 por ciento del total.

Los costos para la propagación masiva de ***P. salutare*** deben ser inferiores a los determinados por Ortega (1993) ya que para su determinación no se tuvieron en cuenta las características y comportamiento de la especie en condiciones de biofábrica sino que estos fueron calculados en condiciones de laboratorio, no obstante este estudio constituye un valioso punto de partida.

Una característica de ***P. salutare*** que favorece la disminución de los costos de producción es el elevado coeficiente de multiplicación (8,5) superior al de bananos (entre 2 y 3) y al de malanga (entre 3 y 4) dos de las especies que se propagan masivamente en las biofábricas. Según Zimmerman y Barnhill (1991), con un 10 por ciento del aumento del coeficiente de multiplicación, se bajan los costos en un 3 por ciento.

En cuanto a la etapa de plantación, utilizando las plantas micropropagadas y teniendo en cuenta labores de preparación del terreno como roturar, gradar, surcar, así como, el propio establecimiento de la plantación y la aplicación de las atenciones culturales necesarias como limpias y fertilización, se calcula que el costo de establecimiento de una hectárea implica un gasto de aproximadamente 10 000 pesos.

La producción que se obtendría de acuerdo a los resultados logrados en la plantación realizada con vitroplantas, sería de 4 884 kilogramos por hectárea (110 qq aproximadamente), lo que alcanzaría un valor de \$ 34 730 por hectárea de guayabita recolectada, permitiendo que se cubran de forma total los gastos y se obtenga además un margen de ganancias superior a los \$ 20 000.

Aunque el costo de las vitroplantas siempre será superior al de una planta propagada por la vía de semilla, la factibilidad económica de la aplicación del cultivo de tejidos para la propagación de ***P. Salutare*** estará determinado por la posibilidad de obtener rápidamente un stock de plantas de una especie declarada en peligro de extinción sin otra vía efectiva de reproducción y de gran valor para la industria del licor.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos evidencian la posibilidad de la regeneración de plantas de ***Psidium salutare*** (HBK) Berg a través del cultivo *in vitro* de segmentos nodales, llegándose a las siguientes conclusiones.

- El fuente de explantes más eficaz para la micropropagación de ***P. salutare*** fueron los segmentos nodales obtenidos a partir de rebrotes de ramas leñosas colocadas en agua y de plántulas asépticas. Los pretratamientos fitosanitarios aplicados a los rebrotes, la desinfección de los explantes con hipoclorito de sodio al 1% de cloro activo durante 10 minutos y bicloruro de mercurio al 0,05% durante 4 minutos así como la utilización de tratamientos antioxidantes con Cisteína y PVP (procedimiento 3) posibilitó la obtención de un elevado porcentaje de segmentos nodales libres de patógenos contaminantes y sobre todo una mayor sobrevivencia de estos *in vitro*.
- El establecimiento *in vitro* de los explantes provenientes de rebrotes y de plantas en el campo se logró en el medio MS, suplementado con Vitaminas de Gamborg, sacarosa 3% y Cisteína 25 mg/L. Solo respondieron a la inducción de la brotación los segmentos nodales provenientes de rebrotes con la presencia de BAP en el medio de cultivo, la concentración de 0,2 mg/L proporcionó el mayor número de segmentos nodales con brotes.
- La adición de BAP 1 mg/L y AIA 0,1 mg/L al medio MS (suplementado con Vitaminas de Gamborg, sacarosa 3% y Cisteína 25 mg/L) proporcionó una elevada tasa de multiplicación y el mejor desarrollo de los brotes de ***P. salutare*** tanto de explantes provenientes de rebrotes como de plantas asépticas. Se determinó que el tiempo óptimo entre subcultivos es de 6 semanas.
- Los mejores resultados en cuanto al porcentaje de brotes enraizados se logra con la reducción de la concentración sales minerales del medio WPM a la mitad, suplementado con vitaminas Gamborg también a la mitad de la

concentración, sacarosa 1.5 %, Cisteína 25 mg/L, carbón activado 1 g/L, ANA 0,2 mg/L y AIB 0,2 mg/L . Esta fase se extiende por 6 semanas.

