

ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO *in vitro* PARA EL ESTABLECIMIENTO DE ENCENILLO (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) Y DE RODAMONTE (*Escallonia myrtilloides* L.F) EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS DE TEJIDOS DEL JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS.

EDISSON ANDRES VILLAMIZAR GALVIS

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA
2005**

ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO *in vitro* PARA EL ESTABLECIMIENTO DE ENCENILLO (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) Y RODAMONTE (*Escallonia myrtilloides* L.F) EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS DE TEJIDOS DEL JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS.

**EDISSON ANDRÉS VILLAMIZAR GALVIS
CÓDIGO 610195**

**DIRECTOR
RICARDO ARTURO PACHECO SALAMANCA
ING. AGRÓNOMO**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA
2005**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1. PROBLEMA

1.1 TITULO

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.4 JUSTIFICACIÓN

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo General

1.5.2 Objetivos Específicos

1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES

1.6.1 Alcances

1.6.2 Limitaciones

1.7 DELIMITACIONES

1.7.1 Delimitación temporal

1.7.2 Delimitación espacial

1.7.3 Delimitación conceptual

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales

2.2.2 Métodos de regeneración de plantas

2.2.3 Medios de cultivo

2.2.4 Micropropagación vía organogénesis

2.2.5 Micropropagación de especies leñosas

2.2.6 Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.)

2.2.7 Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

2.4 MARCO CONTEXTUAL

2.5 MARCO LEGAL

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.2 METODOS

3.2.1 Fase de campo

3.2.2 Fase de laboratorio

3.2.2.1 Preparación de medios de cultivo

3.2.2.2 Desinfección de los explantes

3.2.2.2.1 Desinfección de explantes de Encenillo

3.2.2.3 Siembra de explantes de Encenillo en el medio de cultivo

3.2.2.4 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DE ENCENILLO A TRAVÉS DE LAS FASES DE MADURACIÓN DE SUS FRUTOS.

3.2.2.5 Desinfección de explantes de Rodamonte.

3.2.2.6 Siembra de explantes de Rodamonte en el medio de cultivo

3.2.2.7 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DE RODAMONTE A TRAVÉS DE LAS FASES DE MADURACIÓN DE SUS FRUTOS.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 ENCENILLO

4.1.1 Desinfección de yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y puntas radiculares

4.1.1 Desinfección de frutos para extracción de semillas de Encenillo.

4.1.2 Semillas de Encenillo

4.1.3 Fase 1. Fruto inmaduro

4.1.4 Fase 2. Fruto en proceso de maduración

4.1.5 Fase 3. Fruto posmaduro

4.2 RODAMONTE

4.2.1 Desinfección de yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y puntas radiculares

4.2.2 Desinfección de frutos para extracción de semillas de Rodamonte

4.2.3 Semillas de Rodamonte.

4.2.4 Fase 2

4.2.5 Fase 3

4.2.6 Fase 4

4.2.7 Fase 5

4.2.8 Fase 6

4.2.9 Fase 7

4.2.10 Fase 8

4.2.11 Fase 9

5. CONCLUSIONES

6. RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INTRODUCCIÓN

La singular riqueza biológica de Colombia significa responsabilidades extraordinarias para nuestra sociedad que deben expresarse en compromisos e iniciativas viables y efectivas para su conservación. Esta riqueza también ofrece oportunidades día a día más evidentes, tanto para el país en su conjunto, como para distintos sectores económicos, comunidades rurales, propietarios y organizaciones sociales. Debemos responder por la preservación de especies en peligro de extinción y elevar al nivel de discusiones, propuestas y decisiones todos esfuerzos dirigidos a la protección de la flora de nuestro país. (Naranjo, et.al.1992).

Uno de los trabajos ya realizados a nivel de laboratorio hecho por Jaime Guzmán denominado: Estudios preliminares orientados al establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) Y Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f.) Bajo condiciones *in vitro*. En la ciudad de Bogotá en las instalaciones del Jardín Botánico José Celestino Mutis dentro de la Subdirección Científica, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, año 2005. Algunos comentarios de este trabajo son los siguientes: En Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.), los tratamientos de desinfección planteados para las yemas axilares, segmentos nodales y secciones foliares no fueron los más adecuados ya que no se logró la desinfección ni el establecimiento *in vitro* de éstos explantes. Se logró la desinfección de explantes alternativos de Encenillo (meristemos, semillas y puntas radiculares) los cuales presentaron una mejor respuesta ante los tratamientos de desinfección planteados pero sin respuesta a un crecimiento óptimo. En Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f.), Se logró la desinfección de segmentos nodales, de secciones foliares y yemas axilares; la determinación del mejor medio de cultivo y antioxidante. (Naranjo, et.al.1992).

Es así como en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Jardín Botánico José Celestino Mutis en un marco de convenio interinstitucional entre el Jardín Botánico y el DAMA se plantea y desarrolla un proyecto en torno a la propagación de especies leñosas altoandinas, albergando como objetivo general el determinar las condiciones óptimas *in vitro* para el establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y de Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f), mediante la técnica de regeneración de plantas vía organogénesis para llevar a cabo en el presente trabajo de grado, modalidad Tesis, donde estas especies están distribuidas a lo largo del sistema alto andino Colombiano en las formaciones de bosque húmedo Montano bajo y bosque muy húmedo Montano bajo y se desarrollan en climas caracterizados por una temperatura que varía entre los 6 y los 17 °C y precipitaciones entre 1200 y 3000 mm/año. Debido a que éstas especies leñosas nativas tienen ciertas dificultades en cuanto a su propagación natural e implementados en viveros no dan resultados satisfactorios a conllevado a la búsqueda de otro tipo de estrategias de propagación no convencionales como el cultivo de tejidos *in Vitro* de material vegetal de Encenillo y Rodamonte que aseguren una multiplicación y/o propagación de estas especies en peligro de extinción para la restauración de los ecosistemas alto andinos Colombianos (Castro et al.1993).

1. PROBLEMA

1.1 TITULO

Estandarización del protocolo *in vitro* para el establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* h.b. & k.) Y Rodamonte (*escallonia myrtilloides* L.f) en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales del Jardín Botánico José Celestino Mutis.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los ecosistemas en nuestro país para su restauración requieren de material vegetal nativo y en buenas condiciones fitosanitarias ya que los métodos tradicionales de propagación afectan el desarrollo y disponibilidad de especies nativas como Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f) pertenecientes a la flora altoandina del país. Además, estas especies se encuentran de una u otras formas amenazadas causando alteraciones que ejercen un efecto global sobre la naturaleza y finalmente repercuten sobre el hombre mismo. La Biotecnología Vegetal permite reducir la pérdida de diversidad genética estableciendo protocolos para el manejo de especies forestales nativas con énfasis en aquellas que se encuentran amenazadas (Castro *et al.* 1993).

1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las condiciones *in Vitro* adecuadas para el establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f)?

1.4 JUSTIFICACIÓN

En su afán de conquista y expansión, el hombre ha reemplazado poco a poco los sistemas naturales por comunidades artificiales que suplen sus necesidades. Para producir alimentos los materiales requeridos por sus industrias, se alteran y destruyen estos conjuntos que son el resultado de muchísimo tiempo de sucesión ecológica. En Colombia existen en los bosques altoandinos especies nativas amenazadas que llegarían a producir un efecto global sobre la naturaleza y finalmente repercutirían sobre el hombre mismo siendo estudiadas especialmente en este proyecto especies como el Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f).

El interés del presente proyecto busca suplir la necesidad de rescate y conservación de éstas especies amenazadas mediante las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ya que es una estrategia que garantiza la perdurabilidad de los recursos fitogenéticos para el futuro beneficio del hombre y del ambiente, por medio de procesos de reintroducción.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 General

Determinar las condiciones óptimas *in vitro* para el establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y de Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f), creando las bases para una posterior propagación, mediante la técnica de regeneración de plantas vía organogénesis.

1.5.2 Específicos

Definir protocolos de desinfección eficientes para los explantes a utilizar de Encenillo y Rodamonte.

Evaluar el tipo de explante con mejor respuesta para el establecimiento *in vitro* de Encenillo y Rodamonte.

Determinar la concentración o balance hormonal óptimos para el establecimiento *in vitro* de Encenillo y Rodamonte.

Determinar el medio de cultivo más eficiente para el establecimiento *in vitro* de Encenillo y Rodamonte.

1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES

1.6.1 Alcances

Con el presente proyecto se pretende establecer las condiciones propicias para el establecimiento y propagación *in vitro* de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f) respectivamente.

1.6.2 Limitaciones

Algunas especies nativas tienen ciertas dificultades en cuanto a su propagación natural, por ello procesos de propagación sexual o asexual implementados en vivero no dan resultados satisfactorios.

Los estudios e investigaciones realizadas en cuanto al cultivo *in vitro* de especies leñosas, en especial lo referente a Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f) son escasos en su mayoría.

Una de las mayores limitaciones en plantas leñosas, es la dificultad para erradicar las infecciones endógenas y la excreción de sustancias como polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación *in vitro* crean oxidación.

1.7 DELIMITACIONES

1.7.1 Delimitación temporal

El tiempo que se considera necesario para el desarrollo del proyecto de grado modalidad Tesis comprende un período aproximado de seis meses, dentro del cual se estima todo lo referente a recopilación de material bibliográfico sobre las especies en estudio, diseño del plan de trabajo y cronograma de actividades, periodo de pruebas y análisis, registros de los avances de la investigación y resultados finales.

1.7.2 Delimitación espacial

El Presente trabajo de grado, se desarrollará en la ciudad de Bogotá, en el Jardín Botánico José Celestino Mutis (JCM) con dirección en la AV. Cl 63 N° 68-95 localidad 10 de Engativá al Occidente de la ciudad dentro de la subdirección científica, en la cual se encuentra el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, lugar de ejecución de este proyecto.

1.7.3 Delimitación conceptual

El proyecto está basado en los contenidos teóricos del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y su aplicación a especies leñosas, en la biología celular y molecular y sus aplicaciones tecnológicas, y en los nuevos enfoques de la biotecnología como herramienta poderosa para la conservación y propagación de especies vegetales en peligro de extinción.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES

SILVA, Liliana. Evaluación del potencial organogénico de material juvenil y adulto de *Weinmannia tomentosa* H.B. & K. Bogotá. Universidad Pontificia Javeriana. Departamento de Biología. Unidad de Biotecnología Vegetal. 1995.

Resumen. Se evaluó el potencial organogénico de *Weinmannia tomentosa* H.B. & K. en plantas de 4 a 5 años de edad para material juvenil y plantas de 10 años o más para material adulto. Se logró formación de brotes (con Citoquininas) a partir de nudos provenientes de material juvenil.

ARIAS, Olga y RODRÍGUEZ, Gloria. Propagación masiva *in vitro* y adaptación a condiciones externas de Hojarasco (*Talauma carcifragans* L.). Bogotá. Universidad Distrital. Facultad de Ciencias y educación. Proyecto curricular en licenciatura en Biología. 1998.

Resumen. Se lograron obtener protocolos de desinfección para yemas, domos y puntas radiculares. En cuanto a la antioxidación no se presentaron resultados positivos en yemas y domos meristemáticos mientras que en puntas radiculares se estableció un protocolo óptimo con una solución de ácido cítrico.

GUZMÁN, Jaime. Estudios preliminares orientados al establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f.) bajo condiciones *in vitro*. Bogotá. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Subdirección Científica. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. 2005.

Resumen. En Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.), los tratamientos de desinfección planteados para las yemas axilares, segmentos nodales y secciones foliares de no fueron los más adecuados ya que no se logró la desinfección y por ende el establecimiento *in vitro* de éstos explantes. Se logró la desinfección de los explantes alternativos de Encenillo (meristemas, semillas y puntas radiculares) los cuales presentaron una mejor respuesta ante los tratamientos de desinfección planteados.

En Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f.), Se logró la desinfección de segmentos nodales, de secciones foliares y yemas axilares de Rodamonte, y la determinación del mejor medio de cultivo y antioxidante.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Principios básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) y proporcionar artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Roca, W. 1991).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; bioconversión y producción de compuestos útiles; incremento de la variabilidad genética; obtención de plantas libres de patógenos; propagación de plantas; y conservación e intercambio de germoplasma. De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerán del objetivo perseguido (Roca, W. 1991).

Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. (Roca, W. 1991).

Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980; Dodds, 1983); en plantas herbáceas como el maní o la arveja, la regeneración de plantas a partir de hojas está limitada al empleo de explantes jóvenes (Mroginski et al., 1981b; 1981c; Rubulo et al., 1982).

Asepsia

Ausencia de microorganismos patógenos. Estado libre de gérmenes, conjunto de procedimientos que impiden la llegada de microorganismos a un medio.

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. (Roca, W. 1991).

Para establecer cultivos asépticos es conveniente; trabajar en ambientes adecuados; esterilizar los medios de cultivos más comúnmente en un autoclave a una presión de 15 lb. Durante 15 a 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121 °C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida; desinfectar los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y realizar los cultivos con ciertas normas de asepsia. (Roca, W. 1991).

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio [Ca(OCl)₂] de 6% a 12% y el cloruro de mercurio (HgCl₂) de 0.1% a 1.5%, aunque este compuesto es altamente tóxico y no es fácilmente removible del explante. (Roca, W. 1991).

En algunos casos resulta útil el agregar algún agente tenso activo (por ejemplo, Tween-20, del 0.01% al 0.1%), pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol al 70%, asimismo es conveniente agitar el explante conjuntamente con la solución desinfectante. Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos. (Roca, W. 1991).

ÁCIDO HIPOCLOROSO

Hidroxiclорuro de Oxigeno

El Hidroxiclорuro de oxigeno es en la actualidad el máximo biocida conocido, entendiéndose por biocida el producto químico que ataca por oxidación bacterias, virus, hongos y algas.

Ficha técnica

Formula química:

HOCL

Producto:	Desinfectante biocida
PH concentrado:	El HOCL tiene polaridad cambiante, es decir actúa con PH inestable.
Color:	Desde cristalino a amarillo
Composición:	Mezcla de HOCL, agua desmineralizada, cloruro de sodio (0.6 vol.) trazas de carbonatos.
Concentración:	Según la presentación del producto: Líquido del 3% al 12% de cloro. Granulado del 65% al 99%.
Usos:	Oxidante Tratamientos de agua residuales Uso sanitario en tratamiento de aguas residuales Potabilización de aguas.

Formas de aplicación

La forma molecular del Hidroxicloruro de Oxígeno (HOCL) es de las más pequeñas conocidas convirtiéndose por esta razón en un desinfectante de acción rápida, 100 veces más rápido que la del hipoclorito (OCL) y 300 veces más rápido que las cloraminas fenólicas.

Beneficios del producto

- No es tóxico, es decir que no contiene materias tóxicas como: soda cáustica, cloraminas fenólicas o cianuros.
- Estable. Con un adecuado almacenamiento los gránulos de HOCL son estables durante años.
- No ataca la piel
- Biodegradable. Debido al pequeño tamaño de la molécula del HOCL es un desinfectante de acción rápida siendo 100 veces más rápida que el hipoclorito.

Actividad antibacteriana

Espectro de actividad antibacteriana del hidróxido de cloro.

