

Micropropagación de *Ilex kunthiana* Triana & Planchon (Aquifoliaceae), una especie de gran importancia en programas de revegetalización

Micropropagation of *Ilex kunthiana* Triana & Planchon (Aquifoliaceae), a species of great importance in vegetal covers programs

Jaime Alonso Pedroza–Manrique¹; William Alberto Tupaz-Villacorte².

Resumen

En este trabajo se evaluó el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como una alternativa en la propagación y preservación de *Ilex kunthiana*, especie endémica de gran interés en programas de revegetalización. Se determinó que el efecto del Benlate® a 0,5% durante 12 horas y el hipoclorito de sodio al 0,5% por 1 min., como agentes desinfectantes de las semillas, permiten obtener el 100% de explantes adaptados a condiciones *in vitro*. Las semillas son cultivadas en medio MS con Ácido Giberélico (AG₃) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L). Cuando las plántulas germinaron, se aislaron los nudos con yemas axilares y se cultivaron en medio MS enriquecido con la Auxina Ácido Indol Butírico (AIB) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L) y la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L). A fin de inducir su enraizamiento, posteriormente los brotes regenerados se cultivaron con las Auxinas Ácido Indol Butírico (AIB) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L) y Ácido Naftalén Acético (ANA) (0,0; 0,5; 1,0 mg/L).

Se estableció que 0,5 mg/L de AG₃ favoreció la 100% de germinación de las semillas que fueron la fuente de los nudos. El mejor índice de formación de brotes se logró cuando los nudos se cultivaron con 0,5 mg/L del BAP y 0,5 mg/L del AIB que posteriormente fueron exitosamente enraizados con 0,5 mg/L de AIB, estableciendo las condiciones más adecuadas para la propagación *in vitro* de *Ilex kunthiana*.

Palabras clave: *Ilex kunthiana*, micropropagación, plantas en vías de extinción, AIB, BAP.

Abstract

This work evaluated plant tissue culture as a propagation and preservation alternative for *Ilex kunthiana*, an endemic shrub. It was found that NaOCl (0,5% for 1 min) and Benlate 0,5% for 12 hours), used as disinfectants for *I. Kunthiana* seeds, showed the best results (100%) regarding the percentage of seeds adapted to *in vitro* conditions. Seeds were cultured on MS base medium enriched with gibberellic acid (GA₃) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L). When seeds were germinated *in vitro*, buds were isolated from the seedlings and cultured in MS medium enriched with Indole butyric acid (IBA) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L) and 6-benzylaminopurin (BAP) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L). The regenerated shoots were then cultured with auxins: Indole butyric acid (IBA) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L) and na-

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

2 Licenciado en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas

phthalene acetic acid (NAA) (0,0, 0,5, 1,0 mg/L) to induce their rooting. It was established that 0,5 mg/l GA₃ facilitated the germination of seeds (100%) which were the source of buds. The highest number of shoots was obtained when the buds were cultured with 0,5 mg/L BAP and 0,5 mg/L IBA; these were then successfully rooted with 0,5 mg/L IBA, thereby establishing better conditions for mass propagation of *Ilex kunthiana*.

Key words: *Ilex kunthiana*, micropropagation, endangered plant, IBA, BAP.

Recibido: agosto 27 de 2008

Aprobado: noviembre 24 de 2008

Introducción

En la actualidad son innegables *los rigurosos peligros que se filtran* en los ecosistemas de montaña en el mundo entero, y especialmente los perjuicios se han dispuesto como extremos y significativos en los Andes. De hecho, Colombia es un país megadiverso que presenta peligros de desaparición de su diversidad, situación que orienta a emplear estrategias y metodologías que aseguren la perpetuación de las especies vegetales, en especial aquellas que juegan un papel muy importante en los programas de revegetalización de zonas que son afectadas ecológicamente (Okada, 2001).

Como consecuencia de las alteraciones negativas medioambientales de varios ecosistemas, se ha informado que numerosas especies vegetales que son indispensables en programas de recuperación de ecosistemas vulnerables. Esta situación motiva el desarrollo de estudios ecológicos, fisiológicos y de recuperación basados en los modelos de desarrollo sostenible, referentes a la conservación y protección ambiental, donde las especies vegetales, como *Ilex kunthiana* justifican su propagación mediante técnicas biotecnológicas que se encuentran encaminadas hacia la preservación, recuperación y protección de especies en vías de extinción con categoría vulnerable, en peligro y en peligro crítico.

I. kunthiana, registrada en categoría vulnerable, es una especie frecuente de los bosques que aún quedan en los alrededores del norte de la Sabana de Bogotá, especialmente en Subachoque, Chía y alrededores de Suba, sobre

todo en el humedal La Conejera, siendo también reportada en Antioquia: Urao; en Boyacá: Sogamoso y Villa de Leyva; en Cundinamarca: Monserrate, Vereda El Verjón Sumapaz y Chingaza; en Santander: Páramo del Almorzadero; en Venezuela, Panamá y Costa Rica (Instituto Alexander von Humbolt, 1997).

Sobre el desarrollo de protocolos de propagación o conservación de *I. kunthiana*, no se han realizado investigaciones orientadas hacia su potencial uso como especie indispensable en programas de repoblación de áreas naturales que evidencian alteraciones ecosistémicas. Por esta razón, una gran propagación es un prerrequisito para compensar las exigencias de repoblación de áreas naturales y de esa forma evitar la erradicación de esta planta que se encuentra en vías de extinción. Para las exigencias ecológicas de repoblación, utilizando plantas pioneras, y para la conservación de esta especie en vías de extinción, es necesario establecer métodos de propagación rápida y a gran escala.

De esta forma, la propagación *in vitro* permite la producción de gran número de plántulas en un corto periodo de tiempo. Este trabajo evalúa el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como una alternativa en la preservación y recuperación de *I. kunthiana*, en el sentido de pertenencia, protección y conservación del patrimonio natural, porque la propagación *in vitro* es una fuente importante en la conservación del germoplasma vegetal que ofrece bienes y servicios a la humanidad.

