

# Multiplicación clonal *in vivo* e *in vitro* de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl.

## Clonal multiplication *in vivo* and *in vitro* of the native forest species *Aniba perutilis* Hemsl.

Lina Marcela Delgado García y Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez\*

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia.

\*Autora para correspondencia: [rhoyos@unal.edu.co](mailto:rhoyos@unal.edu.co)

Rec.: 27.03.2014 Acep.: 20.08.2014

### Resumen

Se desarrolló una metodología para el establecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Aniba perutilis* (comino crespo), árbol colombiano en peligro crítico de extinción. En la primera etapa, se sometieron semillas de este árbol a la acción de los desinfectantes NaOCl, HgCl<sub>2</sub> y AgNO<sub>3</sub> para su germinación aséptica. Para inducir la formación de brotes se empleó el medio WPM y se evaluó la acción de las fitohormonas BAP, KIN, AIA, ANA y AG<sub>3</sub> en diferentes concentraciones. Para la etapa de enraizamiento se emplearon ANA, AIB, y los medios de cultivo MS y WPM, ambos con sales reducidas a la mitad y combinados con diferentes concentraciones de AIA y ANA. En la etapa de multiplicación *in vivo* se emplearon plántulas establecidas en vivero para evaluar tres tamaños de explantes, categorizados según la distancia desde la base de la planta hasta el ápice: distal (11-14 cm), medio (7 - 8 cm) y basal (3 - 4 cm), con el fin de obtener plantas madres donantes de yemas axilares y mini esquejes para enraizar. En este trabajo se consolida el uso de NaOCl por 15 min como tratamiento óptimo de desinfección, produciendo un porcentaje de supervivencia superior a 60%. El medio WPM suplementado con BAP 3 mg/lit y 1.5 mg/lit de AG<sub>3</sub> generó la producción de un promedio de 0.6 brotes/explante con longitud media de 0.82 cm; no obstante, su baja capacidad de enraizamiento permite catalogar esta especie como recalcitrante al cultivo *in vitro*. En condiciones *in vivo*, cortes a la altura media de las plantas (7 - 8 cm) promovieron la formación de 1.33 brotes/explante y 75% de enraizamiento en los mini-esquejes, constituyendo una herramienta clave en la propagación de la especie.

**Palabras clave:** Comino crespo, establecimiento *in vitro*, *in vivo*, mini-esquejes, recalcitrancia.

### Abstract

A methodology for the *in vitro* and *in vivo* establishment of *Aniba perutilis*, a native Colombian tree which is currently critically endangered, was performed. In the first stage seeds were treated using NaOCl, HgCl<sub>2</sub>, and AgNO<sub>3</sub> to achieve aseptic germination. In order to induce shoot formation, WPM medium was used and phytohormones BAP, KIN, IAA, NAA and GA<sub>3</sub> were evaluated at different concentrations. In the rooting stage NAA and IBA were used in different concentrations and culture media, as well as half-strength MS and WPM mediums combined with different concentrations of IAA and NAA. For *in vivo* multiplication stage, juvenile plants previously established in nursery were used to evaluate three types of cuts defined by the distance between the base of the plant and where the cut was done: distal (11-14 cm), middle (7-8 cm) and basal (3-4 cm), in order to obtain 'donor plants' able to donate axillary buds and mini-cuttings for future rooting. The use of NaOCl for 15 minutes consolidates as optimal disinfection treatment, yielding a survival rate greater than 60%. The WPM medium supplemented with BAP (3 mg/L) and GA<sub>3</sub> (1.5 mg/L) allowed the production of 0.6 shoots/explant with an average length of 0.82 cm. However, the low rooting capacity of the explants suggests that this species could be labeled as recalcitrant to *in vitro* culture. *In vivo* conditions, cuts made at the middle height of the plants promoted the formation of 1.33 shoots/explant and 75% rooting in mini-cuttings, becoming these results in a key tool for the propagation of the species.

**Keywords:** Comino crespo, *in vitro* establishment, mini cuttings, recalcitrance.

## Introducción

Colombia es uno de los países con mayor diversidad de fauna y flora a nivel global, no obstante, actualmente enfrenta una gran problemática como resultado de la sobreexplotación de sus recursos naturales. El crecimiento poblacional, la destrucción y fragmentación de los hábitats, la expansión de la frontera agrícola y la deforestación favorecen la pérdida acelerada de esta biodiversidad.