Eficacia total sobre el siguiente espectro de microorganismos:

- Bacterias gran positivas
- Bacterias gran negativas
- Hongos
- Protozoos
- Virus

CONDICIONES AMBIENTALES PARA LA INCUBACIÓN

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura; las respuestas morfológicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Martín, 1980; Hughes, 1981), así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seibert et al., 1980; Hughes, 1981). El área de incubación o crecimiento *in vitro* debe proporcionar un buen control de la temperatura entre 20 y 28 °C; de iluminación debe tener una variable según las necesidades: de 1000 a 5000 lux y de la humedad relativa entre 70 y 80%. (Seibert et al., 1980; Hughes, 1981).

DESINFECCIÓN

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón: en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, y otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; en la práctica, se establecen experimentalmente. (Roca, W. 1991).

2.2.2 MÉTODOS DE REGENERACIÓN DE PLANTAS

La **organogénesis** es un evento morfológico que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras plantas, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el

subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido parental. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el enraizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (organogénesis indirecta). En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa. La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias. (Roca, W. 1991).

Formación de yemas axilares

Esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente (Hu y Wang, 1983).

Este método a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido en primer lugar a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética, sin embargo existe la posibilidad de una variación de tipo somaclonal. (Hu y Wang, 1983).

Su principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. No obstante, existen posibilidades de automatizar algunas etapas del proceso con la utilización de biorreactores (Takayama y Akita, 1996) y sistemas de inmersión temporal de los explantes (Alvard y col., 1993; Jiménez y col., 1996).

Formación de yemas adventicias

Es la formación de novo de yemas a partir de meristemos preexistentes o tejido no meristemático, los cuales se originan de una o de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citoquininas (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización y automatización (Akita y col., 1994).

Sin embargo, al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento-enraizamiento. Adicionalmente presenta el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias (Reuveni y col., 1985). Este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema. (Reuveni y col., 1985).

Embriogénesis somática

Se ha definido como embriones somáticos, asexuales o adventicios los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat y col., 1979). Según Litz y Jarret (1991), los embriones somáticos son estructuras bipolares, que tienen un eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales. (Litz y Jarret 1991).

Este método es ampliamente considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo (Preil, 1991), los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales (Redenbaugh, 1986).

Su desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre la biología del proceso, siendo limitado el número de especies en los cuales se reporta una embriogénesis somática eficiente que permita un uso aplicado del método, aún cuando se reporta la embriogénesis somática en un número relativamente amplio de especies; Destacándose la zanahoria, la alfalfa y el apio por su elevada capacidad embriogenética. (Redenbaugh, 1986).

2.2.3 Medios de cultivo

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Hay dos niveles de nutrimentos los macronutrientes y los micronutrientes. En términos generales, la mayor parte de los tejidos de las plantas se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas, se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) y los microelementos

(B, Zn, Cu, Mo, Fe, Cl); además, existe la evidencia que se debería añadir níquel en la lista (Eskew et al., 1984).

Componentes del medio de cultivo

Las principales diferencias entre los medios de cultivo se relacionan con los distintos compuestos utilizados para estimular la división celular. Para esto, se emplean generalmente: AC que es (5-15% v/w), o también 2,4-D, ANA, AIA, o benzotiazol-2-oxiacético (BTOA) solo o en combinación con el AC; éstos han resultado, generalmente, adecuados para iniciar y mantener cultivos de callos de la mayoría de los tejidos de plantas. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y luego complementarlo de diferentes formas; para determinar la formulación adecuada, que le brinde al tejido la mejor oportunidad de desplegar su capacidad intrínseca para crecer se debe hacer a través de la experimentación. (Roca, W. 1991).

Los componentes de los medios de cultivo han sido también objeto de estudios extensivos. Generalmente se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro y microelementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores del crecimiento. El regulador de crecimiento clave en la formación de brotes es la cinetina; sin embargo, las auxinas en bajas concentraciones han tenido respuesta en algunas especies. (Villalobos et al. , 1984).

Aminoácidos como suplementos del Medio Basal

Los aminoácidos, suministrados como extracto de levadura (Sandstedt et al., 1960) o como CH (Caseína Hidrolizada) (Shantz et al., 1959), pueden promover el crecimiento de ciertos cultivos; en algunos sistemas de cultivo de tejidos como el del tabaco, dos constituyentes del medio de cultivo, el ácido aspártico y el ácido glutámico, promueven el crecimiento en la misma forma en que lo hace el complemento aminoácido completo presente en el extracto de levadura. (Steward et al. 1968).

El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales cultivadas se debe considerar como un problema complejo, ya que muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos. Se ha encontrado que la leucina y la glicina tienen efectos muy profundos en la morfogénesis, aunque las proteínas de las plantas contienen cantidades bajas de aminoácidos sulfúricos como la cisteína y la metionina (Durzan et al., 1983), éstos son necesarios para un crecimiento y desarrollo normal. (Durzan et al. , 1983).

Vitaminas

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria, por conveniencia. El ácido ascórbico (10 a 100 mg/litro) se considera benéfico en algunos casos, debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación de sustancias fenólicas. El ácido ascórbico no parece ser tan bueno como el glutatión (10 a 100 mg/litro) para retrasar el oscurecimiento de algunos tejidos recalcitrantes, ya que se autooxida más rápidamente que éste último. Otros afirman que la vitamina B12 es benéfica para el crecimiento de los cultivos de tejidos y células (Reinert et al., 1956).

Reguladores de crecimiento

El uso de promotores del crecimiento naturales y sintéticos se han encontrado útiles para el establecimiento y mantenimiento de cultivo de tejidos. (Roca, W. 1991).

Las **Auxinas**, comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Existen varias auxinas llamadas “naturales”, que incluyen AIA, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, y otras; el AIA es el compuesto de mayor utilización. También se utiliza un buen número de sustancias que se han producido sintéticamente; son las llamadas “auxinas sintéticas”, entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AIB se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente. En la práctica, el uso de las auxinas es un arte, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/litro; el 2,4-D se utiliza en concentraciones que varían de 0.1 a 10 mg/litro; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores de 1 a 10 mg/litro. Generalmente sólo se utiliza una auxina cada vez, sin embargo, para algunos investigadores ha sido útil el uso simultáneo de diferentes auxinas ya que parecen tener diferentes sitios de acción, en ciertos casos podría ser conveniente ensayarlas, incluso en combinaciones más extensivas. (Roca, W. 1991).

Citocininas y sustancias similares

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Su concentración varía en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes. La 6-BAP, la Kinetina, el 2-ip y la Zeatina, se utilizan en un 74.6%, 19.4%, 3% y 3% respectivamente en los medios de cultivo empleados en la propagación (Hu y Wang, 1983).

La **KIN** (6-furfuril-aminopurina), ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural. (Miller et al. , 1956).

La **ZEA** (6-[4-hidroxi-E-metilbut-trans-2-enilamino]purina) se considera generalmente como el prototipo de las adenilcitosininas que ocurren naturalmente; es unas 10 veces más potente que la KIN. (Miller et al. , 1956).

El **6-BAP** (6-Bencilaminopurina) es una citocinina sintética, se utiliza actualmente tal vez más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente, a un costo más o menos razonable. (Miller et al. , 1956).

Giberelinas

Luego de su aislamiento a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, el ácido giberélico (AG) es adicionado a los medios de cultivo de tejidos de forma ocasional a pesar de sus efectos fisiológicos tan amplios. Se sabe que hay varias giberelinas, relacionadas con el AG, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría. (Roca, W. 1991).

2.2.4 Micropropagación

Cuando un inóculo con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables (balance hormonal apropiado) regenera un nuevo individuo. Murashige (1974) ha propuesto 3 pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación; 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo. (Roca, W. 1991).

Multiplicación

Es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*, en ella se define no sólo el número de plantas o propágulos a obtener, sino su calidad genética por ser esta fase en la que se producen las variantes somaclonales. (Roca, W. 1991).

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes (meristemos apicales o axilares, yemas axilares o adventicias), ya establecidos *in vitro*. (Roca, W. 1991).

Entre los métodos para lograr la multiplicación de propágulos *in vitro*, la proliferación de yemas axilares posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas y puede ser más fácilmente lograda en la mayoría de las especies. (Roca, W. 1991).

Cuidados en el manejo *in vitro*

Se requieren cambios en el manejo y manipulación de los explantes para lograr una adecuada tasa de proliferación, sin afectar las características morfogénicas de las plantas obtenidas en las primeras etapas de la multiplicación y obtener así, brotes de un tamaño adecuado para pasar a la fase de inducción y desarrollo de raíces. (Roca, W. 1991).

El manejo del explante no es el mismo cuando se utilizan medios en estado semisólido que en líquido. Para medio semisólido los explantes pueden ser más pequeños, generalmente brotes individuales inferiores a 10 mm; en medios de cultivo en estado líquido estáticos, los pequeños brotes no pueden ser individualizados y se requiere un manejo en forma de clusters (2 a 3 unidos) para evitar su muerte por inmersión o la elaboración de puentes de papel. (Roca, W. 1991).

Se deben tener ciertos criterios o factores en las condiciones *in vitro* que a partir de ensayos y experimentos debidamente evaluados tengan en cuenta los siguientes parámetros:

- Tiempo que media entre cada subcultivo.
- Habilidad de la especie para proliferar *in vitro*.

- Volumen interno, transparencia, capacidad de intercambio y forma del recipiente de cultivo.
- Estado físico, composición y cantidad del medio de cultivo en el recipiente.
- Dimensiones del explante inicial que se utiliza.
- Desarrollo foliar y hábito de crecimiento de las plantas de cada especie *in vitro*.
- Intensidad de luz disponible en las áreas de crecimiento.

La ausencia de valoración experimental de éstos parámetros, puede acarrear múltiples problemas; la densidad de explantes en el medio de cultivo ha sido muy poco estudiada y los criterios para establecer la misma se toman a veces de la experiencia práctica; una baja densidad ocasiona pérdida de espacio y medio de cultivo, subutilización de recipientes, demanda mayor capacidad de esterilización con la consiguiente elevación de los costos de materiales, energía y mano de obra, entre otros, mientras que ocasiona un crecimiento limitado de los propágulos e insuficiente proliferación, subcultivos más frecuentes, poco desarrollo de los brotes para ser transferidos a la fase de enraizamiento, etc. cuando la densidad es demasiado alta. (Roca, W. 1991).

Formación de órganos de reserva

La formación de órganos de reserva puede ser inducida en condiciones *in vitro*. La producción de órganos de reserva como microtubérculos, microbulbos y microcormos presenta ventajas sobre la producción de vitroplantas debido ha que hay menos dificultades en su transferencia a condiciones *ex vitro*, reduciéndose o eliminándose la fase de aclimatación de plantas, además de la posibilidad de almacenarlos en condiciones no asépticas. (Roca, W. 1991).

El proceso de tuberización *in vitro* está influenciado por una serie de factores en el medio de cultivo como la adición de reguladores de crecimiento, fundamentalmente citoquininas (6-BAP), la presencia de antigiberelinas (Cloruro de Clorocolina), aumento de la concentración de sacarosa (6-9%). (Roca, W. 1991).

También se manejan factores ambientales como la disminución de la temperatura (18-20°C) y fotoperíodos cortos u oscuridad completa. La formación de los microtubérculos toma alrededor de 8 a 10 semanas luego de colocadas las plantas en el medio y condiciones de inducción. (Tovar y col., 1985; Wang y HU, 1982).

2.2.5 Micropropagación de especies leñosas

Dentro de las especies leñosas, las más extensivamente estudiadas en los últimos años han sido las forestales y dentro de ellas las coníferas; por esa razón, las informaciones dadas se referirán a estudios sobre árboles maderables y forestales (Skirvin y Huges 1981).

La superficie mundial ocupada por los recursos forestales se estima entre 2500 a 2800 millones de hectáreas, lo que equivale a una cuarta parte de la superficie terrestre. No obstante, de continuar el mismo ritmo de explotación de los bosques sin reforestar las zonas taladas, esa superficie se reducirá en 70% en los próximos 50 años (Keays, 1974).

La propagación vegetativa ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles elite (Ivanova, 1981); sin embargo, se ha observado que las estacas pierden la capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Por otro lado, es necesario que los árboles usados como patrones sean lo suficientemente maduros para que expresen su potencial genético; asimismo, al emplear ramas maduras para el enraizamiento hay problemas de crecimiento plagiotrópico (Sweet, 1973).

Las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para la solución de algunos de los problemas anteriormente mencionados. El método de diferenciación de brotes adventicios es más común que la embriogénesis somática, y tiene mayor potencialidad para una propagación masiva que el estímulo de las yemas axilares. Actualmente no existen antecedentes que indiquen el éxito de la embriogénesis somática en especies forestales. (Keays, 1974).

La primera especie leñosa regenerada mediante el cultivo de tejidos vegetales fue *Populus tremuloides* a partir de callos (Winton, 1968); la primera gimnosperma fue *Pinus palustris* a partir de embriones. Con posterioridad a estas investigaciones pioneras, se han publicado diversos trabajos que señalan la regeneración de plantas por sistemas similares. (Sommer et al., 1975).

Los brotes adventicios se pueden producir a partir del explante directamente, o bien a partir del explante primario. Para fines de propagación, actualmente se prefiere producirlos directamente del explante, ya que a partir de callos su formación ha sido muy difícil y frecuentemente genera anomalías. En la diferenciación de brotes adventicios existe

una interrelación entre el explante, el medio y las condiciones ambientales de cultivo. (Sommer et al., 1975).

El explante es extremadamente importante; su influencia en el desarrollo *in vitro* ha sido demostrada. La edad del explante es un factor crítico en las especies forestales; en general, la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles, y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes y maduros. Sin embargo, aunque se haya delimitado la edad del material, el mejor explante se tiene que determinar experimentalmente. (Villalobos et al. , 1984).

Los factores físicos que se consideran son varios, siendo importante la forma física del medio; la humedad del medio y de su atmósfera gaseosa; la luz y la temperatura. (Villalobos et al. , 1984).

Los problemas más serios encontrados en la propagación de especies leñosas *in vitro* son la variación genética en las respuestas de regeneración y el proceso de maduración; estos dos problemas dificultan considerablemente la ejecución de sistemas prácticos de propagación de fenotipos seleccionados. Entre otros problemas están la formación de órganos y plantas aberrantes, la dificultad para erradicar las infecciones internas y la secreción de sustancias tóxicas como fenoles y sustancias volátiles.

2.2.6 Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.)

Descripción de la especie

Nombre científico:	<i>Weinmannia tomentosa</i> H. B. & K.
Nombre(s) común(es):	Encenillo, Roble Encenillo, Negrito, Pelotillo
Familia:	Cunnoniaceae
Género:	Weinmannia
Especie:	<i>tomentosa</i> H. B. & K.

Árbol heliófito, perennifolio, de 8 a 12 metros de altura. Ramificación primaria simpódica, sin presencia de exudados, corteza muerta fisurada a escamosa, de color gris. Copa irregular extendida, elevada, con ramas extendidas a erguidas, de forma recta a arqueada.