Materiales y métodos

Material vegetal y adaptación a condiciones in vitro

La recolección del material vegetal se realizó en regiones de montañas cercanas a Subchoque y Tenjo, donde se encontraban las plantas en óptimas condiciones fitosanitarias, a diferencia del ejemplar encontrado en el humedal La Conejera donde el árbol manifiesta contaminación causada por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que se encuentran presentes en toda la superficie del tallo y de las hojas. El material vegetal seleccionado fueron los frutos maduros de *I. kunthiana* completamente sanos en donde se recolectaron las semillas que después fueron conservadas en toallas de papel humedecida y empacadas en bolsas plásticas para el transporte al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Distrital FJC.

Las semillas fueron sumergidas en una solución de Benlate® a 0,5% durante 12 horas y posteriormente se realizaron cuatro enjuagues consecutivos con solución jabonosa y agua destilada, estéril. Posteriormente, las semillas fueron escarificadas mecánicamente a fin de facilitar la germinación *in vitro*. Enseguida, las semillas se sumergieron en solución de etanol a 70% durante 30 segundos y luego se colocan en una solución de hipoclorito de sodio en concentraciones de: 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0% durante 5, 10 y 15 min, generando 12 tratamientos que se describen en la tabla 1. Finalmente, se realizan tres enjuagues en agua destilada y estéril, previo a la siembra en los medios de cultivo.

Medios empleados y condiciones de cultivo

Como medio básico en el establecimiento *in vitro* de las semillas de *I. kunthiana* se utilizó el MS (Murashige y Skoog, 1962), enriquecido con el ácido giberélico (AG₃) (0,0, 0,5 y 1,0 mg/L) produciendo un total de tres tratamientos. De las plántulas germinadas, se aislaron los nudos y se cultivaron con los siguientes fitoreguladores: ácido indol butírico (AIB) (0,0, 0,5 y 1,0 mg/L)

y bencilaminopurina (BAP) (0,0, 0,5 y 1,0 mg/L) para un total de nueve tratamientos (tabla 2). En el proceso de enrizamiento de los brotes proliferados se utilizó el ácido indol butírico (AIB) (0,0, 0,5 y 1,0 mg/L) y el ácido naftalén acético (ANA) (0,0, 0,5 y 1,0 mg/L) generando nueve tratamientos (tabla 3). A todos los medios se les suministró 3% (w/v) de sacarosa y 0.8% (w/v) de agar. El pH de los medios fue ajustado a 5,8 antes de ser esterilizados a una presión de 1,06 kg/cm. por 20 min.

Incubación. Una vez fueron sembrados los explantes en los diferentes tratamientos, bajo condiciones asépticas en la cabina de flujo de aire laminar horizontal, ellos fueron incubados durante 12 semanas de observación, en un cuarto de crecimiento a temperatura ambiente de 23 °C, a 25-30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (tubos fluorescentes de luz día FL-20D/18, 20 W, China Electric Co., Taipei), y un fotoperiodo de 14 horas de irradiación lumínica.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección para la obtención de semillas de *I. kunthiana* libres de patógenos bajo condiciones *in vitro*, mediante el empleo del hipoclorito de sodio.

Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo (min.)	Tratamiento
0,5	1	1
	5	2
	10	3
	15	4
1,0	1	5
	5	6
	10	7
	15	8
1,5	1	9
	5	10
	10	11
	15	12
2,0	1	13
	5	14
	10	15
	15	16
2,5	1	17
	5	18
	10	19
	15	20
3,0	1	21
	5	22
	10	23
	15	24

Tabla 2. Efecto del AIB y del BAP en el desarrollo morfogénico de yemas axilares de *I. kunthiana* bajo condiciones *in vitro*.

Acido indol butírico (mg/L)	Bencil aminopurina (mg/L)	Tratamientos
0,0	0,0	1
	0,5	2
	1,0	3
0,5	0,0	4
	0,5	5
	1,0	6
1,0	0,0	7
	0,5	8
	1,0	9

Tabla 3. Efecto del AIB y del ANA en el enraizamiento de brotes propagados de *I. kunthiana* bajo condiciones *in vitro*.

Ácido Indol Butírico (mg/L)	Ácido Naftalén Acético (mg/L)	Tratamientos
0,0	0,0	1
	0,5	2
	1,0	3
0,5	0,0	4
	0,5	5
	1,0	6
1,0	0,0	7
	0,5	8
	1,0	9

Análisis estadístico

El experimento fue desarrollado bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 6 x 4 (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0% del hipoclorito de sodio y 1,0; 5,0; 10 y 15 minutos de su exposición) en el proceso de desinfección

de las semillas. 3 x 3 (0,0; 0,5 y 1,0 mg/L para el AIB y 0,0; 0,5 y 1,0 mg/L para el BAP), en el cultivo de nudos. 3 x 3 (0,0; 0,5 y 1,0 mg/L para el AIB y 0,0; 0,5 y 1,0 mg/L de ANA), en el enraizamiento de los brotes proliferados. En cada uno de los tratamientos de desinfección, germinación, proliferación de brotes y enraizamiento se trabajaron diez réplicas, donde cada réplica estaba representada por un frasco de cultivo, con un explante. Los datos fueron estadísticamente analizados durante las 20 semanas de evaluación en términos de porcentaje y los promedios de los tratamientos fueron comparados empleando la prueba de Fischer (Steel y Torrie, 1985) a fin de establecer el mejor tratamiento de micropropagación de *I. kunthiana*.

Resultados y discusión.

En la adaptación a condiciones *in vitro* y la micropropagación de *I. kunthiana*, los tratamientos evaluados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$); a continuación se describen los diferentes resultados logrados en esta investigación.