*Aniba perutilis*, conocido como comino crespo, hace parte de la larga lista de plantas amenazadas y fue incluida bajo la categoría En Peligro (EN) en el Libro Rojo de Plantas de Colombia-Especies Maderables (Cárdenas y Salinas, 2006). La intensa presión antrópica generada sobre los ecosistemas donde habita, ha ocasionado la pérdida de muchas poblaciones en las últimas décadas, quedando sólo pocos individuos aislados, motivo por el cual, su aprovechamiento ha sido prohibido y su explotación vedada (Cárdenas y Salinas, 2006). Esta especie es ampliamente conocida por su alto potencial como árbol maderable; su madera ha sido definida como extremadamente bella y la más fina de América, sus cualidades físicas y mecánicas la clasifican como una de las más apreciadas para la elaboración de productos de alta calidad, logrando reconocimiento internacional. Debido a la importancia y la situación actual de esta especie, es evidente la necesidad de buscar mecanismos encaminados a su recuperación, protección y multiplicación; por lo que la aplicación de técnicas biotecnológicas se convierte en una importante alternativa.

En los últimos años, el uso de técnicas de cultivo *in vitro* ha venido en aumento, ya que permite la producción de un gran número de plántulas, generalmente de genotipos elite, en corto tiempo (George, Hall & Clerck, 2008) y constituye una herramienta útil para la multiplicación de especies forestales, cuyas características como su gran tamaño, producciones irregulares de semilla, baja germinación y recalcitrancia, lentitud en el crecimiento y retardo de la floración, hacen difíciles y lentos los procesos de regeneración. De igual manera, resulta de gran interés explorar herramientas fundamentadas en procesos fisiológicos y relaciones hormonales; como pueden ser, la producción y enraizamiento de mini-esquejes a partir de plantas donantes establecidas en vivero, con el fin de favorecer la propagación vegetativa de esta especie.

En este contexto y teniendo en cuenta que los protocolos de multiplicación reportados para esta especie son escasos (Castro, Jiménez, Ríos, Restrepo y Giraldo, 1993), es necesario desarrollar un mecanismo que garantice su multiplicación asexual sostenible; implementando técnicas

de propagación tanto en laboratorio como en condiciones de vivero. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar metodologías para la multiplicación *in vitro* e *in vivo* de esta especie forestal.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín e incluyó las fases *in vitro* realizada en el Laboratorio, e *in vivo* en condiciones de vivero.

### Fase *in vitro*

**Material vegetal y establecimiento.** Se recolectaron frutos provenientes de árboles en estado de madurez, ubicados en relictos boscosos de los municipios de Támesis y Cocorná, Antioquia. En los sitios de recolección, los frutos fueron despulpados y las semillas extraídas y almacenadas en papel periódico hasta su llegada a Laboratorio.

**Desinfestación de las semillas.** Previo al proceso de desinfestación, las semillas se lavaron con detergente comercial, después se sumergieron en una solución de Benlate® al 2% durante 60 min y se enjuagaron con agua destilada. En cabina de flujo laminar se sometieron a una solución de etanol al 70% durante 3 min y se escarificaron en forma mecánica para eliminar la testa. A continuación, las semillas desnudas fueron tratadas con hipoclorito de sodio (NaOCl), bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) y nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) en concentraciones y tiempos diferentes. Con NaOCl se evaluaron tres concentraciones (5, 10 y 15%) en lapsos de 5, 10 y 15 min; en el caso de HgCl<sub>2</sub> se evaluaron dos concentraciones (0.1 y 0.01%) por 10 min, y para AgNO<sub>3</sub> se evaluaron concentraciones de 0.1 y 0.5% por 5 min, para un total de 13 tratamientos. Finalmente, las semillas se enjuagaron y se sembraron en condiciones *in vitro* para su germinación y posterior recolección de explantos.

**Medio de cultivo para germinación de semillas.** Con el fin de inducir la germinación *in vitro* de semillas de comino crespo, se empleó como base el medio WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd & McCown, 1981) suplementado con 2% de sacarosa, 1.7 g de Phytigel®, 1 g/lit de carbón activado y 1 mg/lit de BAP (Bencilaminopurina). El pH se ajustó a 5.8 y el medio se esterilizó en autoclave a 120 °C a 15 lb de presión durante 15 min. Una vez realizada la siembra en recipientes de vidrio con capacidad de 200 ml, los explantos resultantes fueron incubados en cuartos de crecimiento a temperatura ambiente (24 ± 2°C) y fotoperíodo de 12 h luz con lámparas de luz blanca fría (2000 lux, aproximadamente).