Follaje verde oscuro con tonalidades café, medianamente espeso, delgado y uniforme. Hojas compuestas, opuestas, decusadas, imparipinadas, de foliolos sésiles, elípticas, borde aserrado, con 11 a 15 por hoja, de 1 a 3 centímetros de largo por 0,7 a 1 centímetros de ancho, siendo el centro con ápice notoriamente acuminado, raquis alado y levemente curvado hacia el envés, textura maleable y color verde oscuro por el haz y verde claro por el envés, con pubescencia ferruginosa localizada principalmente sobre el envés en la nerviación primaria y secundaria. Pecíolos igualmente pubescentes, de tonalidad ferruginosa, de aproximadamente 0,5 centímetros de largo y de forma cilíndrica. Inflorescencia en racimos terminales, pendulares, entre 7 y 10 centímetros de largo, con flores blancas, de aproximadamente 0,3 a 0,5 centímetros de diámetro. Frutos en cápsula ovoide, de 0,3 a 0,4 centímetros de diámetro, color que pasa de verde a marrón en estado maduro, con varias semillas microscópicas de menos de 1 milímetro. Raíces medianamente profundas, de distribución irregular y ramificación secundaria gruesa. (Jardín Botánico JCM, 2005)

Distribución geográfica

Especie andina, que se localiza en las formaciones bosque muy húmedo Montano (bmh-M), bosque húmedo Montano Bajo (bh-M), bosque pre-Montano (bp-M) y bosque muy húmedo-Montano Bajo (bmh-MB), a alturas sobre el nivel del mar entre 1.600 y alcanzando los 3.600 m.s.n.m. En los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Santanderes y Quindío y en general en la zona andina colombiana. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Ecología

Se desarrolla naturalmente en climas caracterizados por una temperatura que oscila entre los 6 a 17°C y precipitaciones entre 1.200 y 3.000 mm/año. Crece en relieves quebrados y ondulados y en suelos caracterizados por poseer alto contenido de materia orgánica, con buena capacidad de retención de agua, lenta mineralización, pH bajo materia orgánica. Asociada a *Clusia*, *Quercus*, *Hesperomeles*, *Tibouchina*, *Miconia*, entre otros. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Recolección

Los frutos se recolectan cuando presentan una coloración marrón clara, iniciando su maduración, antes de la dehiscencia. Se depositan en bandejas para que posmaduren,

expuestos al ambiente. Las microsemillas se obtienen sacudiendo las pequeñas cápsulas. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Propagación

Las semillas pueden sembrarse con impurezas, directamente en un germinador previamente preparado con tierra finamente tamizada y desinfectadas, al voleo o en surcos distanciadas, las semillas son muy pequeñas por lo tanto se deben sembrar en chorrillo, se cubren con una delgada capa de sustrato tamizado y material vegetal, con el propósito de evitar la pérdida de humedad y el ataque de depredadores. Se obtiene una germinación de 20 a 50 % entre los 20 a 35 días. El trasplante se realiza cuando la plántula a alcanzado 3 a 5 centímetros o a los 4 meses. El crecimiento de la plántula debe realizarse a la sombra durante el primer año. También se puede propagar asexualmente por estacas. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Uso ecológico

Especie recomendada para la protección de cuencas hidrográficas, a lo largo de las riveras de los ríos como protección, en cotas elevadas. Además, sirve como cortinas rompevientos. Además aporta alimento a diferentes aves tales como: mirlas palomas y toches. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Uso económico

De su corteza se obtienen taninos destinados a la industria de curtiembre. La madera se puede utilizar para la elaboración de vigas y postes para cerca. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Uso medicinal

El cocimiento de sus hojas y corteza sirve para aliviar fiebres y hematomas en el ganado. (Jardín Botánico JCM, 2005).

2.2.7 Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.f)

Descripción de la especie

Nombre científico:	<i>Escallonia myrtilloides</i> Linn. f.
Nombre(s) común(es):	Pagoda, Tibar, Rodamonte, Chilco, Colorado, Cuasa
Familia:	Escalloniaceae.
Género:	Escallonia
Especie:	<i>myrtilloides</i> Linn. F

Árbol heliófita, perennifolio, de 5 a 7 metros de altura. Tronco tortuoso, ramificación simpódica; de corteza desprendible en escamas largas, color marrón rojizo; con disposición de ramas extendidas, sinuosas a tortuosas desde la base, con presencia de una sustancia pegajosa en ramas jóvenes. Copa aparasolada a arqueada, extendida y comprimida. Follaje verde oscuro, espeso, muy fino, distribuido uniformemente. Hojas simples, alternas, helicoidales, sesiles, formando ramilletes pequeños sobre la rama, de forma abovada, ápice redondeado y base simétrica, borde de aspecto entero microscópicamente aserrado, de 0,8 a 1,3 centímetros por 0,3 a 0,5 centímetros, de textura maleable, aspecto opaco y liso, color verde oscuro por el haz y verde muy claro por el envés. Flores en panícula insertadas en cada ramillete foliar, especialmente localizados en el tercio medio y basal de las ramas; flores poco vistosas de aproximadamente 0,8 a 1 centímetros de diámetro, color blanco verdoso a amarillentas, 5 carpelar y con cáliz persistente. Frutos en cápsula amarilla a marrón, de 0,4 a 0,6 centímetros de diámetro, con múltiples microsemillas. Raíces principal y secundarias profundas, tornuosas, de distribución lateral, extendidas y de amplia ramificación. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Distribución geográfica

Se distribuye a lo largo del sistema alto andino, en los departamentos de Antioquia, Caldas, Cauca, Valle, Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Putumayo; en las formaciones de bosque húmedo Montano Bajo (bh-MB) y bosque muy húmedo Montano Bajo (bmh-MB), a alturas entre los 2.500 y 3.500 m.s.n.m. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Ecología

Se desarrolla en climas caracterizados por una temperatura que varía entre los 11 y los 17°C y precipitaciones entre los 1.000 y 2.000 mm/año. En suelos de turberas, a orillas de pantanos y cuerpos de agua, de alta retención de humedad, ácidos y orgánicos; asociados a las especies propias de los bosques de niebla y subpáramos, propios de una topografía ondulada. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Recolección

Los frutos se colectan manualmente o utilizando tijeras o desjarretadora, tomándolos del árbol una vez han madurado y toman una coloración amarilla a marrón claro. Se deshidratan los frutos al sol, luego, se extraen las microsemillas. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Propagación

Las semillas se siembran en germinadores por chorrillos, cubriendo con una capa delgada de tierra finamente tamizada; se mantiene con riego frecuente, pero sin encharcamientos y con cobertura de material vegetal. Germina entre 10 y 15 días con un porcentaje de germinación variable ya que depende del árbol parental; cuando este es de regiones de páramo puede ser mayor que cuando es de zonas bajas. El trasplante a bolsa se realiza cuando la plántula tiene una altura entre 15 y 20 centímetros. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Además, existen trabajos de propagación *in vitro* con resultados satisfactorios. A partir de estaquillas y yemas terminales, con adiciones de fitorreguladores comerciales luego de 30 días, garantizando hasta un 80% de prendimiento. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Uso ecológicos

Especie utilizada con propósitos ornamentales en áreas abiertas, por la forma de su copa y delicado follaje. Además, como cerca viva o sombrío de vegetación de estratos menores. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Uso medicinal

El cocimiento de sus hojas es utilizado para calmar dolores reumáticos, afecciones bronquiales y pulmonares. (Jardín Botánico JCM, 2005).

Condiciones fitosanitarias y limitantes ambientales

Especie que no presenta graves problemas fitosanitarias en vivero, siempre que se mantengan los cuidados necesarios. Se han reportado ataques de chiza lo cual ha permitido realizar controles biológicos asperjando cepas de *Bacillus thuringiensis*. (Jardín Botánico JCM, 2005).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Propagación masiva

Es un conjunto de avances que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales y que hacen más eficiente la propagación *in vitro*. (Roca, W. 1991).

Nutrientes esenciales

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas, se deben incluir los microelementos (B, Zn, Cu, Mo, Fe, Cl); además, existe la evidencia que se debería añadir níquel en la lista (Eskew et al., 1984).

El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales cultivadas se debe considerar como un problema complejo, ya que muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos. (Sandstedt et al., 1960)

Giberelinas

Se sabe que hay varias giberelinas, relacionadas con el AG, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría. (Roca, W. 1991).

Oxidación fenólica

Las oxidaciones fenólicas pueden en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afectación en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte. Este fenómeno es más agudo en las especies leñosas. (Roca, W. 1991).

2.4 MARCO CONTEXTUAL

El Presente trabajo de grado, modalidad Pasantía se realizará en la ciudad de Bogotá, en el Jardín Botánico José Celestino Mutis (JCM).

Santa fe de Bogotá se encuentra en el centro del país, sobre la sabana de Bogotá al sur oriente de la misma, extensa altiplanicie de 383.000 Hectáreas de superficie localizada en la cordillera oriental a una altura de 2600 mts sobre el nivel del mar, a una latitud Norte de 4° 28'. Posee una precipitación anual media que oscila entre los 555 y 1301 mm. Limita por el norte con los municipios de Chía y Sopó, por el oriente con los municipios de la Calera, Choachí y Ubaque; por el sur con el municipio anexado de Usme, por el occidente con los municipios de Soacha, Mosquera, Funza y Cota (Consortio ESSERE, 1997).

Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis.

El Jardín Botánico de Bogotá JCM es un centro de investigación y desarrollo científico. En el se adelantan investigaciones para el conocimiento de la flora y fauna autóctona de la región, además se promueve la conservación de los recursos naturales mediante la realización de programas educativos y culturales. (Jardín Botánico de Bogotá JCM 2005).

La función del Jardín Botánico de Bogotá se encuentra en marcada dentro de la Agenda Internacional para la conservación en Jardines Botánicos y La Ley 299 de 1996, por medio de la cual todo jardín contribuye a la conservación de la flora en condiciones naturales (in-situ) y fuera del medio natural (ex-situ) , como es el caso de las colecciones de plantas vivas que mantiene cada jardín (Instituto Alexander von Humboldt, et. Al, 2001).

El Jardín está comprometido con la conservación de los ecosistemas Andinos y Paramunos del país, con énfasis en las especies amenazadas, las de importancia ecológica, cultural y

económica. En el ámbito urbano y rural trabaja en cooperación con otras entidades del Distrito Capital para el mejoramiento de la calidad de vida de los ciudadanos y reducción de las desigualdades entre las comunidades, por medio del desarrollo de programas de preservación de material vegetal (banco de semillas y plantular), restauración ecológica de áreas disturbadas, uso sostenible, arborización urbana, educación y capacitación. (Jardín Botánico de Bogotá JCM 2005).

Dentro del ámbito geográfico el Jardín Botánico establece los siguientes niveles de intervención:

Nivel de Intervención 1: Distrito Capital

Nivel de Intervención 2: Sabana de Bogotá

Nivel de Intervención 3: Cundinamarca en alturas mayores a los 2000 m

Nivel de Intervención 4: Colombia en alturas mayores a los 2000 m

Las colecciones del Jardín Botánico de Bogotá, son un grupo de plantas cultivadas con el propósito de contribuir en la conservación de la flora de los ecosistemas de las zonas andina y páramo, mediante actividades de investigación y educación.

Las colecciones de plantas del jardín se encuentran divididas en los siguientes temas:

- Colecciones de Botánica económica
- Colecciones sistemáticas de Gimnospermas y Angiospermas
- Colecciones especiales para la conservación
- Colecciones de ecosistemas andinos y paramunos
- Colecciones de ambientes de Selva Húmeda Tropical y Xerofítico
- Colección educativa sobre las formas biológicas de las plantas

El Jardín Botánico se encuentra dividido en tres subdirecciones principales:

- Subdirección Educativa y Cultural
- Subdirección Técnica y operativa

- Subdirección Científica, a la cual hace parte el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, lugar de ejecución del presente trabajo.

El jardín botánico presenta la siguiente ubicación:

- Latitud 4° 40' 24" N
- Longitud 74° 06' 14.5" WGr
- Altitud 2551 m.s.n.m
- Precipitación anual 713 mm
- Superficie 19.5 Hectáreas

Misión

El Jardín Botánico José Celestino Mutis, es el Centro de Investigación y desarrollo Científico del distrito capital, que contribuye al conocimiento, la conservación y el uso sostenible de la flora y su interrelación con la fauna asociada, en la ciudad y la región; promoviendo procesos educativos y participativos para generar una cultura en torno a la sostenibilidad ambiental. (Jardín Botánico de Bogotá JCM 2005).

Visión

El Jardín Botánico José Celestino Mutis, en el año 2014, será reconocido nacional e internacionalmente como un Centro de Investigación Científica, que aplica los resultados en beneficio social, logrando que la población aumente su capacidad de hacer uso sostenible de la diversidad vegetal, para mejorar la calidad de vida y generar opciones para alcanzar los beneficios del Desarrollo Humano Sostenible, de esta manera los habitantes valorarán la biodiversidad como un soporte para la vida y se comprometerán con las estrategias de conservación de la Flora. (Jardín Botánico de Bogotá JCM 2005).

El Jardín Botánico contará con:

- La mayor representatividad de la diversidad de la flora de los ecosistemas de las zonas andinas y páramo;
- Colecciones especializadas, que incluyen plantas trepadoras y colgantes, plantas exóticas, palmas, rosas, hierbas aromáticas y medicinales y frutales;

- Tres jardines evolutivos ordenados, correspondientes a criptógamas, gimnospermas y angiospermas;
- Un circuito de invernaderos, con muestras de alta calidad, representativas de la flora de los pisos térmicos inferiores a 2000 mts sobre el nivel del mar; y
- Jardines especiales.

El Jardín Botánico se consolidará como una de las entidades estratégicas en la gestión ambiental del Distrito Capital y el mejoramiento del ecosistema urbano, que contribuye a elevar la calidad de vida de todos los Bogotanos. Adelantará programas de investigación para la restauración en áreas alteradas en los diferentes ecosistemas del Distrito Capital y de conservación de la flora andina y especies amenazadas. Será promotor de una conciencia ecológica favorable al conocimiento, valoración y uso sostenible de la flora. (Jardín Botánico de Bogotá JCM 2005).

Objetivos Estratégicos del Jardín Botánico

- Determinar el patrimonio florístico del Distrito Capital
- Adelantar investigaciones que den como resultado modelos para: La preservación y restauración de los ecosistemas de estas zonas, la protección, propagación y reintroducción de las especies amenazadas y el aprovechamiento económico sostenible de las especies vegetales
- Mantener y preservar en sus predios las especies de plantas del bosque andino y el páramo.
- Implementar tecnologías limpias en la operación y mantenimiento del Jardín y en la ejecución de los proyectos.
- Consolidar en el Jardín Botánico toda la documentación relacionada con la flora del bosque andino y el páramo de manera que se convierta en la fuente de información más completa y confiable sobre este tema.
- Promover la participación de las comunidades en el desarrollo de los programas adelantados por el Jardín.
- Lograr un nivel de excelencia en la atención a los visitantes del Jardín.
Promover y asegurar y desarrollo humano y profesional de nuestros colaboradores.
Aumentar y mantener la arborización urbana.