- El proceso de aclimatación permitió una sobrevivencia de las vitroplantas durante esta etapa del 75 por ciento.
- El mejor sustrato para el desarrollo en vivero de las vitroplantas fue el constituido por mezclas de suelo y humus de lombriz. Se determinó que a las 16 semanas de iniciada esta etapa las plantas están aptas para ser llevadas a plantación.
- Existen altos coeficientes de correlación entre altura de la planta, diámetro de copa y diámetro del tallo en plantas micropropagadas de ***P. salutare***. La correlación entre estos caracteres y la producción de frutos aunque significativa alcanzo un coeficiente menor.
- La variable que mayor contribución tuvo sobre la estimación de la producción de frutos fue el diámetro de copa.
- Se comprobó una estabilización del crecimiento a partir del tercer año de establecida la plantación. La función polinómica de tercer grado o cúbica permitió el mejor ajuste de los datos primarios de la dinámica del crecimiento de todas las variables analizadas.
- La determinación de la variabilidad a través de funciones discriminantes, reveló una elevada uniformidad de los caracteres morfológicos de las plantas obtenidas por medio de la micropropagación.

## Recomendaciones

- Estudiar la posibilidad de la aplicación de métodos semiautomatizados de micropropagación, como los sistemas de inmersión temporal, que permitan una mayor eficiencia del proceso de propagación masiva.
- Ante la posibilidad de ocurrencia de variaciones genéticas provocadas por el efecto del cultivo *in vitro*, es recomendable la realización de estudios citológicos, de isoenzimas e incluso de ADN, que permitan comprobar la estabilidad genética de las plantas micropropagadas.
- Optimizar aun más la fase de adaptación o aclimatación con el objetivo de reducir las pérdidas de vitroplantas. Este trabajo debe ir dirigido hacia el mejoramiento de los substratos de crecimiento y la aplicación de biofertilizantes como las micorrizas.
- Estudiar las características del desarrollo de plantas micropropagadas bajo diferentes marcos de plantación.

1. Agramonte, D., Jiménez, F., Dita, M.A. 1998. Aclimatización. En: Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. 400 p.
2. Ajisthkumar, D., Seenii, S. 1998. Rapid clonal multiplication through *in vitro* axillary shoot proliferation of **Aegle marmelos** (L)Corr, a medicinal tree. Plant Cell Reports. **17**(5):422-426.
3. Alvarez, A. 1998. Genética Forestal. Texto preparado para la maestría en ciencias forestales opción silvicultura.
4. Alvarez, R. 1995. Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS.
5. Amar, S., Pérez, L.E.P., Kerbaui, G.B. 1995. Análisis comparativo del contenido de ceras en hojas de **Catasetum fimbriatum** (Morres) Lindl *in vitro* y *ex vitro*. En: Congreso Nacional de Botánica, 44., Ribeirao Preto. Anais ... Ribeirao Preto p. 267 – 268.
6. Amin, N. M., Jaiswal, S.V. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoots proliferation on nodal explant of mature tree. Plant Cell Tissues and Organ Culture. **9**:235-243.
7. Armas, R., Ortega, R., Rodés, R., 1988. Crecimiento y Desarrollo . En: Fisiología Vegetal (Ed) Pueblo y Educación. 247 – 301.
8. Barceló, J., Rodrigo, G.N., Sabaster, B. 1987. Fisiología Vegetal. (Ed.) Pirámide. Madrid.
9. Barceló, J., Rodrigo, G.N., Sabaster, B. 1992. Fisiología Vegetal. (Ed.) Pirámide. Madrid.
10. Bertrand, A., Noirot, M., Charrier, A. 1991. Minimal Growth *in vitro* conservation of coffee. Plan Cell, Tissue and Organ Culture. **27**: 333 – 339.
11. Bonet, A. 1996. Biodiversidad y Biología de la Conservación en Espacios Naturales Protegidos. Departamento de Ecología. Universidad de Alicante España. 33 p.
12. Borhidi, A., Muñiz, O. 1989. Estado de la conservación de la Flora Cubana. En: Atlas Nacional de Cuba. Cap. X Flora y Vegetación.
13. Boulay, M. 1985. Some practical aspects and applications of the micropropagation of forest trees. International Symposium on *in vitro* Propagation of Forest trees species. Bologna. Italy.
14. Bramwell, D. 1996. The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. En: Conservation Techniques in Botanic Gardens.
15. Calvo, M.C., Segura, J. 1989. Plant regeneration from cultured leaves of **Lavandula latifolia** Medicus, influence of growth regulators and illumination conditions. Plant Cell Tissue and Organ Culture. **19**:33 - 42.