**Multiplicación de brotes.** Para la inducción de múltiples brotes se empleó el medio WPM, suplementado con las citoquininas BAP y KIN (kinetina) en diferentes concentraciones (0, 1.5, 2.0 y 3.0 mg/lt). Adicionalmente, se evaluó el efecto de las auxinas ANA (ácido naftalenoacético), AIA (ácido indolacético) y la giberelina AG<sub>3</sub> en concentraciones de 1.0 y 1.5 mg/lt en combinación con BAP (3 mg/lt). De igual modo, se evaluó el efecto de la concentración de sales reducidas a la mitad de los medios MS (Murashige & Skoog, 1962) y WPM y los reguladores de crecimiento BAP (4 mg/lt) y AIA en concentraciones de 3.0 y 6.0 mg/lt. Los explantes fueron sembrados en frascos de vidrio de 200 ml, los cuales fueron mantenidos en un cuarto de crecimiento a temperatura ambiente (24 ± 2°C) y fotoperíodo de 12 h luz con lámparas de luz blanca fría (2000 lux, aproximadamente).

**Enraizamiento de brotes.** Para la inducción de raíces en los explantes se sembraron brotes individuales en medio WPM con las auxinas ANA y AIB (ácido indolbutírico) solas y en combinación (0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/lt). De igual forma, se evaluó el efecto de los medios de cultivo MS y WPM con sus sales reducidas a la mitad y la acción de las auxinas AIA y ANA en concentraciones de 3 y 6 mg/lt. Los explantes fueron sembrados en frascos de vidrio de 200 ml y mantenidos en un cuarto de crecimiento a temperatura ambiente (24 ± 2°C) y fotoperíodo de 12 h luz con lámparas de luz blanca fría (2000 lux, aproximadamente).

## Fase in vivo

**Multiplicación por material vegetal.** En este caso, se sembraron semillas de comino crespo en vivero, en un sustrato compuesto por suelo:arena:cascarilla de arroz, en proporción 3:1:1, de tal forma que una vez germinaran y se establecieran, pudieran ser utilizadas en la producción y enraizamiento de mini-esquejes. (figura 1)



**Figura 1.** Mini esquejes de comino enraizados y exitosamente establecidos en condiciones de vivero.

**Inducción de brotes y enraizamiento de mini-esquejes.** Partiendo del concepto de que el meristemo apical de la plantas inhibe el crecimiento de los brotes axilares más próximos a él, y que su remoción (decapitación) estimula el crecimiento y desarrollo de las yemas dormantes (Cline, 1997; Shimizu-Sato & Mori, 2001) se evaluó el efecto de tres niveles de corte en las plantas de comino establecidas en vivero, en función de la capacidad de brotación. Así mismo, se determinó la capacidad de enraizamiento de los brotes decapitados, la cual podría obedecer a la acción, según el tipo del corte, de las auxinas presentes en la zona apical y sus efectos. Para esto, cuando las plántulas alcanzaron tamaños homogéneos (longitud promedio 17 cm) se realizaron cortes a diferentes distancias de la base de la planta, independiente del número de nudos que pudiera presentar, denominados: distal (entre 11 - 14 cm), medio (7- 8 cm) y basal (3 - 4 cm), con el fin de obtener, por un lado, plantas donantes y productoras de yemas axilares y por otro, mini-esquejes como producto del corte. A las plantas donantes se les aplicaron semanalmente 30 ml de solución nutritiva como medio WPM líquido suplementado con vitaminas para estimular la brotación y crecimiento de las yemas axilares.

Paralelamente, los mini-esquejes resultantes de los cortes y los brotes producidos, aislados una vez alcanzaron la longitud deseada, fueron sumergidos en una solución enraizadora (5 mg/lt de AIB) y sembrados con turba en bolsas plásticas de 1 kg, para de esta forma inducir la formación de raíces. Los mini-esquejes fueron llevados a laboratorio y mantenidos con luz y temperatura controladas de 1500 lux y 24 ± 2 °C, respectivamente. Una vez formaron la raíz, las plantas fueron trasladadas nuevamente a vivero para su aclimatación.