Subdirección Científica

La Subdirección Científica depende de la Dirección. Sus funciones son:

- Asesorar a la Dirección del Jardín Botánico en la definición y establecimiento de políticas, planes y programas de investigación en el campo de la flora y los ecosistemas.
- Recomendar los criterios y directrices que orienten las investigaciones científicas en el Jardín Botánico. Velar por su desarrollo.
- Dirigir y responder por las investigaciones en materia de botánica sistemática, económica y aplicada, fisiología, entomología y sanidad vegetal, ecología y biodiversidad y demás que realice el Jardín Botánico, directamente o mediante convenios de cooperación.
- Velar por la conservación de la diversidad biológica y la preservación de los recursos genéticos existentes en el Jardín Botánico, en especial de las especies en peligro de extinción, en coordinación con la Subdirección Técnica y Operativa.
- Proponer criterios que sirvan para definir políticas en biodiversidad, biotecnología, bioética y en áreas relacionadas con la misión institucional del Jardín Botánico.
- Asesorar a la Dirección en la formulación de políticas y definición de criterios para desarrollar convenios nacionales e internacionales en el campo de la investigación y el intercambio de material genético.
- Coordinar la ejecución de los proyectos de investigación resultantes de convenios de cooperación nacional e internacional.
- Realizar, en coordinación con la Subdirección Técnica Operativa, la identificación de ecosistemas estratégicos del bosque andino y páramo y propender por su conservación.
- Dirigir y coordinar el desarrollo de la colección de especies de la flora nativa colombiana y de especies exóticas.
- Establecer registros de accesión del material vegetal que ingrese al Jardín Botánico, realizar las observaciones y análisis y suministrar la información pertinente a las otras dependencias.
- Dirigir y coordinar la atención de visitas y consultas de carácter científico.

- Coordinar con las demás dependencias del Jardín Botánico la publicación y divulgación de los resultados de las investigaciones realizadas y de temas que contribuyan a la educación y cultura ciudadana.
- Responder por la demarcación individual de las plantas de acuerdo con su clasificación taxonómica y con el número de registro interno.
- Armonizar la clasificación taxonómica de las plantas del Jardín Botánico con el modelo de señalización e interpretación adoptadas.
- Preparar y mantener actualizado el Index Seminun en coordinación con la Subdirección Técnica y Operativa.
- Responder por el funcionamiento de la estación meteorológica y el uso de sus resultados en los programas de investigación.
- Responder por el manejo y actualización del Sistema de Información Geográfica que requiera el Jardín Botánico.
- Dirigir, coordinar y evaluar los programas de capacitación científica que desarrolle el Jardín Botánico en el marco de la Agenda Cultural.
- Velar por el mantenimiento de las áreas e infraestructura donde se ejecutan los proyectos de investigación científica.
- Elaborar, ejecutar, hacer seguimiento y evaluar el Plan Anual de Acción de la subdirección.
- Las demás que le asigne el Director.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

Forma parte de la Subdirección Científica. Los objetivos del laboratorio son los siguientes:

- Establecer protocolos de las diferentes fases de laboratorio con el fin de ser publicados como investigación básica y aplicada, y liderar los estudios en Cultivo de Tejidos Vegetales en especies alto andinas; ya que éste tipo de investigación no ha sido ampliamente estudiado en Colombia ni en el exterior; y los laboratorios existentes si son de carácter particular, obedecen a explotaciones de especies comerciales; y los estatales tienen un carácter de fitomejoramiento e investigación en cultivos agronómicos papa, arroz, plátano y otros, y por último los laboratorios

de instituciones de educación donde las investigaciones están dispersas en cualquiera de la especies que ocasionalmente se trabajan

- Obtención de plantas libres de virus y otros patógenos. En los procesos de laboratorio se exigen condiciones de muy alta asepsia, garantizando de ésta forma la producción de material vegetal de alta calidad fitosanitaria, que más tarde redundará en plantas adultas en campo, con mayores posibilidades de sobrevivencia.
- Estudiar procesos fisiológicos de crecimiento, desarrollo, diferenciación, absorción y nutrición de una forma más directa, cuando éstos procesos son difíciles de detectar por la metodología tradicional y de igual manera su cuantificación y evaluación (Pacheco, 2001).

2.5 MARCO LEGAL

Constitución Política de Colombia 1991

Art.27. El estado garantiza las libertades de enseñanza, investigación y cátedra.

Art.67. La educación es un derecho de la persona y un servicio público que tiene una función social: con ella se busca el acceso al conocimiento, a la ciencia, a la técnica y a los demás bienes y valores de la cultura.

Art.69. Consagra la autoría universitaria, la cual es reglamentada por la ley 30 del 28 de Diciembre de 1982. (Art.3).

Ley 299 del 26 de Julio de1996

Por la cual se protege la flora colombiana, se reglamentan los jardines botánicos y se dictan otras disposiciones. El congreso de Colombia decreta:

Art.1. La Flora Colombiana. La conservación, la protección, la propagación, la investigación, el conocimiento y el uso sostenible de los recursos de la flora colombiana son estratégicos para el país y constituyen prioridad dentro de la política ambiental. Son de interés público y beneficio Social y tendrán prelación en la asignación de recursos en los

planes y programas de desarrollo y en el presupuesto general de la nación y en los presupuestos de las entidades territoriales y de las Corporaciones autónomas regionales.

Art. 2. Los Jardines Botánicos. Los jardines botánicos, como colecciones de plantas vivas científicamente organizadas, constituidos conforme a esta ley, podrán manejar herbarios y germoplasma vegetal en bancos de genes o en bancos de semillas; deberán ejecutar programas permanentes de inversión básica y aplicada, de conservación ex situ y in situ, y de educación, utilizarán para sus actividades tecnológicas no contaminantes y deberán adoptar los siguientes propósitos primordiales para el cumplimiento de sus objetivos sociales: a) Mantener los procesos ecológicos esenciales, como los sistemas que soportan las diferentes manifestaciones de la vida b) Preservar la diversidad genética c) Contribuir de manera efectiva y permanente a través de su labor investigativa y divulgativa al desarrollo regional y nacional d) Contribuir a que la utilización de las especies de la flora y de los ecosistemas naturales se efectúen de tal manera que permita su uso y disfrute no sólo para las actuales sino también para las futuras generaciones de habitantes del territorio Colombiano, dentro del concepto de desarrollo sostenible.

Parágrafo. La conservación in situ se refiere a la que se efectúa en el sitio donde es nativa la especie.

Art.3. Participación Estatal. De conformidad con el artículo 103 de la constitución política, el Estado, en los niveles municipal, departamental y nacional, contribuirá a la creación, organización, promoción y fortalecimiento de los jardines botánicos fundados y estructurados como entidades estatales, en todas sus modalidades, o como asociaciones privadas sin ánimo de lucro. El gobierno reglamentará la forma de participación del Estado en los planes, programas y proyectos de interés público que adelantan tales entidades.

Art.4. Licencia de Funcionamiento. Para tener derecho a los beneficios, estímulos y prerrogativas contempladas en ésta ley, los jardines botánicos, requerirán de un permiso expedido por la autoridad ambiental, previo concepto del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Adicionalmente deberán obtener la correspondiente licencia de funcionamiento, por parte de la entidad correspondiente, conforme al reglamento que expida el gobierno nacional. En todo caso, para el otorgamiento de la licencia de funcionamiento la entidad respectiva deberá solicitar concepto previo de la Red Nacional de Jardines Botánicos de Colombia. Una vez otorgada la personería jurídica, los jardines botánicos dispondrán de un plazo improrrogable de seis meses para presentar ante la autoridad que la otorgó, copia del acto administrativo que concede la licencia de funcionamiento pena de cancelación automática de su personería. La constancia de vigencia de la licencia de funcionamiento para los jardines botánicos será requisito sine qua non la aprobación de reformas estatutarias para la inscripción de directivos o dignatarios de tales entidades.

Parágrafo transitorio. Los jardines botánicos actualmente en funcionamiento dispondrán de un término de seis meses, contados a partir de la fecha del decreto reglamentario a que se refiere el inciso primero de este artículo, para adecuar los objetivos y actividades de la entidad a lo establecido en ésta ley.

Art.5. La Red Nacional de Jardines Botánicos. La red nacional de jardines botánicos de Colombia estará integrada por los jardines botánicos legalmente reconocidos y funcionará como consejo asesor y como cuerpo constitutivo del gobierno.

Art.6. Participación en el Sistema Nacional Ambiental. Los jardines botánicos legalmente constituidos forman parte del sistema nacional ambiental, SINA.

Art.7. Plan Nacional de Jardines Botánicos. El ministerio del medio ambiente, sus institutos de investigación adscritos o vinculados y las corporaciones autónomas regionales en el año siguiente a la entrada en vigencia de la presente ley, de manera concertada con la Red Nacional de Jardines Botánicos de Colombia y con las entidades oficiales o privadas que manejen bancos genéticos, formularán un Plan Nacional de Jardines Botánicos y Bancos de Germoplasma

El plan se someterá a un proceso de evaluación y ajuste cada dos años y en él se indicarán los recursos del tesoro público que con destino a establecimientos públicos deberán asignarse para la ejecución de sus actividades y los responsables de llevarlas a cabo se someterá, por intermedio del Ministerio de Medio Ambiente a consideración de las respectivas autoridades nacionales de planificación, de conformidad con lo previsto en los artículos 8, 13 y siguientes de la ley 152 de 1994. El plan deberá incluir las prioridades de investigación, conservación in situ, conservación ex situ nativas y exóticas de excepcional valor científico o conocimiento de las especies amenazadas de extinción y deberán contemplar los programas y proyectos de educación ambiental, divulgación y ecoturismo.

Art.8. Sistema Nacional de Información Botánica. Habrá un Sistema Nacional de Información Botánica, que funcionará bajo la responsabilidad del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt y en el cual se llevará el registro de las colecciones de plantas vivas de los jardines botánicos y de los bancos de germoplasma, y de plantas secas de los herbarios que operen en Colombia. Estas entidades aportarán a éste Instituto, previo convenio, la información de sus inventarios florísticos. El Sistema Nacional de Información Botánica informará parte del Sistema de Información ambiental.

Art.9. Colaboración en la Convención Cites. Los jardines botánicos participarán como entidades asesoras del gobierno para el adecuado cumplimiento de la convención CITES,

mediante el suministro de documentación y la cooperación con la autoridad Colombiana encargada del manejo de la Convención, especialmente en la recepción del material botánico vivo decomisado o confiscado y en la propagación de ejemplares de la especies amenazadas de extinción prematura. Los jardines botánicos asesorarán a los organismos competentes del Estado en relación con el desarrollo y cumplimiento de otros convenios e instrumentos internacionales sobre conservación de la biota Colombiana.

Decisión 345 de 1993 del Pacto Andino

Art.26. Derechos de obtentor en Colombia. Establece que no lesiona el derecho de obtentor quien reserve y siembre para su propio uso, o venda como materia prima o alimento el producto obtenido del cultivo de la variedad obtenida.

Ley 165 de 1994

En cuanto a la normatividad que respalda este proyecto en el ámbito mundial, los Jardines Botánicos cumplen funciones relacionadas con los Artículos del Convenio sobre Diversidad Biológica de las Naciones Unidas que tienen que ver con el uso sostenible así:

Art. 6. Medidas Generales para la conservación y uso sostenible.

Cada parte contratante, con arreglo a sus condiciones y capacidades particulares:

- a) Elaborará estrategias, planes o programas nacionales para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica o adaptará para ese fin las estrategias, planes o programas existentes, que habrán de reflejar, entre otras cosas, las medidas establecidas en el presente Convenio que sean pertinentes para la Parte Contratante interesada; y
- b) Integrará, en la medida de lo posible y según proceda, la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica en los planes, programas y políticas sectoriales o intersectoriales.

Art. 8. Conservación *in situ*.

Cada Parte Contratante, en la medida de lo posible y según proceda:

- a) Establecerá un sistema de áreas protegidas o áreas donde haya que tomar medidas especiales para conservar la diversidad biológica

- b) Cuando sea necesario, elaborará directrices para la selección, el establecimiento y la ordenación de áreas protegidas o áreas donde haya que tomar medidas especiales para conservar la diversidad biológica

- c) Reglamentará o administrará los recursos biológicos importantes para la conservación de la diversidad biológica, ya sea dentro o fuera de las áreas protegidas, para garantizar su conservación y utilización sostenible

- d) Promoverá la protección de ecosistemas y hábitats naturales y el mantenimiento de poblaciones viables de especies en entornos naturales

- e) Promoverá un desarrollo ambientalmente adecuado y sostenible en zonas adyacentes a áreas protegidas, con miras a aumentar la protección de esas zonas

- f) Rehabilitará y restaurará ecosistemas degradados y promoverá la recuperación de especies amenazadas, entre otras cosas mediante la elaboración y la aplicación de planes u otras estrategias de ordenación

- g) Establecerá o mantendrá medios para regular, administrar o controlar los riesgos derivados de la utilización y la liberación de organismos vivos modificados como resultado de la biotecnología que es probable tengan repercusiones ambientales adversas que puedan afectar a la conservación y a la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana

- h) Impedirá que se introduzcan, controlará o erradicará las especies exóticas que amenacen a ecosistemas, hábitats o especies

- i) Procurará establecer las condiciones necesarias para armonizar las utilidades actuales con la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus componentes

j) Con arreglo a su legislación nacional, respetará, preservará y mantendrá los conocimientos, las innovaciones y las prácticas de las comunidades indígenas y locales que entrañen estilos tradicionales de vida pertinentes para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica y promoverá su aplicación más amplia, con la aprobación y la participación de quienes posean esos conocimientos, innovaciones y prácticas, y fomentará que los beneficios derivados de la utilización de esos conocimientos, innovaciones y prácticas se compartan equitativamente

k) Establecerá o mantendrá la legislación necesaria y/u otras disposiciones de reglamentación para la protección de especies y poblaciones amenazadas

l) Cuando se haya determinado, de conformidad con el artículo 7o., un efecto adverso importante para la diversidad biológica, reglamentará u ordenará los procesos y categorías de actividades pertinentes

m) Cooperará en el suministro de apoyo financiero y de otra naturaleza para la conservación in situ a que se refieren los apartados a) a l) de este artículo, particularmente a países en desarrollo.

Art. 10. Uso sostenible de los componentes de la diversidad Biológica.

Cada Parte Contratante, en la medida de lo posible y según proceda:

a) Integrará el examen de la conservación y la utilización sostenible de los recursos biológicos en los procesos nacionales de adopción de decisiones;

b) Adoptará medidas relativas a la utilización de los recursos biológicos para evitar o reducir al mínimo los efectos adversos para la diversidad biológica;

c) Protegerá y alentará la utilización consuetudinaria de los recursos biológicos, de conformidad con las prácticas culturales tradicionales que sean compatibles con las exigencias de la conservación o de la utilización sostenible;

d) Prestará ayuda a las poblaciones locales para preparar y aplicar medidas correctivas en las zonas degradadas donde la diversidad biológica se ha reducido; y

e) Fomentará la cooperación entre sus autoridades gubernamentales y su sector privado en la elaboración de métodos para la utilización sostenible de los recursos biológicos.

Para Colombia, el tercer lineamiento del Plan Estratégico de los Jardines Botánicos de Colombia define: “Promover las actividades de investigación sobre la flora colombiana, con énfasis en biología reproductiva de especies amenazadas y especies de importancia cultural y económica.”