Adaptación a condiciones *in vitro*. La germinación de semillas de *I. kunthiana* bajo condiciones *in vitro* se realizó porque los nudos colectados a campo abierto se oxidaron y se murieron en un 100%, aunque fueron tratados con ácido cítrico y ácido ascórbico con 100 mg/L, tanto en pretratamientos como en los medios de cultivo. Esta situación concuerda con lo expuesto por Pérez y Jiménez (1995), quienes recomiendan la incubación en condiciones de oscuridad como método que evita la síntesis de fenoles, porque los productos de la oxidación fenólica se forman bajo condiciones de iluminación, que se manifiestan en la zona basal del corte del nudo, y en las lesiones que dejaron las hojas al ser retiradas de los nudos. Las situaciones de estrés generalizadas como la desecación, los daños mecánicos, los daños en la desinfección, y los cambios en los potenciales hídrico, salino y osmótico al ser incubados en el medio de cultivo y cambios de pH, hacen que el metabolismo de los tejidos vegetales estimulen

la acción de los compuestos fenólicos las cuales son fáciles de oxidar, esta oxidación tiene un carácter fitotóxico por lo que son capaces de alterar procesos morfogénicos de crecimiento y desarrollo (López y Cazorla, 2002).

En este contexto, la obtención del explante para iniciar un cultivo *in vitro* implica invariablemente la necesidad de causar heridas en el tejido vegetal. Estas heridas facilitan la respuesta del tejido al permitir la entrada de nutrientes y fitorreguladores, como por ejemplo en la organogénesis. Sin embargo, cualquier tejido vegetal herido excreta una gran cantidad de compuestos que intervienen en el proceso de cicatrización y defensa contra patógenos, la mayoría de los cuales pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos. Estos compuestos, al contacto con la atmósfera tienden a ser oxidados causando un oscurecimiento del tejido. Esta oxidación conlleva la generación de radicales como las quinonas que resultan altamente tóxicas para los tejidos vegetales (Pedroza et ál., 2005). Así mismo, es importante señalar que los tejidos de especies leñosas, particularmente de angiospermas como *I. kunthiana*, liberan al medio de cultivo polifenoles y taninos, donde la síntesis de los precursores de fenoles es más activa y compleja en tejidos maduros que en tejidos jóvenes, y esta influenciada por el contenido de sales y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo; si las sustancias fenólicas permanecen en el medio del cultivo pueden inhibir el desarrollo de brotes y ocasionar la muerte del material vegetal. El control de la oxidación puede lograrse mediante la adición de antioxidantes en diferentes concentraciones al medio de cultivo (Carrizosa, 1994), o mediante los recultivos con alta frecuencia. Además, teniendo en cuenta que el empleo del hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección de *I. kunthiana*, también contribuyó con el efecto oxidante en los explantes trabajados, porque Chung y Carrasco (2002) y Pedroza et ál., (2007) han demostrado que el uso de cloro comercial induce la oxidación de los tejidos en *Salix spp* y *Dodonea viscosa* L.

Ante esta situación, las plántulas germinadas de *I. kunthiana* son la fuente de explantes

eficientes en el desarrollo de los procesos de micropropagación porque son asépticos y no manifiestan procesos de oxidación. De esta forma, en el control de los agentes contaminantes superficiales de las semillas, el Benlate® y el hipoclorito de sodio respondieron favorablemente, eliminando en un 100% tanto los hongos como las bacterias. De acuerdo con los resultados obtenidos, el tratamiento uno (hipoclorito de sodio al 0,5% durante 1 min) es el tratamiento eficaz para la fase de desinfección porque causa menos daños a los explantes, situación que se evidencia cuando las semillas estuvieron libres de patógenos y en excelentes condiciones fisiológicas durante su germinación. Además, es importante tener en cuenta que a medida que se incrementan las concentraciones del hipoclorito de sodio, aunque el control de los agentes infecciosos es muy bueno, las condiciones fisiológicas de los explantes son fuertemente alteradas, generando la necrosis y la muerte de los tejidos cultivados. Por esta razón, los últimos 12 tratamientos (12–24), aunque manifestaron 100% del control de la contaminación, no produjeron germinación como consecuencia de los daños generados a los embriones. De hecho, las soluciones que contienen cloro son empleadas regularmente por su seguridad, adecuado costo, simplicidad de uso, rapidez de acción y gran espectro antimicrobiano. Este compuesto es activo frente a bacterias, virus, hongos y esporas bacterianas; por tanto una solución de hipoclorito de sodio, en la concentración adecuada, puede emplearse como un desinfectante químico. Sin embargo, la aplicación práctica de tan útiles propiedades se contraponen por la acción oxidante que estas soluciones exhiben y que provocan daño en las superficies sobre las que actúa (Princ, 1998).

De otra parte, según Carmona (2003) y Navas y Subero (1995), las combinaciones de diferentes desinfectantes como el Benlate® y el hipoclorito de sodio son ampliamente usados por el alto grado de control que ejercen contra los agentes contaminantes.

El Benlate® es un fungicida sistémico, que controla los hongos patógenos antes de su penetración en la planta (acción preventiva) o bien cuando la infección comienza (acción curativa) (Carmona, 2003). Por esta razón, los trabajos relacionados con especies forestales como *Salix* sp. y *Aniba perutilis*, han comprobado que el empleo de una mezcla de fungicidas (Benlate®-Captam) y NaOCl a 10% por 30 y 20 min permite mantener niveles de asepsia mayores a 70% (Chung y Carrasco, 2002; Marulanda, 2004). Situación que evidencia que el Benlate® posee un efecto de control sobre una amplia gama de enfermedades causadas por hongos en diversos cultivos de importancia económica.

En este contexto, de acuerdo con Jiménez et ál., (2004), la zona del tejido que se utiliza para iniciar el cultivo *in vitro* tiene gran influencia en la eficiencia de la desinfección. Cuando las plantas se encuentran en crecimiento vegetativo, los explantes seleccionados se desinfectan con gran facilidad a diferencia de los explantes de plantas adultas, porque la desinfección es muy complicada (Pérez y Jiménez, 1995; Rodríguez y Rodríguez., 2003).