Las observaciones fueron realizadas 30, 60 y 75 días después del corte e incluyeron longitud de plantas donantes, número y longitud de brotes, supervivencia y porcentaje de enraizamiento de los mini-esquejes, con el fin de establecer relaciones entre los cortes evaluados.

## Análisis estadístico de datos

Los tratamientos tanto in vitro como in vivo realizados fueron dispuestos en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones —excepto en la fase de desinfección, cuando se evaluaron 15 unidades experimentales y tres repeticiones por tratamiento—. Los datos fueron registrados como porcentaje de supervivencia, número de explantes con brotes axilares, número de brotes por explante, longitud promedio de cada brote, presencia de raíz; así como también observaciones generales de los efectos de cada tratamiento. Para comparar las diferencias y los efectos de los factores

en estudio, se realizaron análisis de varianza con ayuda del paquete estadístico SAS/STAT® V.9.0 para Windows, verificando, en primer lugar, la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza. En aquellos casos donde se encontró significancia en el análisis de varianza se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey.

## Resultados y discusión

### Fase *in vitro*

**Establecimiento de *A. perutilis*.** En la fase de desinfección, los tratamientos (T) con hipoclorito de sodio T9 (15% por 15 min) y T8 (15% por 10 min) presentaron los mayores porcentaje de supervivencia de explantes (66.67 y 64.44%, respectivamente,  $P < 0.0001$ ) (Tabla 1), considerando en estos casos, como explantes supervivientes aquellos que se observaron limpios de contaminación bacteriana o fúngica y en crecimiento activo. Por el contrario, la aplicación de bajas concentraciones de hipoclorito, bicloruro de mercurio y nitrato de plata, resultaron en bajos porcentajes de supervivencia (T1, T2, T11 y (T12).

**Tabla 1.** Efecto de diferentes desinfectantes, concentraciones y tiempos de exposición empleados en el establecimiento *in vitro* de comino crespo.

Tratamiento (No.)	Desinfectante	Concentración (%)	Tiempo (min)	Supervivencia (%) <sup>a</sup>
1			5	6.67 ± 1.72 d*
2		5	10	11.11 ± 2.63 d.c
3			15	15.56 ± 2.63 d
4			5	35.56 ± 3.58 b.d.c
5	Hipoclorito de Sodio (NaOCl)	10	10	35.56 ± 2.63 b.d.c
6			15	46.67 ± 1.72 b.a.c
7			5	28.89 ± 1.99 d.c
8		15	10	64.44 ± 2.63 b.a
9			15	66.67 ± 1.72 a
10	Bicloruro de mercurio	0.1	10	22.22 ± 3.58 d.c
11	(HgCl <sub>2</sub> )	0.01	10	8.89 ± 2.63 d
12	Nitrato de Plata	0.1	10	13.33 ± 3.44 d
13	(AgNO <sub>3</sub> )	0.5	3	35.56 ± 2.63 b.d.c

\*a Los valores son medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos.

\* Valores seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ), según la prueba de Tukey.

En este tipo de cultivo de plantas, caracterizadas por semillas con testa dura, uno de los principales problemas es la dificultad para establecer explantes en condiciones asépticas y lograr su brotación, debido a la alta incidencia de contaminación fúngica y bacteriana (Leifert, Ritchie & Waites,

1991; Leifert y Cassels, 2001; Mihaljević *et al.*, 2013), razón por la cual es necesario aplicarles tratamientos con diferentes desinfectantes, entre ellos, hipoclorito de sodio a una concentración de 15%, sin afectar el proceso germinativo. Por su parte las concentraciones bajas del desinfectante permitieron la aparición y la contaminación de los explantes por microorganismos patógenos. Estos resultados confirman el uso del hipoclorito de sodio como uno de los desinfectantes más efectivos en el cultivo de tejidos vegetales (Pedroza-Manrique & Bejarano-Tibocha, 2008). Generalmente las soluciones con cloro son empleadas por su seguridad, bajo costo, facilidad de uso, rápida acción y alto espectro antimicrobiano.