3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de grado, modalidad Tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Jardín Botánico JCM en la ciudad de Bogotá,

Las variables dependientes o independientes evaluadas se definieron de la siguiente manera para una mejor claridad del tema:

CONTAMINACIÓN: Variable dependiente; expresada por el porcentaje de contaminación (presencia de hongos y/o bacterias) obtenido en cada tratamiento evaluado. Encontramos dos tipos: contaminación superficial; es aquella que esta asociada al explante expresándose a partir de éste al medio de cultivo y contaminación exógena es la que esta asociada a condiciones ambientales y técnicas de trabajo inadecuadas como una mala manipulación de los explantes ya sea en su desinfección o su siembra; se expresa a partir del medio de cultivo hacia el explante. Tratada con ácido Hipocloroso a diferentes concentraciones.

GRADO DE FENOLIZACION: Variable dependiente, es un fenómeno de tipo bioquímico que interfiere con el normal desarrollo de los explantes inoculados en los medios de cultivo, el explante presenta un oscurecimiento en su totalidad y alrededores del medio donde se encuentra sembrado, debido a la excreción de sustancias como polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación *in vitro* crean oxidación, y se mide en términos porcentuales, tratada con ácido ascórbico a 200ppm y carbón activado 2gr/Lt.

FORMACION DE HOJAS, TALLOS Y RAICES: Se mide el desarrollo de los órganos de los explantes como las hojas, el tallo y las raíces, en términos numéricos se mide su formación y consistencia.

La evaluación de las variables cualitativas y cuantitativas se realizó semanalmente después de la siembra de los explantes en el medio de cultivo, llenando la ficha correspondiente para cada tratamiento.

La evaluación estadística se realizó por medio de datos que están tabulados en gráficos de barras con sus respectivos porcentajes.

3.1 MATERIALES

En el desarrollo del presente trabajo de grado, se usó como material vegetal parental, yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y semillas tanto de Encenillo como de Rodamonte, recolectados de la colección, ambiente de páramo del Jardín Botánico JCM.

El material vegetal a trabajar fue tomado de árboles seleccionados al azar de Encenillo y de Rodamonte, tanto jóvenes para el caso de yemas, segmentos nodales y láminas foliares como adultos para el caso de semillas.

El suministro de reactivos, como sales minerales, agar, sucrosa, antioxidantes, fitohormonas; desinfectantes como ácido Hipocloroso, alcohol etílico; soluciones jabonosas, y la disponibilidad de equipos (cámara de flujo laminar, autoclaves, estereoscopio, etc.) y vidriería estuvo apoyada por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente a la Subdirección Científica del Jardín Botánico JCM.

3.2 METODOS

El tipo de investigación aplicado al presente trabajo es experimental; porque el desarrollo del proyecto se basa en pruebas de laboratorio exclusivamente, el material del que se dispone se tomó de árboles escogidos al azar de ambas especies leñosas.

El proyecto se describe en dos fases de tipo general, una fase de campo y otra de laboratorio, que se describen a continuación:

3.2.1 Fase de campo. Consistió en la identificación y la recolección del material vegetal (explantos), ubicado en el ambiente de páramo del Jardín Botánico, tomando árboles seleccionados al azar con esquejes jóvenes, para el caso de yemas, segmentos nodales y secciones foliares, y árboles adultos, para la recolección de semillas en ambas especies.

3.2.2 Fase de laboratorio. Se llevó a cabo en 3 fases diferentes que se describen de la siguiente manera:

- Preparación de medios de cultivo
- Desinfección del material vegetal

- Siembra de explantes e incubación y estudio del material vegetal.

3.2.2.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Se preparó el medio Smagula y Lyrenne, 1984 (WPM) sin fitorreguladores, con 2 g/L de carbón activado, 5 g/L de agar y 15 g/L de sucrosa, el pH se ajustó a 5.8, se procedió a esterilizar en autoclave a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (15lb/in²) a una temperatura de vapor aproximada de 121.5 °C durante 15 minutos.

Tabla 1. Medio de cultivo Smagula y Lyrene WPM.

Medio Básico. Smagula & Lyrene (WPM) (1984)

SALES	CONCENTRACION EN mg/l
NH ₄ NO ₃	400
KI	0.83
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	552
K ₂ SO ₄	993
H ₃ BO ₃	6.2
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.81
Na ₂ EDTA	37.31
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .H ₂ O	16.896
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .	0.16

Se elaboró el medio de cultivo en dos tratamientos, uno sin fitoreguladores para superar la fase de desinfección de los explantes utilizados como yemas axilares, láminas foliares, segmentos nodales, puntas radiculares y semillas; y otro tratamiento con GA₃ a una concentración de 1mg/L, para inducción de germinación de las semillas.

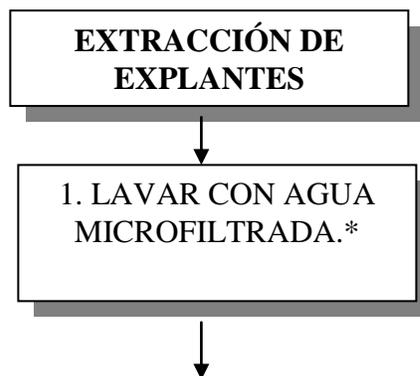
3.2.2.2 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES.

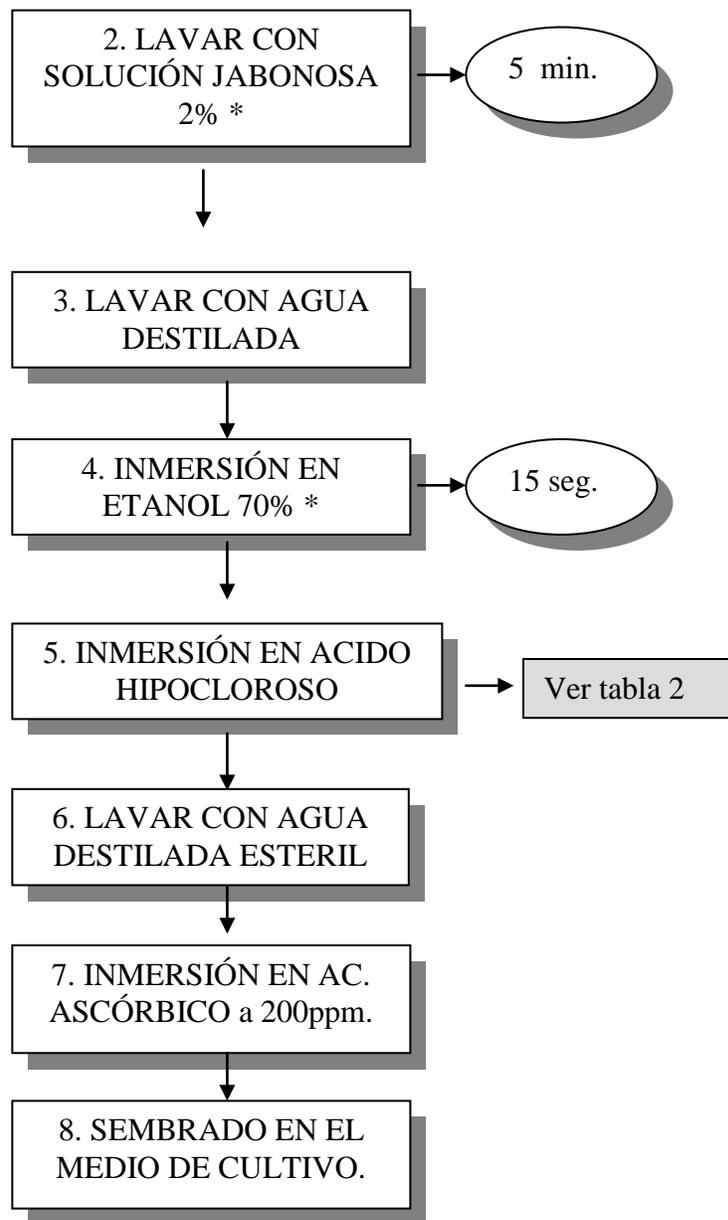
Se realizaron varios tratamientos de desinfección teniendo como base el Acido Hipocloroso en diferentes concentraciones y tiempos. Concentraciones de 0,05% a 1% y tiempos de 3, 5, 7 y 10 minutos.

Una vez tomado el material vegetal, se trasladó al laboratorio donde se clasificó y separó para realizar la etapa de desinfección, para segmentos nodales, fueron removidas unas hojas dejando al descubierto el segmento a utilizar; para láminas foliares, se clasificaron las hojas más jóvenes y tiernas; para yemas, se tomaron las partes más frescas y sensibles del material vegetal, las raíces se extrajeron directamente de campo; y las semillas se tomaron de distinta caracterización de los frutos correspondientes a cada especie.

A continuación se describe el proceso de desinfección general de los explantes de cada una de las especies trabajadas, con sus respectivos tiempos y concentraciones utilizadas en el proceso, creando un diseño adecuado para el establecimiento de explantes de Encenillo y Rodamonte *in vitro* libres de patógenos (hongos y bacterias). El tiempo adecuado y las concentraciones del desinfectante utilizado en el proceso de desinfección se encuentran en la tabla 2.

Figura 1. Diseño para la estandarización del protocolo de desinfección con **ácido hipocloroso** para cada una de las especies de Encenillo y Rodamonte.





* El agua microfiltrada se utilizó como base del inicio de desinfección (agua desionizada).

*La solución Jabonosa al 2%; se empleó como una solución desinfectante inicial para remover impurezas externas del explante.

* El alcohol, se empleó al 70 % sumergiendo el material vegetal durante un tiempo de 15 segundos. El agua estéril se utiliza para retirar residuos de productos desinfectantes y es

estéril para evitar contaminación de microorganismos presentes en el agua normal o potable.

En la tabla 2 se encuentran 44 tratamientos que se realizaron para determinar el mejor tratamiento en el proceso de desinfección, se muestra el tiempo de exposición al desinfectante y las concentraciones que se utilizaron.

Tabla 2. Ensayo de desinfección con Acido Hipocloroso.

% Ac. Hipocloroso	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Tiempo (minutos)											
3	P1	P5	P9	P13	P17	P21	P25	P29	P33	P37	P41
5	P2	P6	P10	P14	P18	P22	P26	P30	P34	P38	P42
7	P3	P7	P11	P15	P19	P23	P27	P31	P35	P39	P43
10	P4	P8	P12	P16	P20	P24	P28	P32	P36	P40	P44

3.2.2.2.1 DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DE ENCENILLO.

Para los explantes utilizados en los ensayos de desinfección como yemas axilares, láminas foliares, segmentos nodales, puntas radiculares y semillas, se realizaron diversos tratamientos (**P**) descritos en la tabla 2, no se utilizaron sustancias fungicidas ni bactericidas debido al nuevo producto que se usó (ácido Hipocloroso), que los reemplazaba en su totalidad por sus propiedades desinfectantes.

DESINFECCIÓN DE YEMAS AXILARES.

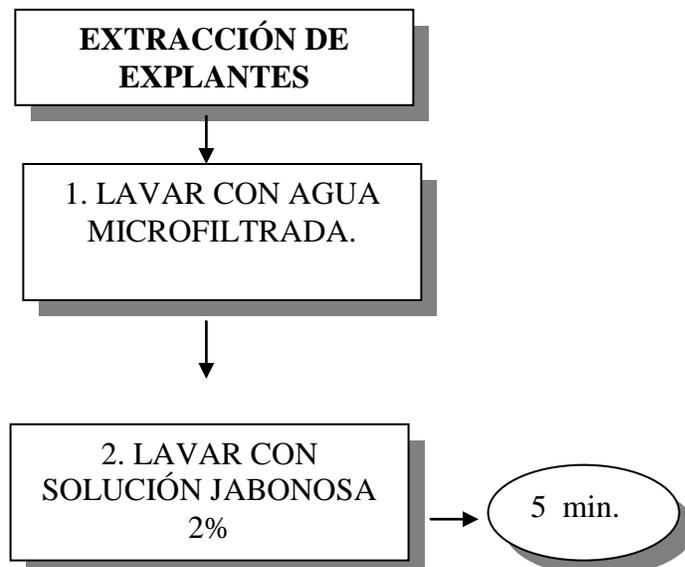


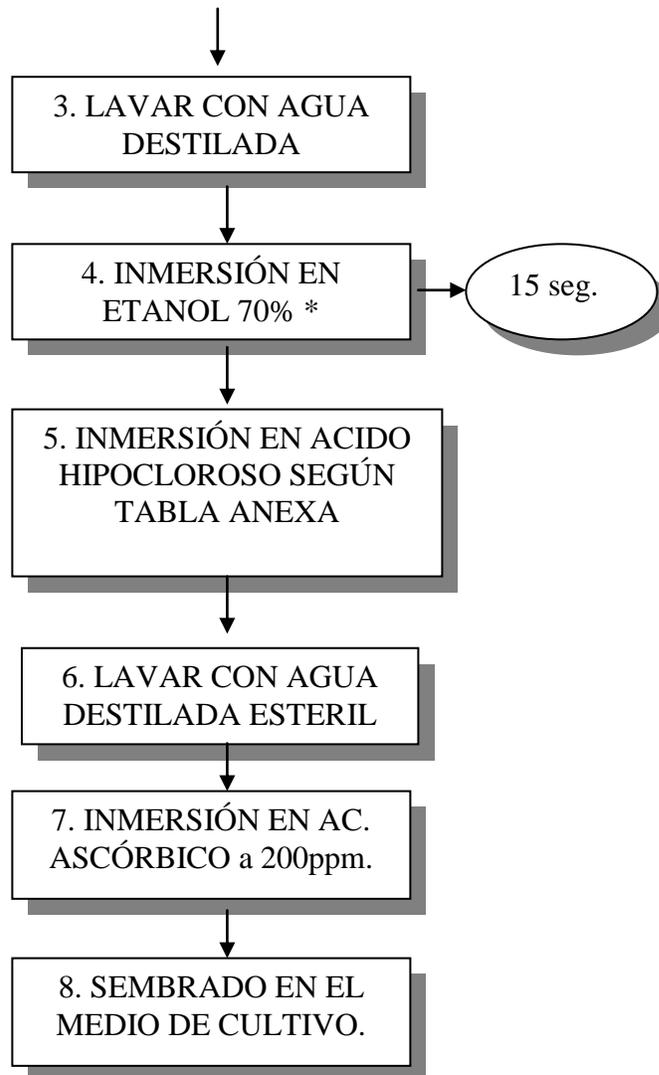
Estos explantes presentaban un tamaño de 4 mm de largos, se extrajeron las yemas axilares una vez hecha la desinfección del segmento que las contenía. Se realizaron 20 tratamientos de desinfección con tiempos de 3, 5, 7 y 10 min. Y concentraciones de ac. Hipocloroso de 0,05 hasta 0,4%. En este paso se extrajeron meristemos de Encenillo.

El ácido Hipocloroso al 0,05%; se preparó a partir de un producto granulado de una concentración del 91% de cloro; se agregó 0,05 gr de este producto granulado en 100 ml de agua estéril, para obtener la concentración deseada (0,05%).