Germinación. El mejor tratamiento que indujo la germinación de las semillas de *I. kunthiana* fue el 2, donde se utilizó 0,5 mg/L de AG₃, lográndose el 93% de germinación (figura 1). Adicionalmente, la realización de la prueba

de viabilidad utilizando el tetrazolio confirmó la baja capacidad germinativa de las semillas de *Ilex kunthiana* al obtener un valor aproximado de embriones viables de 27%. Esta prueba se basa en la reacción bioquímica de algunas enzimas de las células vivas con las sales de tetrazolio mediante la reducción del tetrazolio hasta formar un compuesto rojo llamado formazán. La actividad de esas enzimas decrece al igual que la viabilidad de las semillas. Es así como una coloración roja intensa indica células vivas en el embrión y por el contrario, la ausencia de coloración o coloración rosa pálido indican la muerte o poca viabilidad de las células embrionarias. La reacción ocurre dentro de las células y dado que el pigmento que se forma es insoluble, no hay difusión del color rojo a las otras células (Moreno, 1996).

Adicionalmente, en la realización de un conteo de 1000 semillas de *I. kunthiana* se encontró que 53% eran maduras y bien desarrolladas, mientras que 31,5% eran inmaduras y un 15,5% se encontraban parasitadas por larvas en desarrollo de un himenóptero de la familia Eupelmidae como se observa en la figura 2.

El porcentaje de semillas inmaduras se manifiesta por el hecho de que los embriones de varias especies no se desarrollan tan rápidamente como el resto de los tejidos contiguos, así que cuando caen de la planta, los embriones todavía están imperfectamente desarrolla-

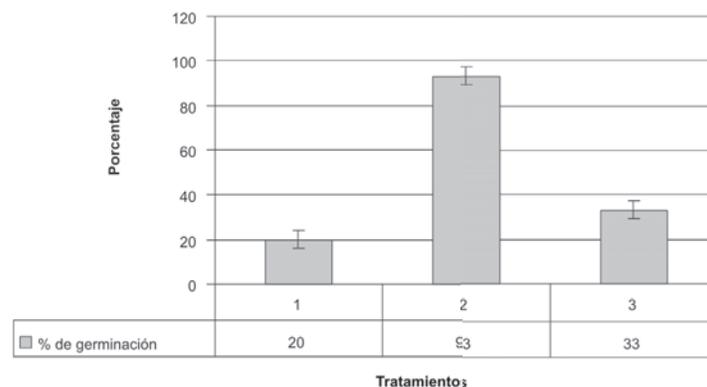


Figura 1. Efecto de AG₃ en la germinación de las semillas de *I. kunthiana*. (Desviación estándar = 8,7).

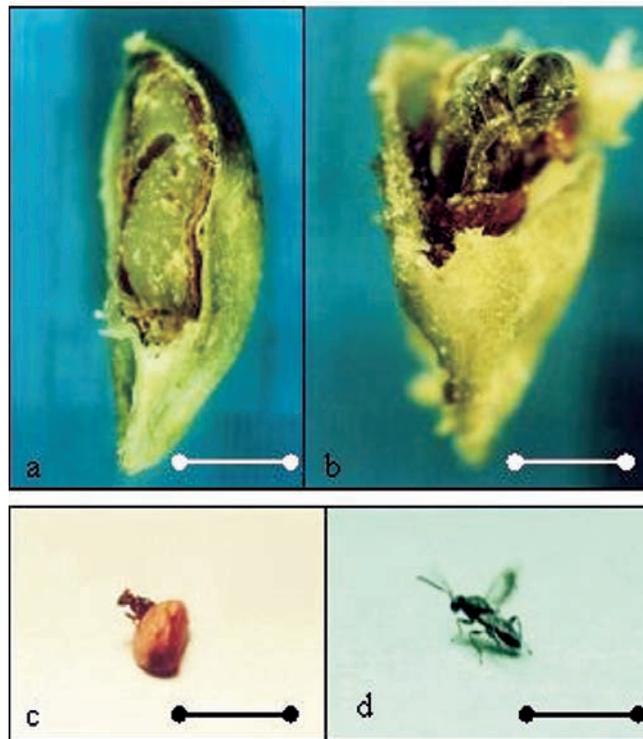


Figura 2. Avispa de la familia Eupelmidae encontrada en las semillas de *Ilex kunthiana*. a) Estado de larva (Barra = 30 mm.) b) Apertura de la semilla. (Barra = 30 mm.) c) La avispa se encuentra saliendo de la semilla. (Barra = 1.5 cm.) d) Ejemplar adulto. (Barra = 2.0 cm.)

dos. Lo que significa que su germinación está completamente impedida hasta que se dé por terminada la formación del embrión y esto puede ocurrir durante o antes de la germinación (Moscoso et ál, 1980). En las especies del género *Ilex* es común la existencia de un alto grado de inmadurez, presentando un embrión diminuto, rudimentario o inmaduro en el momento de la dispersión, adquiriendo su tamaño y forma tiempo después por lo que muchas de estas especies requieren de lo que se conoce como posmaduración (Rocas, 1988).

Es importante señalar que el aumento del porcentaje de germinación de semillas con testa dura se logra cuando previamente se realiza el tratamiento de escarificación mecánica. Estos resultados demuestran como la testa de las semillas de *Ilex kunthiana* está influyendo directamente en la baja tasa de germinación bajo condiciones naturales porque su efecto nega-

tivo depende de la composición y las características anatómicas del tipo de tejido de la exo, meso y endotesta y de su estado de madurez y desarrollo (Trujillo, 1995). La dureza de la testa es un aspecto que probablemente afecta en ocasiones la germinación, provocando latencia por la naturaleza de las cubiertas seminales debido a la resistencia mecánica que impide la expansión del embrión y el contenido de la semilla. La permeabilidad o impermeabilidad de la testa como en el caso de las semillas de *I. kunthiana*, estaría causando una restricción al paso del agua y del oxígeno, lo que provoca la causa principal y frecuente de las dificultades en la germinación en una alta cantidad de especies. En la germinación el agua y el oxígeno influyen directamente, para ello se requiere cierta permeabilidad en la testa de la semilla, que permita el paso de estos elementos al interior de la misma (Moscoso et ál, 1980; Flórez y Pedroza, 2006).