Los resultados obtenidos difieren de los porcentajes de supervivencia menores que 70% encontrados en explantes de otras especies leñosas; así, Abdelnour, Aguilar y Valverde, (2011) encontraron un porcentaje de asepsia de 61% en semillas de pílón (*Hieronyma alchorneoides*) empleando hipoclorito al 5.5% durante 30 min; (Abbasi, Pervaiz, Hafiz, Yaseen & Hussain, 2013) encontraron una supervivencia de 70% en nispero (*Eriobotrya japonica*) con este mismo desinfectante al 10%. Estos resultados evidencian que el proceso de desinfección de cualquier tipo de explante y en particular de los provenientes de plantas leñosas, es uno de los limitantes más severos en el establecimiento *in vitro* de éstas especies.

En el presente estudio se observaron algunas semillas de *A. perutilis* con testa perforada, que al ser disectadas mostraron la presencia de larvas de un coleóptero (*Curculionidae* spp.) afectando el endospermo y ejerciendo daño el embrión cigótico. Este hecho limitó la introducción *in vitro* del material vegetal, ya que las semillas afectadas se contaminaban rápidamente en el medio de cultivo. La presencia de frutos perforados fue citada previamente y se identificó con el nombre común de ‘cogollero blanco’. Algunas de las semillas que no presentaron ataque severo de plagas lograron germinar, no obstante, las plántulas murieron rápidamente.

### Número de brotes y crecimiento *in vitro* de *A. perutilis*

El efecto de las citoquininas BAP y KIN sobre el número (0.2089) o longitud promedio de los brotes (0.1346 cm) no fue significativo, debido probablemente al bajo número de unidades experimentales empleadas, no obstante, se debe señalar que el uso de 3 mg/lit de BAP, en este estudio, en comparación con las concentraciones evaluadas de KIN, fue clave en la inducción de brotes, y permitió obtener un mayor número de brotes (0.6) con mayor longitud promedio (0.54 cm) (Tabla 2). (Castro *et al.* 1993; Babu *et al.*

2003 y Tallón, Porras y Pérez-Tornero, 2012), coinciden en citar la efectividad de BAP sobre KIN en la proliferación de brotes, debido a sus efectos en el rompimiento de la dominancia apical e inducción de la proliferación de yemas axilares en explantes cultivados in vitro. Abbasi *et al.* (2013) consideran que el éxito del BAP para la producción de brotes es debido a la capacidad de los tejidos vegetales para metabolizarlo de manera más eficiente que otros reguladores hormonales sintéticos, o a la capacidad del producto para promover la producción de hormonas naturales, entre ellas la zeatina.

**Tabla 2.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP y KIN en la inducción de múltiples brotes en *A. perutilis* en medio WPM.

Citoquininas (mg/lt)		Explantes con respuesta (%)	Brotes /explante (No.) <sup>a</sup>	Longitud brote (cm) <sup>a</sup>
BAP	KIN			
1.0		40	0.4 ± 0.24	0.2 ± 0.12
1.5		40	0.4 ± 0.24	0.32 ± 0.19
2.0		60	0.6 ± 0.24	0.5 ± 0.21
3.0		60	0.6 ± 0.24	0.54 ± 0.26
	1.0	0	0	0
	1.5	20	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1
	2.0	0	0	0
	3.0	20	0.2 ± 0.2	0.14 ± 0.12

a. Los valores son medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos. BAP: Bencilaminopurina. KIN: Kinetina.

El análisis de varianza para la acción combinada de BAP, AIA, ANA y AG<sub>3</sub> sobre la regeneración de brotes de comino crespo, no mostró diferencias significativas en el número promedio de brotes (0.205) ni en su longitud (0.12 cm), sin embargo, se observó que el uso de 3 mg/lt de BAP y 1 mg/lt de AG<sub>3</sub> ocasionó un aumento en el número promedio de brotes (1.2) con respecto al primer experimento (Tabla 3). Al analizar los datos correspondientes a la longitud promedio de brotes se observó que el tratamiento suplementado con 3 mg/lt de BAP y 1.5 mg/lt de AG<sub>3</sub> favoreció el mayor crecimiento de los brotes (0.82) con respecto a los demás tratamientos evaluados.

En este trabajo se evidenció la acción conjunta de algunos reguladores hormonales sobre los explantes, por ej., el uso de BAP en combinación con AG<sub>3</sub> permitió la elongación de los brotes in vitro (Figura 2); en contraste, el uso de auxinas no favoreció los procesos de crecimiento y desarrollo de estos. Estos resultados son similares a los reportados por (Vengadesan & Pijut 2009), en explantes de *Quercus rubra*, *Q. leucotrichophora*

**Tabla 3.** Efecto de diferentes concentraciones (mg/lt) de los reguladores de crecimiento BAP, AIA, ANA y AG<sub>3</sub> en la inducción de múltiples brotes de *A. perutilis* en medio WPM.