Tratamientos del 1 hasta el 20: Las yemas se desinfectaron con ac. Hipocloroso al 0,05; al 0,1%; al 0,2%; al 0,3%; y al 0,4%; expuestas por tiempos de 3, 5, 7 y 10 minutos por cada concentración, posterior a esto, se lavaron y sumergieron en ácido ascórbico a 200ppm y se procedió a su siembra en la cabina de flujo laminar.

Figura 2. Proceso de desinfección de yemas.





SEGMENTOS NODALES.



El tamaño de estos explantes es de 8 mm de largo, tomándose los entrenudos más jóvenes y poco leñosos para la siembra. Se sometieron a 20 tratamientos de desinfección, empleándose tiempos de 3, 5, 7 y 10 minutos y concentraciones de ácido Hipocloroso de 0,05% hasta 0,4%.

Tratamiento del 1 al 20: Transcurrido el proceso de desinfección, los segmentos nodales se desinfectaron con ácido Hipocloroso del 0,05% hasta el 0,4% expuestos por tiempos de 3, 5, 7 y 10 minutos a estas concentraciones, se sumergieron en ácido ascórbico a 200ppm y se procedió a su siembra en la cabina de flujo laminar.

LÁMINAS FOLIARES



Estos explantes presentaban un tamaño entre 1 y 1,5 cm de largo. Al extraer el material vegetal utilizado, se trató con los mismos requerimientos de los demás explantes para su desinfección, resultando 20 tratamientos que manejaban parámetros de exposición al ácido Hipocloroso de 0,05 hasta 0,4%; y tiempos de inmersión de 3, 5, 7 y 10 minutos. Una vez realizado el proceso de desinfección, se procedió a hacer un corte de las hojas y de las puntas radiculares de Encenillo en secciones pequeñas en la cabina de flujo laminar, eliminando los extremos de las mismas y continuando con la siembra inmediata.

SEMILLAS.

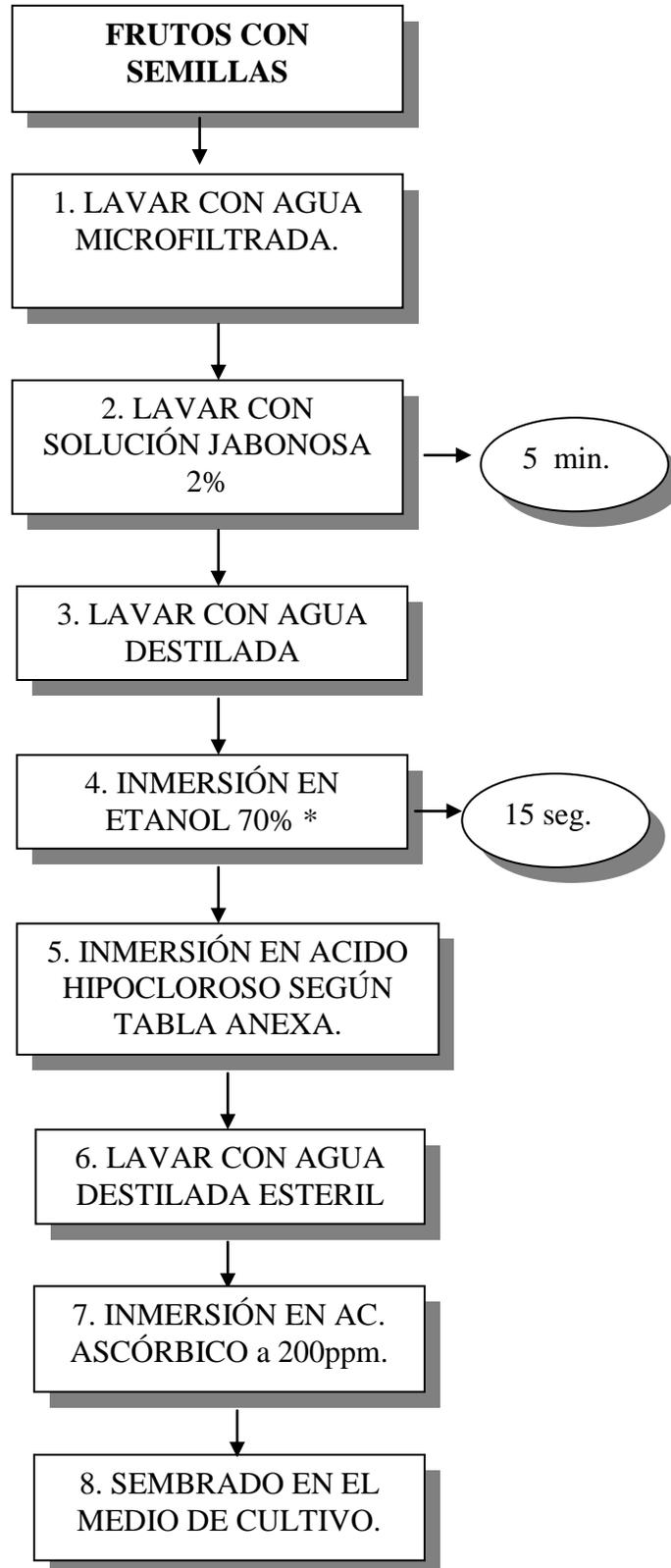


El tamaño de estos explantes es de 1mm de diámetro, con pelos adventicios que sirven como un mecanismo de absorción de agua y transporte. Se extrajeron frutos o cápsulas de árboles adultos, que contenían las semillas, se clasificaron de acuerdo a su estado de maduración.

Para la siembra de las semillas en *in vitro*; la desinfección se llevó a cabo en 24 tratamientos que inician desde el P21 hasta el P44, concentraciones de ácido Hipocloroso de 0,5 hasta 1,0%, y tiempos de 3, 5, 7 y 10 minutos.

Tratamiento del 21 hasta el 44: En el proceso de desinfección, se llevan a cabo, tratamientos con ácido Hipocloroso del 0,5% hasta el 1% en tiempos de exposición al ácido de 3, 5, 7 y 10 minutos. Al terminar la inmersión los explantes (Frutos) son enjuagados con agua estéril y finaliza el procedimiento agregándolos en ácido Ascórbico a 200ppm, para luego llevarlos a cabina y proceder con la siembra. El esquema de este proceso se ilustra a continuación:

Figura 3. Proceso de desinfección de frutos con semillas.



3.2.2.3 SIEMBRA DE EXPLANTES DE ENCENILLO EN MEDIO DE CULTIVO.

Los explantes utilizados como yemas axilares, láminas foliares, segmentos nodales y puntas radiculares, se sembraron en el medio de cultivo WPM, sin fitorreguladores y con carbón activado 2gr/Lt; aclarando que al medio de cultivo no se le adicionó ningún fungicida ni bactericida para prevenir la contaminación.

La siembra en cabina de las semillas se realizó de la siguiente manera, al tener los frutos desinfectados, se procede a hacerles un corte longitudinal para que quede dividido en dos secciones, cada sección contiene alrededor de 6 microsemillas, de las cuales el 50% son aptas para sembrar y germinar en condiciones *in vitro*, se toma una sección y se procede a realizar un corte transversal para exponer las semillas y hacer más fácil la siembra en el medio de cultivo. Se siembra semilla por semilla hasta completar el proceso, el frasco es sellado herméticamente y rotulado. Las semillas se sembraron en 2 tratamientos, un tratamiento con WPM sin fitorreguladores y otro tratamiento con GA₃, a una concentración de 1 mg/Lt, para verificar el mejor proceso germinativo y desarrollo del explante, la cantidad de explantes sembrados con todos los tratamientos fue de 768 (Ver foto 1).

Foto 1. Banco de germoplasma de Encenillo y Rodamonte.



3.2.2.4 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DE ENCENILLO A TRAVÉS DE LAS FASES DE MADURACIÓN DE SUS FRUTOS.

El estudio se realizó debido a la falta de información detallada que se requería para la siembra en condiciones *in vitro* de este tipo de material vegetal, los frutos que se tomaron para el diagnóstico fueron de un árbol adulto y en etapa de maduración (ver foto 2); se caracterizaron varios parámetros físicos del fruto, como su tamaño, color, forma, peso y consistencia. El estudio se aplicó tomando 3 muestras en distintas fases de maduración.

Foto 2. Inflorescencias en racimos. Fruto bivalvo con semillas ciliadas de Encenillo.



Cada fruto que se tomó se caracterizó por su color con la ayuda de la tabla de colores de tejidos vegetales Munsell, aplicando el resultado para definir el tipo de fruto. Una vez definido el fruto, se procedió a registrar otras características como el tamaño, el peso y la consistencia de cada uno. Definido estos pasos, sigue la inspección interna del fruto con la ayuda de un estereoscopio para verificar la cantidad, el tamaño y la forma de las semillas que posiblemente serán sembradas en un medio de cultivo.

FASE 1. FRUTO INMADURO.

Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto de Encenillo en esta fase es: GY6/6.

Foto 3. FRUTO 1. Fruto inmaduro de Encenillo.



Su longitud es de 5 mm de largo por 2mm de ancho y un peso aproximado de 9,5mg.; posee una consistencia gruesa, es duro, y con diminutos tricomas o pelos a su alrededor que le permiten tanto protección como sostenimiento. Su manipulación con instrumentos de laboratorio es muy tediosa y complicada. Normalmente contiene en su interior entre 16 a 20 microsemillas inmaduras de color blancuzco. (Ver foto 4).

Foto 4. Fruto 1 dividido en dos secciones



Este fruto es inmaduro y sus semillas se encuentran en estado de desarrollo morfofenético, es muy hidratado, con una nervadura en el medio de cada sección que permite abrirlo y sacar sus semillas.

FASE 2. FRUTO EN PROCESO DE MADURACIÓN

Foto 5. FRUTO 2 en fase de maduración.



Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto de Encenillo en esta etapa de maduración es: 5YR 4/8, en su parte basal; y 2,5Y 6/6, en su extremo superior. (Ver Foto 5).

Posee una longitud de 6 mm de largo por 3 mm de ancho y un peso aproximado de 8,2 mg; una consistencia flácida de su estructura, y con diminutos tricomas o pelos a su alrededor en poco número que el anterior. Su manipulación con instrumentos de laboratorio es manejable y menos complicada. Normalmente contiene en su interior 12 microsemillas en proceso de maduración de color café oscuro.

Foto 6. Fruto 2 dividido en dos secciones.

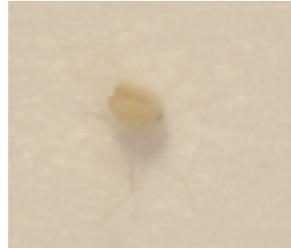


Al dividir el fruto en dos secciones, se pueden observar las sombras de las semillas en su interior, en este presentan una mayor nitidez y tamaño ovoide con numerosos tricomas al igual que el fruto.

Algunas semillas estando dentro del fruto se encuentran ya germinadas y en un estado avanzado en esta fase, algo de lo que no se tenía referencia en ningún libro o bibliografía existente, esto permitió sacarlas y sembrarlas de inmediato en el medio de cultivo. En esta fase contiene un 40% de semillas ya germinadas, es decir a 3 semillas en pleno desarrollo; el fruto en esta etapa no se ha abierto para sacar sus semillas y esparcirlas en forma natural al medio ambiente.

Se definen dos etapas de la semilla en este tipo de fruto, una etapa en la cual la semilla no está completamente germinada y otra en donde la semilla presenta una notoria germinación y desarrollo de su embrión, cabe aclarar que la extracción de estas semillas es a través de un estereoscopio debido a su diminuto tamaño, lo que hace del trabajo algo complicado y tedioso a la hora de manipular estos explantes en la cabina de flujo laminar.

Foto 7. Semillas en estado de germinación del Fruto2.



Las semillas completamente germinadas (ver Foto 8), presentan un cotiledón desarrollado y evidencian una germinación completa que permiten un buen desarrollo en condiciones *in vitro*, al encontrarse dentro del fruto en un estrés por falta de espacio y nutrientes hace necesario la extracción eficaz y rápida de la semilla para la siembra en cabina.

Foto 8. Semilla completamente germinada del Fruto 2.



Foto 9. Comparación de las dos fases de germinación que se encuentran en el fruto 2.



FASE 3. FRUTO EN ESTADO DE SOBREMADURACIÓN

Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto de Encenillo en esta etapa de sobremaduración es: SYR 4/6, en toda su estructura. (Ver Foto 10).

Foto 10. FRUTO 3. Fruto sobremaduro de Encenillo.



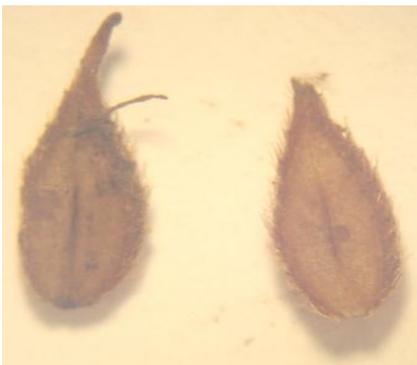
Posee una longitud de 5 mm de largo por 3 mm de ancho y un peso aproximado de 7,0 mg; una consistencia dura de su estructura, y con pocos tricomas o pelos a su alrededor. Su manipulación con instrumentos de laboratorio es menos complicada. Normalmente contiene en su interior 10 a 15 microsemillas en estado de deshidratación y posee una morfología irregular (ver foto 11). Estas semillas no son viables para germinar y por ende para sembrar en medio de cultivo, están deshidratadas e inactivas.

Foto 11. Semillas deshidratadas e inactivas del Fruto en Fase 3.



Al dividir el fruto en dos secciones, se pueden observar una coloración característica en su interior (ver Foto 12), con una nervadura que divide cada sección en dos partes, en este punto las semillas presentan una morfología irregular y un tamaño muy reducido en comparación con las demás.

Foto 12. Fruto 3 dividido en dos secciones.



3.2.2.5 DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DE RODAMOMTE.

Para los explantes utilizados en los ensayos de desinfección, se realizaron tratamientos (**P**) descritos en la tabla 2, teniendo en cuenta tanto las concentraciones utilizadas como los tiempos de exposición para evaluar el mejor tratamiento desinfectivo.

Para las yemas axilares, los segmentos nodales, las láminas foliares, las puntas radiculares, se aplicaron 20 tratamientos de desinfección con concentraciones de ac. Hipocloroso de 0,05% hasta 0,4% y tiempos de 3, 5, 7 y 10 min.

La desinfección se llevó a cabo en 24 tratamientos que inician desde el P21 hasta el P44, aplicando concentraciones de ácido Hipocloroso de 0,5 hasta 1,0%, y tiempos de exposición de 3, 5, 7 y 10 minutos.

3.2.2.6 SIEMBRA DE EXPLANTES DE RODAMONTE EN MEDIO DE CULTIVO.

Las yemas axilares, láminas foliares, segmentos nodales y puntas radiculares, se sembraron en la cabina de flujo laminar, en el medio de cultivo WPM, sin fitorreguladores y con carbón activado 2gr/Lt.