El efecto representativo de 0,5 mg/L del ácido giberélico en la germinación de las semillas de *I. kunthiana*, se explica por la acción estimulante que tienen las giberelinas en semillas de varias especies, especialmente en condiciones sub-óptimas. Es así como una semilla que requiere luz puede germinar en la oscuridad y evitar a menudo los efectos inhibitorios de la temperatura y la salinidad elevada (Luckwill, 1994). Adicionalmente, la presencia de las giberelinas y su síntesis por parte del embrión después de la hidratación de la semilla, inicia el proceso de germinación, induciéndola a secretar amilasa y maltasa que tienen la capacidad de transformar el almidón a glucosa convirtiéndose en fuente de energía para el embrión. En seguida se producen citoquininas, que junto al AG₃, inducen la síntesis de enzimas. Contando con la energía de la glucosa, con proteínas solubles, y con la acción de las citoquininas, las células del embrión se multiplican activamente, iniciándose la germinación cuando el primordio de la raíz principal es capaz de romper la testa (Rojas y Ramírez, 1987).

La germinación observada en el desarrollo de las semillas es de tipo epigea, en donde el hipocótilo se alarga y aleja a los cotiledones del sustrato, que además de su función de almacenamiento de nutrientes tiene frecuentemente color verde y realiza funciones fotosintéticas en la primera etapa de crecimiento de la planta. La testa de las semillas en la germinación epigea se

debe desprender permitiendo la expansión de las hojas cotiledonarias (Vázquez, 1997; Flórez y Pedroza, 2006). Era común observar en las semillas a las que no se retiraba completamente la testa, como para las primeras hojas de la planta en desarrollo les era imposible librarse de ella y poder emerger, haciéndose visible únicamente la raíz, provocando finalmente su muerte semanas después.

Cultivo de nudos. Según los análisis de varianza, existe una diferencia significativa ($P < 0,01$) entre los tratamientos que evalúan el efecto del AIB y del BAP tanto en el proceso de caulogénesis como en el de rizogénesis de los nudos obtenidos de las vitroplántulas germinadas *in vitro* de *I. kunthiana*.

Caulogénesis. El tratamiento cinco (0,5 mg/L de BAP y 0,5 mg/L de AIB), evidenció la mayor proliferación de 49 brotes a partir de los nudos cultivados *in vitro* durante 12 semanas con 6 subcultivos (figura 3). De acuerdo con estos resultados, *I. kunthiana* necesita la presencia de la citoquinina BAP y de la auxina AIB para la proliferación de brotes, lo que difiere de los resultados obtenidos por Luna, (2002) en *Ilex aquifolium*, y de Morte (1991) en *Ilex paraguariensis* que obtuvieron la regeneración de brotes solo con la adición de BAP en el medio de cultivo. Por esta razón, a pesar de pertenecer al mismo género, cada especie genera necesidades diferentes en cuanto a la capacidad de multiplicación celular y de regeneración. Esta

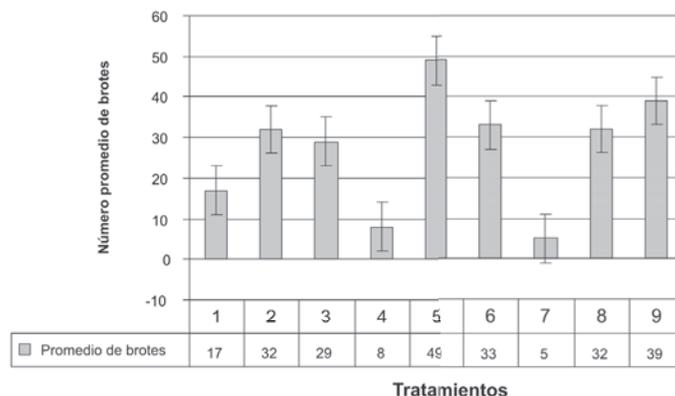


Figura 3. Efecto del BAP y del AIB en la proliferación de brotes de *I. Kunthiana*. (Desviación estándar = 9,3).

capacidad esta determinada por la carga genética y el estado fisiológico de cada planta (Fuentes, 1998).

El tratamiento nueve (1,0 mg/L BAP y 1,0 mg/L AIB) manifestó un rendimiento similar al tratamiento cinco al alcanzar la regeneración de 39 brotes, que en un inicio, mostraba el mejor comportamiento. Además, se encontró que los tratamientos cuatro (0,5 mg/L AIB y 0,0 mg/L BAP) y siete (1,0 mg/L AIB con 0,0 mg/L BAP) a lo largo de las observaciones en la proliferación de brotes, generaron una menor respuesta con respecto al resto de los tratamientos, principalmente por la ausencia de BAP en el medio de cultivo donde se sembraron los nudos dada la importancia ya demostrada de su correlación con el AIB para mejorar los resultados (figura 4). El hecho de que los medios de cultivo en los tratamientos cuatro y siete solo estuvieron enriquecidos con auxinas provocó muy seguramente una elongación celular pero una baja inducción en la multiplicación celular, para lo cual es indispensable la presencia de las citoquininas. Teniendo en cuenta que las citoquininas son sintetizadas en su mayoría en la raíz, y que las auxinas controlan los niveles de citoquini-

nas activas, se puede llegar a inhibir su síntesis o promover la formación de N- glucósidos o la activación de citoquinina oxidasa que reducirían al mínimo las cantidades de citoquininas endógenas producidas por el tejido meristemático de las yemas (Segura, 2000).