BAP	Reguladore			Explantes con respuesta (%)	Brotes / explante (no.) <sup>a</sup>	Longitud brote (cm) <sup>a</sup>
	AIA	ANA	AG <sub>3</sub>			
3.0	1.0	—	—	20	0.2 ± 0.2	0.14 ± 0.14
3.0	—	1.0	—	20	0.2 ± 0.2	0.26 ± 0.26
3.0	—	—	1.0	80	1.2 ± 0.49	0.646 ± 0.26
3.0	1.5	—	—	40	0.4 ± 0.24	0.16 ± 0.1
3.0	—	1.5	—	40	0.4 ± 0.24	0.32 ± 0.19
3.0	—	—	1.5	60	0.6 ± 0.24	0.82 ± 0.37

a. Los valores son medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos. AIA: ácido indolacético. BAP: Bencilaminopurina. AG: giberelinas.



**Figura 2.** Plántula in vitro de *Aniba perutilis* en medio de establecimiento (3 mg/L BAP + 1,5 mg/L AG<sub>3</sub>).

y *Q. glauca*, en los que el uso combinado de BAP (5 mg/lt) y AG<sub>3</sub> (1 mg/lt) fue esencial para la inducción y el crecimiento eficiente de brotes. (Pérez-Tornero, Tallón y Porras, 2010) encontraron que en la etapa de proliferación, las giberelinas pueden aumentar el crecimiento y/o el aumento en la tasa de multiplicación de brotes, como se evidenció este estudio cuando se les agregaron al medio de cultivo 2 mg/lt de BAP y 2 mg/lt de AG<sub>3</sub>.

El uso de medios nutritivos con concentración de sales reducidas favorece en muchas especies el desarrollo de yemas, (Jardim, Sampaio, Costa, Gonçalves e Brandão, 2010), observaron que el medio MS con el 50% de su fuerza iónica y suplementado con BAP (4 mg/l) y AIA 6 (mg/l) estimuló la formación de un mayor número de brotes en *A. rosaeodora*, lo que contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo, en el cual el medio de cultivo y las combinaciones hormonales no beneficiaron la aparición y crecimiento de brotes en comparación con otros experimentos realizados.

## Enraizamiento *in vitro* de *A. perutilis*.

No obstante las combinaciones hormonales empleadas, los explantes de *A. perutilis* cultivados *in vitro* no emitieron raíces (datos no mostrados). En algunos de estos fue evidente la aparición de una masa callogénica en la base del tallo. Se debe considerar que no siempre las auxinas naturales o sintéticas pueden inducir enraizamiento en explantes *in vitro*, algunas especies de plantas, principalmente las leñosas, enraizan con dificultad o no enraizan en presencia de ellas, indicando que otros factores pueden influenciar la aparición de primordios radicales, como lo plantean (Arri-llaga, Marzo y Segura, 1991; Jardim *et al.* 2010).