16. Camargo, I.P., Pasqual, M. 1995. Micropropagação da castanheira – do – Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl.) a partir de segmentos nodais. En: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.
17. Caso, O.H. 1980. Crecimiento En: Sibori, 1980. Fisiología Vegetal. Ed. Hemisferio Sur.
18. Cortés, S. 1986. Correlaciones y coeficientes de sendero en cafetos, rendimientos y algunas variables de crecimiento con 5 densidades. Cultivos Tropicales. **8** (4) p. 37.
19. Daquinta, M., Almeida, A., Guerra, M.P. 1998. Morfogénesis *in vitro* de flores inmaduras y de yemas del tallo floral de *Dyckia dystacha*. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO. La Habana. Cuba. p. 33.
20. De la Torre, Angeles. 1999. Comunicación personal.
21. Debergh, P.C, Read, P.E. 1991. Micropropagation. En: Micropropagation: Technology and Application. (Ed.) Kluwer Academic Dordrecht. p. 1 – 13.
22. Debergh, P.C. 1992. Clonal Propagation: Step and Considerations. Plant Cell Tissue and Organ Culture. **30**:135-140.
23. Delgado, L.A, Agramonte, D., Trocones, Ana. 1999. Micropropagación de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales de árboles seleccionados. En: Biotecnología Vegetal, Libro de Reportes Cortos. 5<sup>to</sup> Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. . (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. p. 190 - 192.
24. Díaz – Pérez, J., Shackel, K.A., Sutter, E.G. 1995. Effects of *in vitro* formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue cultured apple shoots. J. Am. Sc. Hortic. Sci. **120**: 435 –440.
25. Durand – Cresswell, R., Boulay, M., Franclet, A. 1985. Vegetative propagation of Eucalyptus. En: Tissue culture in forestry. (Ed.) Bonga, J.M. and Durzan, D.J., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. p. 150 – 181.
26. Franclet, A., 1981. Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. Annales AFOCEL. **1980**:11 – 40.
27. Fridborg, G., Pedersen, M., Landstrom, L., Erikson, T. 1978. The effect of activate charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiology Plant. **43**: 6 – 106.
28. Gamborg, O.L. 1984. Plant cell culture: Nutrition and media. En: Cell culture and somatic cell genetics of plant. (Ed.) San Francisco. California.

29. García, D., Torres, W., Cuba, M., Nuñez, M. 1998. Análisis del crecimiento de callos de **Coffea canophora** var. robusta en presencia del análogo de brasinoesteroide NH5. Cultivos Tropicales. **19** (3) p. 55.
30. García, M. 1999. Propagación clonal in vitro de **Eucalyptus saligna**. Tesis de Maestría.
31. García, M.R., Noda, A.L., Gainza, E., Junco, L. 1998. Propagación clonal in vitro de selecciones de **Eucalyptus pellita** F. Muell; **E. saligna** SM y **E. citriodora** Hook. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO 98. La Habana. Cuba. p. 161.
32. Geada, Gretel. 1999. Propagación clonal in vitro de **Psidium salutare** (HBK) Berg. Tesis de Maestría.
33. George, E.F., Sherrington, P.D. 1984. Plant Propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd; Basingtoke; England. 709 p.
34. Gil, V., Pérez, C., Rojas, A. 1992. Resultados de la micropropagación de Hibiscus helatus (Sw). Centro Agrícola. (2 - 3): 105 – 108.
35. González, M.T., Márquez, M., Urra, C., Martínez, M., Engelmann, F. 1998. Conservación de ápices de piña por vitrificación. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO. La Habana. Cuba. p. 220.
36. Guevara, E. ; N. Hidalgo y O. Murillo. 1992. Cultivo in vitro de Cedro dulce (**Cedrela tonduzii**). Tecnología en Marcha. **11** (3): 10 – 16.
37. Haines, R. J., Martin, B.E. 1997. Biotechnology and the sustainable production of tropical timber. En: Forest Genetic Resources. FAO (25).
38. Haldemann, J.H., Thomas, R.L., McKamy, D.L. 1987. Use of benomyl and rifampicin for in vitro shoot tip culture of **Camellia sinensis** and **C. japonica**. Scientia Horticulturae. **22**: 306 – 307.
39. Hammatt, N. 1992. Progress in the Biotechnology of tree. World Journal of Microbiology & Biotechnology. **8**:369 – 377.
40. Haragushi, M. 1998. Mass clonal propagation of selected mature Keyaki (Selkova serrata Mekino) tree by axillary bud culture. Journal of japanese forestry society **8** (4).
41. Hasnain, S., Pigeon, R., Overend, R. P. 1986. Economic analysis of the use of tissue culture for rapid forest improvement. The Forestry Chronicle. August 1986.
42. Hernández, A., Ortega, F., Bosch, D. 1980. Clasificación genética de los suelos de Cuba. (Ed.) Academia. La Habana.
43. Herrera, C. M. 1993. La gestión de la diversidad biológica. En: Hacia una ciencia de los recursos naturales. (Ed.) Siglo Veintiuno de España Editores, S.A.