La presencia e interacción del AIB con el BAP es determinante, a pesar del papel destacado por parte del BAP, la adición de auxinas favorece el crecimiento de los brotes anulando el efecto depresivo acumulado de las concentraciones de citoquinina en los brotes axilares y restableciendo su normal crecimiento (García, 2000). De igual forma, la presencia de citoquininas de distinta naturaleza dependen en su acción del estado de desarrollo de la planta o de un tejido concreto, sugiriendo que el metabolismo de citoquininas y las interconversiones de las hormonas en otras podrían estar directamente implicadas en la regulación de los procesos de maduración y envejecimiento de la planta (Fernández, 2004).

De la respuesta obtenida en el comportamiento del BAP en presencia del AIB, cabe destacar que a 0,0 mg/L del BAP, a medida que las

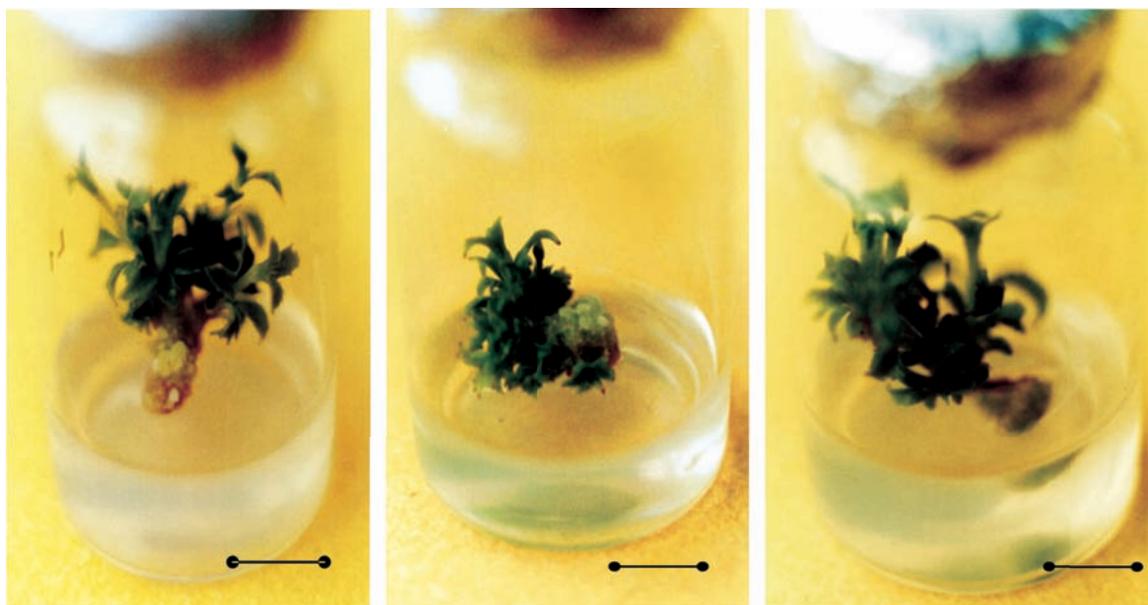


Figura 4. Efecto de 0,5 mg/l de AIB y 0,5 mg/l de BAP en el desarrollo de la proliferación de brotes de *I. kunthiana*. (Barra = 1,0 cm).

concentraciones de AIB aumentan, decrece la regeneración de brotes, esto se puede atribuir a la característica de las auxinas, que a concentraciones bajas estimulan el metabolismo y el desarrollo (Rojas y Ramírez, 1987), pero a medida que las concentraciones se incrementan, tanto el porcentaje de explantes que regeneran como la eficiencia se reducen (Fuentes, 1998). De la misma manera, entre varios compuestos, como las auxinas, ellas retrasan el crecimiento si se utilizan en una concentración suficientemente elevada. Si se restablecen los niveles apropiados de reguladores de crecimiento el sistema podría volver a restablecer su normal funcionamiento (Luckwill, 1994). De hecho, los mejores resultados de respuesta organogénica de los segmentos nodales cultivados *in vitro* varían de acuerdo a la relación hormonal AIB : BAP (Jiménez et ál, 2004; Uribe y Cifuentes, 2004).

Por pruebas realizadas se cree que existen sistemas saturables de receptores capaces de ser inhibidos por altas concentraciones de reguladores de crecimiento. Se considera que si el receptor posee varios puntos de contacto se provocaría su inhibición al unírsele varias moléculas de auxina, impidiendo su unión eficaz y la acción fisiológica adecuada (Fuentes, 1998; Salisbury, F.; Ross, 2000).

Rizogénesis. El tratamiento cuatro (0,5 mg/L de AIB y 0,0 mg/L de ANA) favoreció el enraizamiento de todos los brotes regenerados *in vitro* de *I. kunthiana* (figura 5). Situación que significa que el proceso de rizogénesis está íntimamente ligado con la multiplicación celular, proceso que es favorecido por la presencia de auxinas (Vadillo, 2004). Además, el aumento en la concentración del AIB reduce el comportamiento favorable en la inducción de raíces, específicamente al sobrepasar los 0,5 mg/L.

Según Kantolic y Carmona, (2005) el grado de absorción y posterior liberación de auxinas y citoquininas puede variar según el genotipo de la planta y según la auxina utilizada (Hartman et ál., 1997), lo que indica que quizás *I. kunthiana* requiere de una cantidad adecuada de hormonas, puesto que para su enraizamiento efectivo es necesario agregar una baja concentración de la auxina AIB. De otra parte, las auxinas desempeñan un papel decisivo en muchos procesos del desarrollo vegetal como crecimiento, tropismos, enraizamiento de esquejes y diferenciación vascular, entre otros. Teniendo en cuenta la localización de la biosíntesis de la auxina, se debe considerar que el transporte de la hormona desde los lugares de biosíntesis hasta los tejidos y órganos implica-