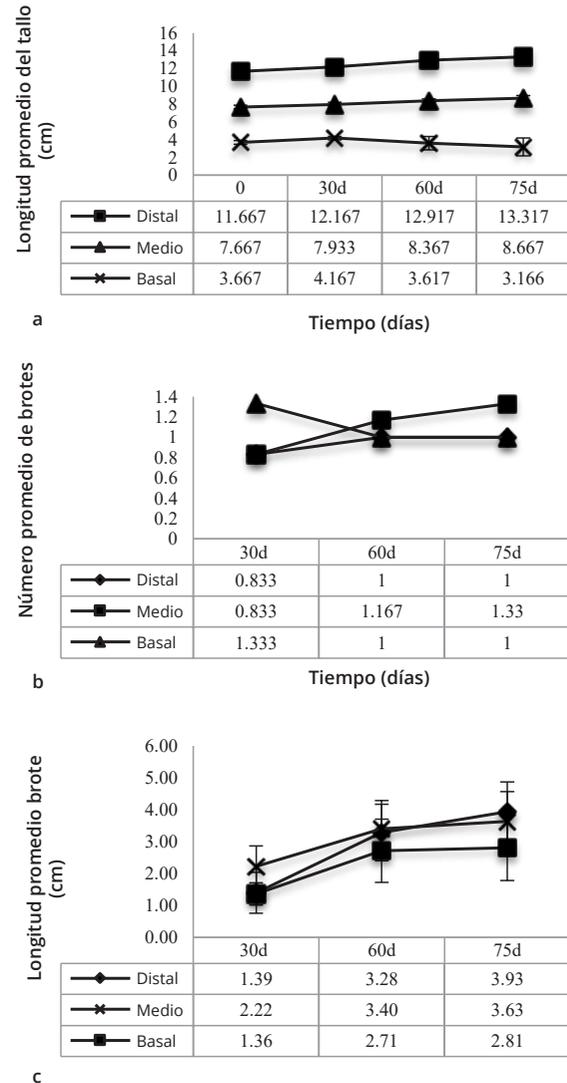
Una planta o una fase del desarrollo de ésta puede ser calificada como recalcitrante al cultivo de tejidos cuando, a pesar de manejar las condiciones del cultivo, no se produce la respuesta deseada (Bonga, Klimaszewska, & von Aderkas, 2010). Debido a que los ensayos realizados en este trabajo variaron en cuanto al tipo, concentración y combinaciones de fitohormonas empleadas y concordando con lo observado por Castro *et al.* (1993), *A. perutilis* puede ser considerada como recalcitrante al cultivo *in vitro*, factor que obedece, en parte, a la condición silvestre de la especie. Este fenómeno pudo ser favorecido por el estrés al que los explantes fueron sometidos al ser sembrados *in vitro*. Es reconocido que la introducción de plantas por cultivo de tejidos puede inducir cambios en su metabolismo, fisiología y desarrollo, generando la aparición de disturbios metabólicos que conducen eventualmente a la pérdida de totipotencialidad celular y ausencia de respuesta y en algunos casos, a un elevado nivel de necrosis y finalmente a la muerte.

## Fase *in vivo*

**Número de brotes y crecimiento *in vivo* de *A. perutilis*** Los promedios de la longitud del tallo, 30, 60 y 75 después del corte (decapitación), mostraron que ésta aumento en los cortes distal y medio, no así en el corte basal (Figura 3a). En este último caso, el corte bajo de los tallos ocasionó la muerte de algunas plántulas, posiblemente por la ausencia de yemas de rebrote cerca al medio de cultivo.

Treinta días después del corte, el promedio del número de brotes producidos fue más alto (1.33) cuando el corte se hizo en la base de las plántulas donantes (Figura 3b). Sesenta y 75 días después del corte medio el número de brotes fue de 1.17 y 1.33, respectivamente, (Figura 3b). Las plantas del corte basal y distal presentaron, en promedio, un brote por planta.

Por otra parte, las plantas de corte medio generaron brotes más largos 30, 60 y 75 días



**Figura 3.** (a) Longitud promedio del tallo (cm). (b) Número promedio de brotes por planta. (c) Longitud promedio de brotes (cm) en plantas donantes de comino crespo 30, 60 y 75 días después de la realización de cortes a diferentes alturas (distal, media y basal).

poscorte (2.22, 3.40 y 3.65 cm), mientras que los valores más bajos para esta variable los presentaron las plantas del corte basal (1.36, 2.71 y 2.81 cm) y las plantas del corte distal, 75 días poscorte, presentaron el mayor crecimiento (3.93 cm) (Figura 3c).

Los resultados obtenidos en este estudio ponen en evidencia un efecto diferencial tanto en la producción de brotes como en la formación de raíces, probablemente determinado por la relación auxina-citoquinina. Considerando que las auxinas son sintetizadas en el ápice de la planta y en las hojas jóvenes en expansión, la remoción del ápice o decapitación de la planta madre, estimula las citoquininas que intervienen en el proceso de crecimiento de las yemas (George *et al.*, 2008).

En consecuencia estas hormonas, sintetizadas en la raíz, son transportadas a lo largo del tallo, promoviendo el crecimiento de los brotes; como se puede observar en los resultados obtenidos en este estudio.

Contrario a lo que ocurre con la inducción de brotes por parte de las citoquininas, la acción de las auxinas endógenas y la suplementada exógenamente favoreció la aparición de un sistema radicular apto para el trasplante del material vegetal de comino crespo y su posterior establecimiento en vivero. Las auxinas pueden tener una alta influencia sobre los mini-esquejes producto del corte, ya que participan en el proceso de organización de meristemas que dan origen a órganos definidos como las raíces, además participan en el crecimiento y expansión celular y diferenciación del tejido vascular, entre otros (George *et al.*, 2008).