44. Hu, C. V. and J. Wang. 1983. Meristem shoot tip and bud culture. In Handbook of Plant Cell. (Eds) Evans, D. A.; P. V. Ammirato and Y. Yameda p. 256 – 290.
45. Hussey, G. 1986. Vegetative propagation of plant by tissue culture. En: Plant cell culture technology (Ed.) Yeomam, M. p. 29 – 66.
46. Inoue, M.T., Vieira, J.D., Correa, G. 1999. Estudio comparativo del desempeño fotosintético entre posturas micropropagadas y de estacas de cuatro clones del híbrido ***Eucalyptus grandis x E. Urophylla***. En: Congreso Forestal Brasileiro, 6., Campos de Jordao. Anais ... 493 – 496.
47. Jarret, R.L., Hasegawa, P.M. 1981. Gibberelic and regulation of adventitious shoot formation from tuber disc of potato. *In vitro* **17**: 825 – 830.
48. Jiménez, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.(Ed.) Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. p. 45 – 56.
49. Jirí, H. 1993. Effect of acid pH on organogenesis of poplar *in vitro*. *Biológica(Bratislava)*. **48**: 89 - 92.
50. Kani, I., Faik, Y., Aytug, A. 1997. Los bosques, la diversidad biológica y el mantenimiento del patrimonio natural. En: Diversidad biológica forestal y el mantenimiento del patrimonio natural. Actas del XI Congreso Forestal Mundial. Vol. 2. p. 2 – 22.
51. Krikorian, A.D. 1995 . Hormones in Tissue culture and Micropropagation. En: Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. (Ed.) Peter J. Davis. p. 774 – 796.
52. Krikorian, A.D.1991. Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT. Colombia.
53. Lakshmi Sita, G., Rani, S., Rao, S.K. 1986. Propagation de ***Eucalyptus grandis*** by tissue culture . En: *Eucalyptus in India. Past present and future.* (Ed.) Sharma, J.K., Nair, J.T.S., Kedharnath, Kondas, S., Proceeding national Seminar Kerala Forest Research Institute. Peechi, Kerala, India. p. 318 – 321.
54. Leifert, C., Morris, C.E., Waites, W.N. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical review in Plant Sciences*. **13**: 139 – 183.
55. Leifert, C., Ritchie, J.Y., Waites, W.M. 1997. Contaminants of plant tissue and cell culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **7**: 452 – 459.
56. Lino, J. , Edson, F. 1994. A poda nas arvores frutíferas. Circular Técnica No 9
57. Liogier Henri, A. 1984. La Flora de la Española V. San Pedro de Macoris. R.D. Universidad Central del Este. Volumen LXIX. Serie Científica 26.