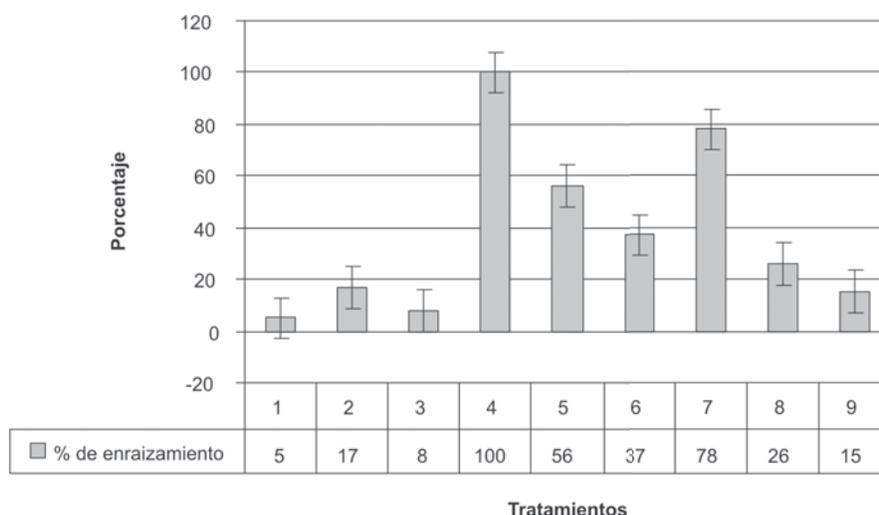


Figura 5. Efecto de los tratamientos con ANA (Ácido naftalenacético) y AIB (Ácido indolbutírico) en la inducción de enraizamiento. (Desviación estándar = 13,3).

dos en las respuestas puede resultar clave en estos procesos (Acosta, 2004).

En términos generales, estos resultados indican que la rizogénesis de los brotes de *I. kunthiana*, no es independiente de la adición exógena de auxinas al medio de cultivo. Segura (2000) y Pedroza et ál, (2005) afirman que muchos efectos fisiológicos pueden explicarse por su interacción con las auxinas, porque ellas participan en el control mutuo de su abundancia y, en general, las citoquininas incrementan los niveles de auxinas mientras que las auxinas disminuyen las concentraciones de citoquininas activas.

Estos resultados demuestran el efecto que ejercen los reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica del explante. Igualmente, se hace evidente el efecto de las auxinas en la elongación celular y en la proliferación de raíces, con lo que se puede corroborar la importancia del balance endógeno – exógeno de auxinas y citoquininas en la propagación efectiva de una especie vegetal, teniendo en cuenta que ambos reguladores mantienen y controlan mutuamente los niveles endógenos de sí mismos (Taiz y Zeiger, 1998).

En términos generales, se logra la producción de plantas completas de *I. kunthiana* obtenidas a partir de los nudos que son obtenidos de vitroplántulas germinadas bajo condiciones *in vitro* y cultivados en medio MS enriquecido con 0,5 mg/L de BAP y 0,5 mg/L AIB, en la fase de proliferación de brotes, mientras que en la fase de enraizamiento de los brotes regenerados 0,5 mg/L AIB permiten obtener un sistema radicular bien desarrollado (figura 6). De esta forma, se evidencia que la micropropagación es una técnica que ha aprovechado los conocimientos fisiológicos y bioquímicos de las plantas (Jiménez, 1998; Yépez, 2003; Albany et ál., 2006). En este contexto, es importante resaltar que el empleo de las semillas, como fuente de explantes para la micropropagación de *I. kunthiana*, son muy especiales porque mantienen la diversidad genética entre la población de las plántulas regeneradas bajo condiciones *in vitro*,



Figura 6. Enraizamiento de los brotes de *I. kunthiana* cultivados con 0,5 mg/l de AIB y 0,0 mg/l de ANA (Barra = 2,0 cm.).

logrando de esta forma mantener la conservación de la biodiversidad de plantas altoandinas con altos riesgos de extinción.

Conclusiones

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una alternativa en la preservación y recuperación de *I. kunthiana*. Se estableció que las plántulas de *I. kunthiana* germinadas bajo condiciones *in vitro* son la principal fuente de explantes en los programas de micropropagación. En este contexto, la adaptación de las semillas bajo condiciones *in vitro* se logra con el empleo del Benlate® a 0,5% durante 12 horas y el hipoclorito de sodio a 0,5% por 1 min que permiten obtener 100% de semillas completamente asépticas. Se determinó que 0,5 mg/L de AG₃ favoreció la germinación de las semillas, y que posteriormente 0,5 mg/L del BAP y 0,5 mg/L del AIB permiten la obtención de 49 brotes en 12 semanas de incubación, que enseguida son exitosamente enraizados con 0,5 mg/L de AIB, estableciendo las condiciones más adecuadas para la propagación *in vitro* de *Ilex kunthiana*.