## Conclusiones

La producción de múltiples brotes y mini-esquejes aptos para enraizamiento y posterior traslado exitoso a vivero, fue favorecida por la altura de corte en plantas jóvenes de comino crespo.

En el trabajo se desarrolló un protocolo para el establecimiento de comino crespo en condiciones *in vitro*, sin embargo, el enraizamiento en diferentes tratamientos fue nula, dificultando el proceso de aclimatación y endurecimiento.

Los resultados obtenidos son una base importante para trabajos posteriores en esta especie maderable.

Los cortes a la altura media de la planta de comino crespo promovieron por un lado, la formación de brotes axilares y por otro, el desarrollo de mini-esquejes que, en condiciones adecuadas, enraizaron y formaron plantas aptas para ser utilizadas con fines de conservación o a largo plazo en aprovechamientos sostenibles.

## Referencias

Abbasi, N. A., Pervaiz, T., Hafiz, I. A., Yaseen, M., & Husain, A. (2013). Assessing the response of indigenous loquat cultivar Mardan to phytohormones for *in vitro* shoot proliferation and rooting. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 14(9), 774-84. <http://doi.org/10.1631/jzus.B1200277>

Abdelnour, A.; Aguilar, M. E.; & Valverde, L. (2011). Micropropagación de Pilón (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*, 35(2), 9-1.

Arrillaga, I.; Marzo, T.; y Segura, J. (1991). Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 27, 341-348.

Babu, K. N., Sajina, A., Mino, D., John, C. Z., Mini, P. M., Tushar, K. V., ... Ravindran, P. N. (2003). Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), 179-183. <http://doi.org/10.1023/A:1023988110064>

Bonga, J. M., Klimaszewska, K. K., & von Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(3), 241-254. <http://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>

Cárdenas, L.D. & Salinas, N.R. (2006). *Libro rojo de plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas. I parte*. Instituto de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá D.C. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

Castro, R.D., Jiménez, C.M., Ríos, G.D., Restrepo, A.C. & Giraldo, M.C. (1993). *Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro para la propagación y conservación de germoplasma de cuatro especies vegetales en vías de extinción en el Oriente antioqueño. Comino, abarco, almendrón y guayacán*. Cuaderno de Investigación y Desarrollo Regional No. 8. El Santuario. Cornare, 94 p.

Cline, M. (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *American journal of botany*, 84(8), 1064-1069. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708661>

George, E.; Hall, M.; y De Clerck, G. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Ed. vol 1. The Background, 495 p.

Jardim, L. S., Sampaio, P. de T. B., Costa, S. de S., Gonçalves, C. de Q. B., & Brandão, H. L. M. (2010). Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (Aniba roseodora Ducke). *Acta Amazonica*, 40(2), 275-279. <http://doi.org/10.1590/S0044-59672010000200005>

Leifert, C., & Cassells, A.C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(2), 133-138. <http://doi.org/10.1007/s11627-001-0025-y>

Leifert, C., Ritchie, J.Y., & Waites, W.M. (1991). Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World journal of microbiology & biotechnology*, 7(4), 452-469. <http://doi.org/10.1007/BF00303371>

Lloyd, G. y McCown, B. (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc*, 30, 421-427.

Mihaljević, I.; Dugalić, K.; Tomaš, V.; Viljevac, M.; Pranjić, A.; Čmelik, Z., ...Jurković, Z. (2013). *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of 'oblačinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences*, 58(2), 117-126. <http://doi.org/10.2298/JAS1302117M>

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

Pedroza-Manrique, J. & Bejarano-Tibocha, H. (2008). Propagación vegetativa *In Vitro* de Puya santosii. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 36-48

Pérez-Tornero, O., Tallón, C. I., & Porras, I. (2010). An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(3), 263-271. <http://doi.org/10.1007/s11240-009-9643-6>

Shimizu-Sato, S., & Mori, H. (2001). Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology*, 127(4), 1405-1413. <http://doi.org/10.1104/pp.010841>

Tallón, C. I., Porras, I., & Pérez-Tornero, O. (2012). Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48(5), 488-499. <http://doi.org/10.1007/s11627-012-9457-9>

Vengadesan, G., & Pijut, P. M. (2009). *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(4), 474-482. <http://doi.org/10.1007/s11627-008-9182-6>