58. Lloyd, G., McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, ***Kalma latifolia***, by use of shoot tip culture. Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc. **30**: 327 – 421.
59. López, Cristina. 1990. Establecimiento de un laboratorio. Medios de cultivo. En: Fundamentos teórico - prácticos del cultivo de tejidos vegetales. (Ed.) FAO.Nº 105.
60. Major, G.; S. Ross; M. Krause and I. Trujillo. 1995. Micropropagación de árboles adultos de ***Eucalyptus grandis*** Maiden (Hill). Uruguay Forestal. **8**: 16 – 17.
61. Mantovani, N.C. 1997. Estudo de regeneração *in vitro* de caixeta (***Didymopanax morototoni***). Dissertação de Mestrado.
62. Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo “*in vitro*”. Ed. Mundi. España.
63. Martín, C., Pérez, C. 1992. Multiplication *in vitro* of ***Limonium estevei***. Annals of Botanic. **70**:165-167.
64. Martinez-Pulido, C. 1990. Cultivo de tejidos vegetales: Multiplicación de pino canario.(Ed) Secretariado de Publicaciones. Universidad de Laguna.
65. McVaugh, R. 1963. Flora de Guatemala. Fieldiana: Botany. Parte VII. **24** (3): 399 – 400.
66. Montes, Silvia., Milian R. 1985. Estudio de correlación y coeficientes de sendero en híbridos de ***Coffea arábica*** L. Cultivos Tropicales **7** (4).
67. Morales, L.O., Sotolongo, R., Alvarez, M., Ferro, N. 1998. Establecimiento *in vitro* de explantes de ***Diospyros crassinervis*** (Krug y Urb) Standl. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO. La Habana. Cuba. p. 62.
68. Morris, P.C. 1990. Biotechnology and plant protection. Plant Protection Bull. **38**(1):25-37.
69. Morte, M.A., Honrubia, M. 1996. ***Tetraclinis articulata*** (Cartagena Cypress). Biotechnology in Agriculture and Forestry. **35**:407-423.
70. Mroginski, L.A., Mroginski, E. , Rey, H. Y. 1998. Conservación de germoplasma de paraíso (***Melia azedarach***) mediante el cultivo *in vitro* de meristemas. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO. La Habana. Cuba. p. 214.
71. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**: 473 – 497.
72. Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plant from tissue cultures. En: Reinert, J., Bajam, Y.P.S. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Berlin: Springer Verlag. p. 177 – 248.
73. Noda, Ana. 1998. Propagación clonal *in vitro* de ***Eucalyptus pellita***. Tesis de Maestría.

74. Orellana, P. (1998). Propagación vía organogénesis. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. . (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. 400 p.
75. Ortega, L., Viñas, J. 1993. Análisis y evaluación económica de la tecnología para la micropropagación de ***Psidium salutare*** a partir de un enfoque de marketing. Trabajo de Diploma.
76. Paéz, Agueda C., Geada, Gretel, Sotolongo, R. 1999. Influencia de la edad y calidad de los sustratos de crecimiento en la adaptación de vitroplantas de ***Psidium salutare***. En: Biotecnología Vegetal, Libro de Reportes Cortos. 5<sup>to</sup> Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. . (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. p. 193 – 195.
77. Perea, D. y W. Navarro. 1988. Técnicas “*in vitro*” para producción y mejoramiento de plantas. Universidad Nacional CONICIT, Colombia, 18 p.
78. Pérez Ponce, J. N. 1998. Mutagénesis *in vitro*. En: Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. 400 p.
79. Pérez Ponce, J.N., Jiménez, F., Agramonte, D. 1999. Aclimatación (Fase IV). Características y problemáticas. En: Biotecnología Vegetal, Libro de Reportes Cortos. 5<sup>to</sup> Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. . (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. p. 188 - 189.
80. Peschke, V.N., Phillips, R.K. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plant. Adv. Genetics **30**: 41 – 75.
81. Pinedo, D.N.H., Graca, M.E.C., Araujo, A.J. 1990. Micropropagação de ***Eucalyptus citriodora*** e ***E. tereticormis***. En: Congresso Florestal Brasileiro. 6. 1990. Annais ... Campos do Jordão 361 – 372.
82. Pinto, J.E., Arelló, E.F. 1994. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotes de ***Kielmeyera coriacea***. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. **29** (6): 867 – 873.
83. Preece, J.E., Sutter, E.G. 1991. Aclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. En: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. Micropropagation technology and application. (Ed.) Dordrech Kluwer Academic Press. p. 71 – 93.
84. Puchooa, D., Sooben, G.N., Linddey, K. 1998. *In vitro* culture of ***Trochetia boutoniana***. Botanic Gardens Micropropagation News. **2** (3): 41 – 43.
85. Rancillac, M. 1979. Mise au point d' une methode de multiplication végétative *in vitro* du Pin maritime (***Pinus pinaster*** Sol.) pour la contitution de clones à partir de semences. Etudes et recherches. AFOCEL. Domaine de l' Etaçon, 77370 Nangis, France **12**: 41 – 48.