Agradecimientos

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

Referencias bibliográficas

- Acosta, M. 2004. Función del transporte polar y lateral en la formación de gradientes longitudinal y radial de auxina. Relación con el crecimiento, el enraizamiento y los valores de ploidía celular. Universidad de Murcia. En: metabolismo y modo de acción de Fitohormonas. España: Ed. Universidad de Salamanca; 41.
- Albany, N; Vilchez, J.; León, S.; de Sierralta, M.; Molina, M; Chacil, P. 2006. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera*. *Universidad del Zulia Venezuela*, Facultad de Agronomía. Rev. Fac. Agron. 23: 213-222
- Carmona, M. 2003. Daños y pérdidas causadas por enfermedades. Importancia del Manejo Integrado. Ubicación estratégica de fungicidas foliares. Actas Jornadas Técnicas de Manejo Integrado de enfermedades en cultivos extensivos, p: 10- 15.
- Carrizosa, M. S. 1994. Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. En: Congreso. Investigación en la Universidad Javeriana. Bogotá: Simposio de Ciencias Básicas, Ecoe. Tomo 1, pp. 547-559.
- Chung, P.; Carrasco, B. 2002. Micropropagación de *Salix* spp a través de meristemos foliares. [Online], Disponible en: www.aldeaforestal.d/nemu/webLemu-mayo.01/ciencia/articulos2htm. [Fecha de consulta: 13 de abril 2008].
- Fernández, B. 2004. Niveles de citoquininas endógenas y actividad citoquinina oxidasa/deshidrogenasa en estados juveniles de *Pinus sylvestris*. Universidad de Oviedo. En: metabolismo y modo de acción de Fitohormonas. España: Ed. Universidad de Salamanca; 47.
- Flórez, V.; Pedroza, J. 2006. Germinación y dormancia. Bogotá : Universidad Nacional de Colombia, pp. 28-52.
- Fuentes, A. 1998. Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campell 28. *Biotechnología aplicada*. 15 (2): 242-245.
- García, M. 2000. Propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm. *Revista del jardín botánico nacional de Cuba*. 21 (2): 211-219.
- Hartman, H.; Kester, D.; Davies, F.; Geneve, R. 1997. *Plant propagation: principles and practices*. Sixth edition. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.: p. 192.
- Instituto Alexander von Humbolt. 1997. Informe nacional sobre el estado de biodiversidad: Especies de plantas superiores amenazadas. Colombia. 391.
- Jiménez, E. A. 1998. Cultivo de ápices y meristemos. En: Pérez Ponce, J. N (ed). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba: Instituto de biotecnología de las plantas:: 45-56.
- Jiménez, V. M; Castillo, J; Tavares, E; Guevara, E; Montiel, M. 2004. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de explantes nodales. *Memorias del Simposio Internacional de Guadua*; septiembre 27 a octubre 2 de 2004. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Kantolic, A. G.; Carmona, M. A. 2005. Bases ecofisiológicas de la generación de rendimiento: relación con el efecto de las enfermedades foliares y el uso de fungicidas en el cultivo de soja.: *Manual para ao manejo das doenças da soja* Ed. Brasil : Universidade de Passo Fundo, (en prensa).
- López, C.; Cazorla, J. M. 2002. Saneamiento del material vegetal: cultivo de meristemos (online), disponible en <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros41/meristemos.html> [Fecha de consulta: 11 abril 2008].
- Luckwill, L. 1994. *Reguladores de crecimiento en la producción vegetal*. Barcelona: Dikostav. 89 p.
- Luna, C. 2002. Crioconservación de embriones inmaduros de yerba mate *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) [Online], Disponible en: <http://www.bioteconlogiavegetal.e-campo.com/nota.cfm?sec=9&id=58>. [Fecha de consulta: 13 abril 2008].
- Marulanda, M. L. 2004. Establecimiento *in vitro* de Heliconias con fines de producción masiva UTP. *Scientia et Technica X*, (26): 15-25.
- Moreno, E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. México: Universidad Nacional Autónoma de México: 393 p.
- Morte, M. 1991. Micropropagation of holy (*Ilex aquifolium*). *ISHS Acta Horticulturae* 289: International Symposium on Plant Biotechnology and its Contribution to Plant Development, Multiplication and Improvement. Ginebra. Moncousin.
- Moscoso, F; Vanegas, C.; Sánchez, J. 1980. Efectos de condiciones ambientales en la germinación. Bogotá. Tra-

- bajo de grado (Biólogo). Universidad Social Católica de la Salle. Facultad de Ciencias de la Educación. Departamento de Química y Biología. 183 p.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Navas, M.; Subero, L. 1995. Efecto de 5 fungicidas sobre *Corynespora cassilaca* wei en semilla de ajonjolí (*Sesamum indifugio*) [online], Disponible en: www.redpav-fpolar.infove/fagro/v213a030.html [Fecha de consulta: 13 de abril de 2008].
- Okada, A. 2001. La biodiversidad y los peligros que la amenazan. En: Perea Dallos Margarita (ed). *Biocología agrícola: un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*. Bogotá: Editora Guadalupe, 29 - 41.
- Pedroza, J.; Fernández, C.; Suárez, A. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comparettia falcata* seeds under *in vitro* conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 838-843.
- Pedroza, J.; González, S. R.; Téllez, D. C. 2007. Micropropagación de *Dodonaea viscosa* (L): una especie en vías de extinción. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9 (2): 33-44.
- Pérez P.; Jiménez, G. E. 1995. Micropropagación y fundamentos teóricos prácticos del cultivo *in vitro*. En: *Conferencias en biotecnología agrícola*; 1-10 y 1-6.
- Princ., G. F. 1998. Fundación para el desarrollo de la esterilización en la Argentina [Online], Disponible en: www.drwebsa.com. [Fecha de consulta: el 13 de abril 2008].
- Rocas, A. 1988. Semillas de árboles y arbustos: ontogenia y estructura. México : Limusa. 285 p.
- Rodríguez, E. I.; Rodríguez, F. 2003. Propagación *in vitro* de *Artemisa absinthium* L. en Cuba. Centro de Investigación y desarrollo de medicamentos Rev. Cubana. Med. 6: 6-13.
- Rojas, M.; Ramírez, H. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. México : Limusa. 240 p.
- Salisbury, F.; Ross, C. 2000. *Fisiología Vegetal: Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Madrid: Thomson editores Paraninfo, S. A., pp. 573-574.
- Segura, J. 2000. *Morfogénesis in vitro*. E: Azcon, J. y Talon, M. (eds.). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid: Mac Graw Hill: 381-392.
- Steel, R.; Torrie, J. 1985 *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2 edición. Bogotá: McGraw Hill. pp. 328-367.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. 2 edición. Sunderland: Sinanuer Associates, Inc.: 560 p.
- Trujillo, E. 1995. *Fisiología de la germinación y tratamientos pregerminativos*. Curso nacional de recolección y procesamiento de semillas forestales. Costa Rica: CA-TIE. 4 p.
- Uribe, M.; Cifuentes, L. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque (Valdivia)*. 25(1):129-135.
- Vadillo, G. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Revista Peruana de Biología*. 11(1): 71- 78.
- Vázquez, C. 1997. *La reproducción de las plantas: semillas y meristemas*. México: Fondo de cultura económica. 87 p.
- Yépez, E.; Vargas, E. 2003. Notas preliminares sobre la propagación clonal *in vitro* de *Agave Arizónica*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología Experimental. *Rev. Ven. Biol.* 3: 24-32.