La siembra en cabina de las semillas de Rodamonte se realizó una vez hecha la desinfección de los frutos. La siembra se lleva a cabo, haciendo un corte transversal en el ovario súpero de los frutos para exponer las microsemillas y esparcirlas sobre el medio de cultivo utilizando las pinzas y agitando con delicadeza el fruto. De esta manera un 90% de las semillas caen al medio de cultivo. La cantidad de explantes sembrados con todos los tratamientos es difícil de manejar por la innumerable cantidad de microsemillas que contiene cada fruto. (Ver foto 13).

Foto 13. Microsemillas de Rodamonte



3.2.2.7 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DE RODAMONTE A TRAVÉS DE LAS FASES DE MADURACIÓN DE SUS FRUTOS.

Los frutos se tomaron de árboles adultos, donde se encontraban diferentes etapas de maduración, esto permitía caracterizar la viabilidad de la semilla (ver Foto 14); se identificaron varios parámetros físicos, como su tamaño, color, forma, peso y consistencia.

Foto 14. Frutos de un árbol adulto de Rodamonte



Cada fruto que se tomó se caracterizó por su color con la ayuda de la tabla de colores de tejidos vegetales Munsell, aplicando el resultado para definir el tipo de fruto. Una vez definido el fruto, se procedió a registrar otras características como el tamaño, el peso y la consistencia de cada uno. Definido estos pasos, sigue la inspección interna con la ayuda de un estereoscopio para verificar la cantidad, el tamaño y la forma de las semillas que posiblemente serán sembradas en un medio de cultivo.

FASES DE ESTUDIO.

Se clasificaron diferentes fases de desarrollo del fruto de Rodamonte, que inician desde su floración hasta su sobremaduración, identificando diversas características fisiológicas de cada fase como sigue a continuación:

FASE 1. En esta fase encontramos una formación floral de lo que posteriormente se convertirá en fruto con sus respectivas semillas, este es el principio del desarrollo

madurativo que producirá las semillas óptimas para la siembra y propagación de Rodamonte, (Ver foto 15).

Foto 15. Fase 1. Floración del Rodamonte.



Posee un peso aproximado de 25 mg, una altura promedio de 8mm; es consistente, y rígida lo cual permite su fácil manipulación para el estudio.

FASE 2. Aquí el fruto comienza su proceso de maduración, es el segundo paso que prosigue después de 9 días de estar en floración. Según la caracterización de la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 2 es: cáliz y ovario súpero Y6/10 (Ver Foto 16).

Foto 16. Fase 2. Fruto del Rodamonte en proceso madurativo.



Este fruto posee una coloración amarillenta en toda su estructura, un peso aproximado de 42 mg, una altura de 1 cm, y 6 mm de ancho; consistencia gruesa y fácil manipulación. Las semillas que encontramos en su interior presentan una coloración blancuzca casi pálida y en muchas cantidades (ver foto 17).

F17. Corte transversal del fruto de Rodamonte en Fase 2.



FASE 3. Este fruto sigue un proceso madurativo que desarrolla la viabilidad de sus semillas, notándose un cambio en su fisiología y coloración que permite una identificación de su desarrollo morfofenético. Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 3 es: cáliz y ovario súpero Y6/10 y oxidación 10R 3/2 (Ver Foto 18).

Foto 18. Fruto de Rodamonte en Fase 3



Se puede observar que el fruto presenta una leve oxidación de un 10% en su extremo superior que evidencia un avance en su proceso madurativo, esta característica es la prueba de un desarrollo fisiológico para el avance a obtener el punto exacto de viabilidad de la semilla para la siembra. Presenta un peso aproximado de 40 mg, una altura de 9 mm, y 5 mm de ancho; consistencia gruesa y fácil manipulación.

FASE 4. Este fruto sigue un proceso madurativo. Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 4 es: cáliz y ovario súpero Y6/10 y oxidación 10R 3/2 (Ver Foto 19).

Foto 19. Fruto de Rodamonte en Fase 4.



Se puede observar que el fruto presenta una oxidación del 20% en su ovario súpero. Presenta características físicas como; peso aproximado de 40mg, una altura de 0,9 cm, y 5 mm de ancho; consistencia gruesa y fácil manipulación.

FASE 5. Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 4 es: cáliz y ovario súpero Y6/10 y oxidación 10R 3/2 (Ver Foto 20).

Foto 20. Fruto de Rodamonte en Fase 5.



El fruto presenta una oxidación en su ovario súpero del 30%, esto permite distinguir la diferencia entre los demás frutos estudiados hasta el momento. Presenta un peso aproximado de 39 mg, una altura de 9 mm, y 5 mm de ancho; consistencia gruesa y fácil manipulación.

FASE 6. Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 6 es: cáliz y ovario súpero Y6/10 y oxidación 10R 3/2 (Ver Foto 21).

Foto 21. Fruto de Rodamonte en Fase 6.



Se presenta en el fruto una oxidación del 50% en el ovario súpero, hay un desarrollo que permite avanzar en el nivel de germinación de la semilla para la siembra en condiciones *in vitro*. Presenta un peso aproximado de 39 mg, una altura de 9 mm, y 5 mm de ancho.

FASE 7. Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 7 es: cáliz 6/10 y ovario súpero Y6/10 y oxidación 10R 3/2 (Ver Foto 22).

Foto 22. Fruto de Rodamonte en Fase 7.



Observamos que el fruto presenta una oxidación del 80% en el ovario súpero, una capa color café que va formando una cubierta dura y resistente. Presenta un peso aproximado de 39 mg, una altura de 9 mm, y 5 mm de ancho; y fácil manipulación.

FASE 8. Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 7 es: cáliz y ovario súpero Y6/10 y oxidación 10R 3/2 (Ver Foto 23).

Foto 23. Fruto de Rodamonte en Fase 8



El fruto presenta una oxidación del 90% en el ovario súpero. Presenta un peso aproximado de 38 mg, una altura de 8 mm, y 5 mm de ancho; consistencia gruesa.

FASE 9. Según la tabla de tejidos vegetales de Munsell, el fruto en fase 7 es: cáliz y ovario súpero en completa oxidación 10R 3/2 (Ver Foto 24).

Foto 24. Fruto de Rodamonte en Fase 9.



Esta es la última fase, el fruto se encuentra deshidratado y dehiscente, presenta un cubrimiento del 100% en su estructura. Presenta un peso aproximado de 35 mg, una altura de 7 mm, y 5 mm de ancho es duro y resistente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 ENCENILLO.

4.1.1 Desinfección de yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y puntas radiculares.

Los tratamientos de desinfección que se propusieron del P1 al P16 no arrojaron resultados favorables debido a la presencia de hongos contaminantes (superficialmente) sobre el explante y el medio de cultivo, estos resultados dieron negativo tanto para la desinfección como para el control de fenolización u oxidación ya que se presentó un elevado índice de ambos casos a los 4 días de haber realizado la siembra de este material vegetal.

Para las yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y las puntas radiculares, en los tratamientos del P17 hasta el P20 no se presentó contaminación pero sí oxidación completa al 4 día de sembrado del material vegetal. El manejo de los tratamientos desde el P17 hasta el P20 sirvió en gran medida para detener la contaminación que se venía presentando, pero se falla aún en el control de la oxidación del explante.

Figura 4. Tratamientos del P1 hasta el P16 vs. Porcentajes de contaminación y oxidación

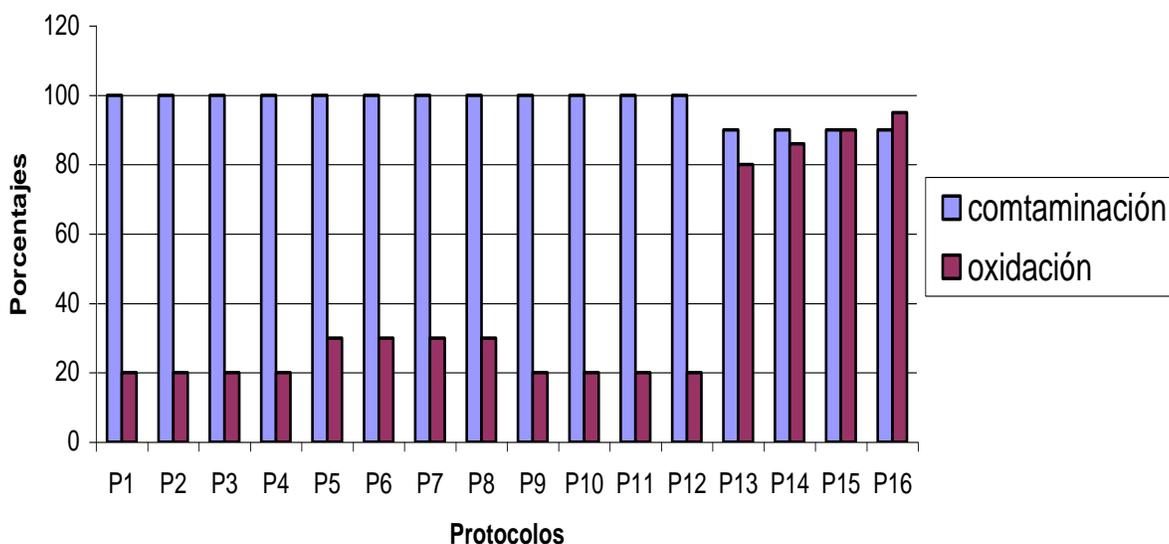
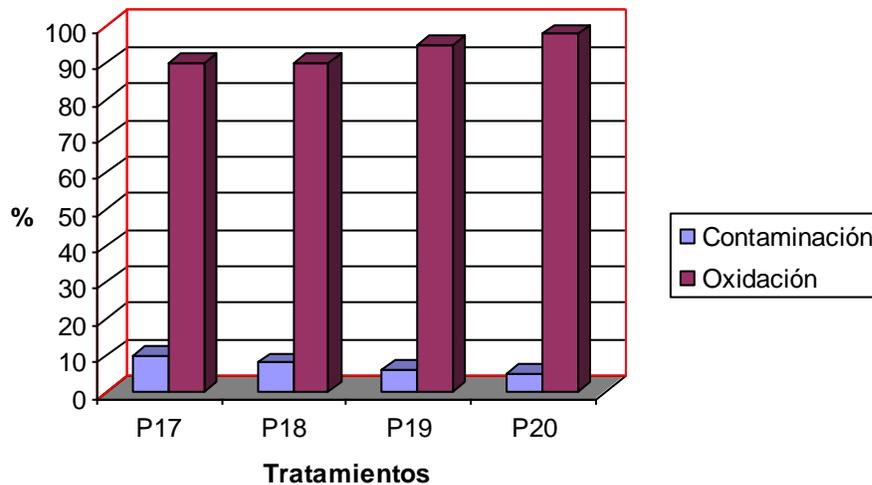


Figura 5. Tratamientos del P17 hasta el P20 vs. Porcentajes de contaminación y oxidación



4.1.2 Desinfección de frutos para extracción de la semilla de Encenillo.

Los frutos que se les aplicaron los tratamientos con ácido Hipocloroso del P21 al P44; dieron muy buenos resultados, dando con éxito el establecimiento *in vitro* de las semillas, todos los tratamientos aquí mencionados, permitieron que las semillas no presentaran índice de contaminación alguno.

Se demuestran los avances realizados en cuanto a control de la desinfección y oxidación de los explantes en condiciones *in vitro*, muy importante para el equilibrio del ecosistema alto andino del distrito y la región. La contaminación prácticamente se logró evitar al igual que la fenolización de los explantes sembrados en ambos medios de cultivo, como se describe a continuación:

MEDIO WPM SIN FITORREGULADORES.

Este tratamiento promovía como objetivo principal, diferenciar el porcentaje de germinación de la semilla al igual que la fase de establecimiento, dando los siguientes resultados:

Las semillas que se sembraron en este medio de cultivo, germinaron en un 90%, en un tiempo aproximado de 13 días, sin presencia de oxidación ni contaminación, se hizo un seguimiento semanal del desarrollo morfológico de los explantes que evaluaba

características cualitativas como cuantitativas de las cuales se prepararon fichas de seguimiento que encontramos en los anexos de este proyecto. De los 24 tratamientos establecidos para superar la fase de desinfección, todos dieron resultados favorables.

El tratamiento P21 (concentración de ácido Hipocloroso 0,5%) sin Fitorreguladores: Los resultados óptimos dieron completa germinación a los 13 días de sembradas las semillas en el medio de cultivo.

En la tercera semana, se observan dos pequeñas hojas en sus extremos apicales color verde intenso con la cubierta de la semilla pegadas a ellas (cotiledones), en crecimiento erecto, altura aproximada de 6 mm, tallo color blanquizco.

En la cuarta semana, siguen su crecimiento, altura aproximada de 8 mm, presentan un par de hojas verdosas de 2mm de largas, tallo color crema y en pleno desarrollo, hay presencia de raíces.

En la quinta semana, explantes rígidos, altura aproximada de 1 cm, dos hojas redondeadas en su extremo apical, tallo color crema, cero contaminaciones y muy buen desarrollo morfológico, hay presencia de raíces.

MEDIO WPM CON LA FITOHORMONA GA₃ A UNA CONCENTRACION DE 1mg/Lt.

Las semillas que se sembraron en el medio de cultivo WPM con GA₃ a 1 mg/Lt; germinaron en un 95% a los 10 días de sembradas, sin presencia de oxidación ni contaminación, al hacer un seguimiento semanal del desarrollo morfológico de los explantes se evaluaron características cualitativas como cuantitativas presentes en los anexos de este proyecto. Los 24 protocolos establecidos para superar la fase de desinfección, dieron resultados favorables, la desinfección de los frutos no interfiere para nada en el proceso de germinación.

En la tercera semana, hay crecimiento más avanzado que en los medios sin fitorreguladores, una altura aproximada de 8 mm, presentan un par de hojas verdosas de 2mm de largas de forma redondeada (cotiledones), tallo color crema y en pleno desarrollo, no hay presencia de raíces.

En la cuarta semana, explantes rígidos, altura aproximada de 1 cm, dos hojas redondeadas en su extremo apical, tallo color crema, cero contaminaciones y muy buen desarrollo morfológico, hay presencia de raíces.

En la quinta semana, explantes con una altura de 1,1mm, dos hoja redondeadas con presencia de una pequeñísima nervadura que tiende a dividir las en dos secciones, tallo color crema, hay presencia de raíces.

El mejor tratamiento para los explantes es el medio con la fitohormona GA₃, a una concentración de 1 mg/Lt; debido a su acelerada germinación y crecimiento activo en condiciones controladas, estos explantes siguen su normal desarrollo en el banco de germoplasma del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico JCM.

4.1.3 SEMILLAS DE ENCENILLO.

4.1.4 FASE 1. FRUTO INMADURO.

Las semillas fueron sembradas en medio de cultivo WPM con y sin fitorreguladores, dando como resultado la no-germinación, sin presencia de contaminación ni oxidación. Se puede definir que el fruto en esta fase no es óptimo para extraerle sus semillas ya que contienen un embrión inmaduro que no es viable para establecimiento in vitro.

4.1.5 FASE 2. FRUTO EN PROCESO DE MADURACIÓN

La siembra de las semillas dio como resultado la germinación completa y su buen desarrollo morfológico, esto hace pensar que el fruto en esta fase es óptimo para la manipulación in vitro, lo cual es un gran avance en la propagación y siembra de esta especie que permitirá su rescate y prevenir su extinción. (Foto 25).