## Referencias Bibliográficas

86. Ribas, L.L.F., Zanette, F., Guerra, M.P. 1998. Peroba – Rose (*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.). Induction and maturation of somatic embryos. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO. La Habana. Cuba. p. 130
87. Roca, W.M., Escobar, R.H., Palacio, J.D. 1998. Crioconservación de ápices de yuca mediante encapsulación – deshidratación. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO. La Habana. Cuba. p. 213.
88. Roca, W.M., Mrogrinski, L. A. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali. Colombia.
89. Rockwood, D.L., Warrag, E.I. 1994. Fiel performance of micropropagated, macropropagated and seed - derived propagules of three *Eucalyptus grandis* ortets. *Plant Cell Report*, 13: 628 – 631.
90. Rodríguez, R., Centeno, M., Cañal, M., Fernández, b., Fraga, M. 1999. Bases Fisiológicas del envejecimiento y revigorización vegetal. En: Biotecnología Vegetal, Libro de Reportes Cortos. 5<sup>to</sup> Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. . (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. p. 9.
91. Salisbury, F. B. 1994. Fisiología Vegetal (Ed.) Wadsworth Inc. 4ta. edición 305 p.
92. Sánchez, P. 1990. Flora de Veracruz. Myrtaceae. Instituto de Ecología. A. C. Xatapa. University of California. Fascículo 62. Octubre 1990.
93. Santana, Nancy, Martínez, O., González, María. 1988. Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea arabica*). (Parte I). *Cultivos tropicales*. **10** (2): 36 – 43.
94. Sara Cortes. 1986. Correlación y coeficientes de sendero en cafeto. Rendimiento y algunas variables del crecimiento con cinco densidades. *Cultivos Tropicales*. **8** (4).
95. Schenk, R.V., Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneus and dicotyledoneus plant cell cultures. *Canadian Journal of Botanic*. **50**: 199 – 204.
96. Skoog, F., Miller, C.O. 1958. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118 – 130.
97. Smith, D.R. 1986. Forest and nut trees 1. Radiata pine *Pinus radiata*. En: Y.P.S. Bajaj. (Ed.) *Biotechnology of Tree Improvement for Rapid Propagation and Biomass Energy Production*. Springer – Verlag. Berlin. P. 274 – 291.
98. Soto, F. 1986. Crecimiento de posturas de cafeto en viveros móviles bajo sombra controlada. I. Ajuste a diferentes curvas. *Cultivos Tropicales* **8** (4).

99. Teixeira, J.B., Balduino, A.P.C., Coelho, M.R.N. 1998. *In vitro* Propagation of Brazilian Native Trees. En: Resúmenes del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO 98. La Habana. Cuba. p. 96.
100. Teixeira, J.B., Lemos, J.I., Coelho, M.C. 1995. Micropropagação de espécies lenhosas da mata atlântica. En: Congreso brasileiro de Fisiologia Vegetal, 5. (Ed.) Lavras. Anais. p. 132.
101. Toledo, J., Golmirzaie, A. 1998. Conservación *in vitro* de ***Solanum spp.*** bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. En: Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO 98. La Habana. Cuba. p. 192.
102. Torres, W. 1984. Análisis del crecimiento de las plantas. Reseña. Cultivos Tropicales.
103. Torres, W. 1988. Ajustes de curvas de crecimiento de plantas de papa (***Solanum tuberosum*** L.) por medio de diferentes funciones matemáticas. Cultivos Tropicales **10** (2).
104. Vantomme, P. 1999. Actividades de la FAO en relación con PNFM. En: Actualidad Forestal Tropical. **7** (1).
105. Vázquez, E., Torres, S. 1981. Crecimiento y desarrollo En: Fisiología Vegetal p. 265 – 384.
106. Villalobos, V. 1990. Organogénesis. En: Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. (Ed.) FAO (105): 25 – 30.
107. Villalobos, V., Engelman, F. 1995. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. World Journal of Microbiology & Biotechnology. **9**:21-26.
108. Xiqués, X., Alvarez, M., Torres, V. 1986. Análisis de correlaciones y coeficientes de sendero en caracteres de importancia económica en ***Datura candida*** (Pers.) Safford de flores naranjas II. Cultivos Tropicales. **8** (4) p. 95.
109. Zimmerman, R.H., Barnhill, J. 1991. Commercial Micropropagation in the North American. En: P.C. Debergh y R.H. Zimmerman (Eds.) Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publisher p.173 – 179
110. Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plant. En: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. 1991. Micropropagation: Technology and application. (Ed.) Dordrecht. Kluwer Academic. p. 49 – 69.