Foto 25. Semillas germinadas de Encenillo en medio WPM.

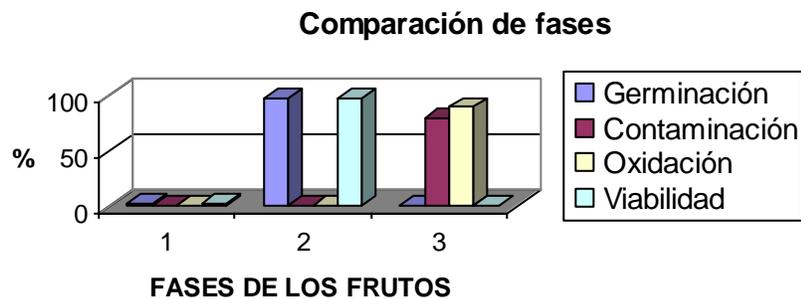


La viabilidad de la semilla es de un 100%, ya que todos los tratamientos arrojaron muy buenos resultados para la investigación. Este es el fruto ideal para extraer sus semillas y sembrarlas en condiciones *in vitro*.

4.1.6 FASE 3. FRUTO EN POSMADURACIÓN (DEHISCENTE)

Las semillas sembradas en los diferentes tratamientos, no arrojaron resultados favorables, no se presentó germinación alguna y al contrario hubo oxidación y contaminación de las semillas. El fruto en esta fase no posee semillas viables para germinación *in vitro*. Por lo tanto no es conveniente la extracción de sus semillas para la siembra.

Figura 7. Comparaciones entre fases de los frutos estudiados.



En esta gráfica se puede observar tanto la comparación entre las tres fases de los frutos, con sus respectivas características como la germinación, contaminación, oxidación y por último la viabilidad de sus semillas. En la fase uno existe cero germinación, cero contaminación, cero oxidación y la viabilidad de la semilla es nula. En la fase dos se encuentra una germinación del 95%, cero contaminación, cero oxidación y la viabilidad es de un 100%. En la fase 3 encontramos cero germinación, 80% de contaminación, 90% de oxidación y la viabilidad es cero.

En conclusión el fruto óptimo para extracción de semillas y posterior siembra en condiciones *in vitro* es el fruto en fase 2.

4.2 RODAMONTE.

4.2.1 Desinfección de yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y puntas radiculares.

Los tratamientos de desinfección del P1 al P16 no arrojaron resultados favorables debido a la presencia de hongos contaminantes (superficialmente) sobre el explante y el medio de cultivo, estos resultados dieron negativo tanto para la desinfección como para el control de fenolización u oxidación ya que se presentó un elevado índice de ambos casos a los 4 días de haber realizado la siembra de este material vegetal.

Para los tratamientos del P17 hasta el P20, no hubo presencia de contaminación pero sí oxidación del explante en su totalidad. Para las yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y las puntas radiculares se presentó en gran medida el mismo fenómeno de oxidación completa al 4 día de sembrado el material vegetal. El manejo de los tratamientos ayudó en gran medida a detener la contaminación que se venía presentando, pero se falla aún en el control de la oxidación del explante. Debe mencionarse que al el medio de cultivo no se le adicionó ningún tipo de fungicida ni bactericida para prevenir la contaminación, solo se trató la oxidación con carbón activado presente en el medio de cultivo.

4.2.2 Desinfección de frutos para extracción de la semilla de Rodamonte.

Los tratamientos aplicados del P21 al P44; arrojaron muy buenos resultados permitiendo que las semillas no presentaran índice de contaminación ni de oxidación; los casos adversos a estos resultados son parte de la fase en que se encontraban los frutos al momento de la desinfección y siembra de la semilla.

MEDIO WPM SIN FITOHORMONAS.

Las semillas de Rodamonte, germinaron en un 90% a los 12 días de sembradas, los tratamientos permitieron superar la fase de desinfección.

En la tercera semana de sembradas las microsemillas en el medio de cultivo, se observa la presencia de dos pequeñas hojas verdosas en su extremo apical alargadas (cotiledones), vellosidades en su extremo radical, tallo color blanco-verdoso y altura aproximada de 7 mm, el medio de cultivo no presenta contaminación alguna.

En la cuarta semana, hay un desarrollo óptimo de los explantes, en su extremo apical hay presencia de dos hojas de aproximadamente 2mm alargadas, tallo color crema pálido y una altura de 9mm, y continúa la presencia de pequeñas vellosidades en su extremo radicular de color blanco.

En la quinta semana, hay formación de una tercera hoja en su extremo apical color verde intenso, alcanzan una altura de 1 cm, tallo color crema y hay menos presencia de pequeñas vellosidades en su extremo radicular.

MEDIO WPM CON LA FITOHORMONA GA₃ EN CONCENTRACIONES DE 1mg/Lt.

Las semillas germinaron en un 95% a los 9 días de sembradas, los 24 tratamientos arrojaron resultados favorables.

Se sembraron cientos de microsemillas, en la tercera semana de sembradas se observa la presencia en su parte apical de dos cotiledones, vellosidades en su extremo radical, tallo color blanco-verdoso y altura aproximada de 8 mm, el medio de cultivo no presenta contaminación alguna.

En la cuarta semana hay un desarrollo óptimo de los explantes, en su extremo apical hay dos hojas de aproximadamente 2mm alargadas y la presencia de una hoja verdadera en su primera etapa de desarrollo, tallo color crema pálido y una altura de 1cm, pequeñas vellosidades en su extremo radicular de color blanco.

En la quinta semana, hay formación de una hoja verdadera en su extremo apical, crecimiento rígido y alcanzan una altura de 1,2 cm, tallo color crema y más presencia de pequeñas vellosidades en su extremo radicular.

4.2.3 SEMILLAS DE RODAMONTE.

4.2.4 FASE 2

El fruto en esta fase posee, semillas inmaduras por lo tanto, no arrojaron resultados favorables a los objetivos que se buscaban, la germinación no se presentó en ningún caso y no hubo contaminación ni oxidación de las semillas, se puede definir que su viabilidad para germinación en condiciones *in vitro* es escasa.

4.2.5 FASE 3

Al sembrar las semillas en los medios de cultivo WPM con y sin fitorreguladores, los resultados fueron negativos para la germinación, presentándose ausencia de contaminación y oxidación de las semillas, su viabilidad no es buena para el establecimiento *in vitro*.

4.2.6 FASE 4

Las semillas sembradas presentaron un porcentaje de germinación muy bajo cerca del 20%, no hay contaminación ni oxidación.

4.2.7 FASE 5

Las semillas, germinaron en un 50%, sin contaminación ni oxidación, su desarrollo y porcentaje de semillas germinadas es bajo para una posterior propagación.

4.2.8 FASE 6

Presentaban un porcentaje de germinación del 85% con un buen crecimiento y desarrollo, estos explantes son viables a la hora de propagarlas en condiciones *in vitro*, por el alto porcentaje de germinación que presenta.

4.2.9 FASE 7

En esta fase, las semillas germinaron con éxito en un 95%, este fruto es el óptimo para extraer sus semillas, y propagar la especie con el fin de protegerla del peligro de extinción.

4.2.10 FASE 8

Las semillas germinaron en un 95%. Este el primer paso para el establecimiento *in vitro* de Rodamonte ya que se cuenta con gran material germinado listo para la fase de propagación y enraizamiento.

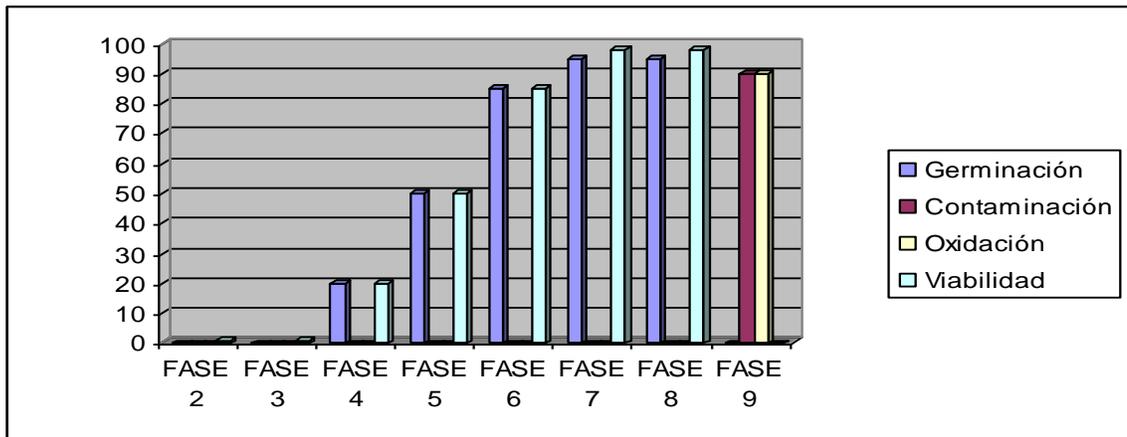
Foto 26. Semillas de Rodamonte germinadas en medio WPM.



4.2.11 FASE 9

En esta fase las semillas no presentan una germinación óptima o su embrión es inactivo ya que en las siembras realizadas resultaron tanto contaminadas como oxidadas en un 90%, es decir que la semilla no es viable para germinación *in vitro*.

Figura 8. Comparación entre fases de los frutos de Rodamonte.



En esta gráfica observamos las diferencias entre los frutos de Rodamonte, concretando que las fases 2 y 3 no son óptimas para germinación *in vitro*, y de las fases 4 hasta la 8 el porcentaje de germinación varía en forma ascendente permitiendo mayor viabilidad en micro propagación.

5. CONCLUSIONES

La mejor alternativa de establecimiento *in vitro* de estas especies, es por semillas. Se obtienen tanto en cantidad y en corto tiempo explantes listos para las fases propagación y enraizamiento.

Tanto para el Encenillo como para el Rodamonte, el establecimiento *in vitro* de yemas axilares, segmentos nodales, láminas foliares y puntas radiculares no se logró, se previno la contaminación pero se aumento en la oxidación de estos explantes.

EXPLANTES DE ENCENILLO

Las semillas más viables las obtenemos de los frutos de la fase 2 descrita en el contenido del presente proyecto, estas semillas germinan con facilidad y se desarrollan satisfactoriamente en condiciones controladas, utilizando GA₃ a una concentración de 1 mg/Lt; se acelera la germinación en un tiempo de 10 días.

El proceso de desinfección se describe en los tratamientos con ácido Hipocloroso desde el P21 hasta el P44, garantizando un 100% de asepsia en los cultivos que se realicen posteriormente.

EXPLANTES DE RODAMONTE

Utilizando el fitorregulador GA₃, a una concentración de 1mg/Lt, se acelera el proceso germinativo de las semillas en un tiempo de 9 días, sembradas en el medio de cultivo WPM bajo condiciones controladas.

Los frutos óptimos de Rodamonte para extracción de las semillas, se caracterizaron debido a la oxidación que presentan en su ovario supero, que determina el estado propicio para este fin, es decir los de las fases 4 hasta la 8.

6. RECOMENDACIONES

ENCENILLO

Disponer de frutos óptimos en cantidades considerables y mantener un banco de germoplasma suficiente para propagar y disminuir el peligro de extinción de la especie.

Seguir los tratamientos de desinfección planteados, para conseguir una buena siembra y germinación de la semilla.

Utilizar el fitorregulador GA₃, a una concentración de 1mg/Lt, para inducir a una rápida germinación de la semilla y propagar este material hasta la etapa de adaptación ex vitro o endurecimiento.

EXPLANTES DE RODAMONTE

Para acelerar el proceso de germinación de las semillas es conveniente utilizar el fitorregulador GA₃, en concentraciones de 1mg/Lt, y propagar este material utilizando diferentes concentraciones de fitorreguladores para inducir a brotación y enraizamiento.

Para propagar el material vegetal establecido, es recomendable disminuir la cantidad de agar que se utilice en 1 ó 1,5 gr, es decir, utilizar 3,5 ó 4 gr/Lt, los explantes que presenten una altura de un centímetro ya están listos para propagar.

BIBLIOGRAFÍA

ARIAS, Olga y RODRÍGUEZ, Gloria. Propagación masiva *in vitro* y adaptación a condiciones externas de hojarasco (*Talauma carcifragans L.*). Bogotá. Universidad Distrital. Facultad de Ciencias y educación. Proyecto curricular en licenciatura en Biología. 1998.

BANDURSKI, R.S. et al. Fisiología y biología vegetal. España: Mc Graw Hill. 1993. p. 285 - 300.

BARBA, A. 1987. Reguladores del crecimiento vegetal. En Cultivo de Tejidos Vegetales. HURTADO, D. Y MERINO, M. México: Trillas. 1987. p. 18 – 65.

BERMÚDEZ, O. Y LEÓN, J. Evaluación *in vitro* del potencial morfológico en tejido foliar de maní forrajero perenne *Arachis pintoi* (Kaprovicckas y Gregory). Bogotá. Universidad Distrital. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Biología. 1995.

BONGA, J. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. In: plant cell culture: results and perspectives (F. sala, B. parisi, R. cell y O. ciferrieds). Elsevier / North Holland Biomedical. Press. 1980. 264 p.

CARRIZOSA, M et al. Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies vegetales. Universidad Pontificia Javeriana. Unidad de Biología Vegetal. 1994.

CASTRO, D et al. Rejuvenecimiento- establecimiento *in vitro* de Gemían arbórea R. (yemone, MELINA) mediante el cultivo de tejidos vegetales. Bogotá. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 1993.

CURTIS, H. y BARNES, S. Biología. 5 edición. Argentina: Médica panamericana. 1993. p. 685 – 694.

GOMEZ, María y ANDRAMUNIIO, Zamara. Micropropagación masiva de Tuno Roso (*Centronia mutabilis*) bajo condiciones *in vitro*. Bogotá. Universidad Distrital. Facultad de Ciencias y educación. Proyecto curricular en licenciatura en Biología. 1998

HABERLANDT, G. 1902. Historia del cultivo de tejidos Vegetales. En Cultivo de Tejidos Vegetales. HURTADO, D. Y MERINO, M. México: Trillas. 1987. p. 15.

HODSON DE JARRAMILLO, E. RAMIREZ y M. S. CARRIZOSA. Cultivo de tejido para la propagación y mejoramiento de especies forestales. En: Aplicaciones de la Biotecnología en el Mejoramiento de cultivo. (Leopoldo Villegas ed.). Centro Internacional de Cooperación Científica Simón Bolívar. Caracas. Venezuela. (En prensa). 1996.

HURTADO, D. y MERINO, M. Cultivo de tejidos vegetales. México: Trillas. 1987. p. 28 – 65.

LINDSEY, K. Biotecnología vegetal agrícola. Zaragoza, España: Acribia. 1989.

PACHECO, R. A. Cultivo de tejidos vegetales aplicable a la conservación de orquídeas. Bogotá. Jardín botánico de Bogotá José Celestino Mutis. 2001.

PACHECO, R.A y PINZON, C.A. Aspectos generales para la propagación de especies nativas, CAR. Bogotá. Jardín Botánico José Celestino Mutis. 1997.

PEDROZA, J. Propagación vegetativa *in vitro* del babaco (*Carica x heilbornii* nm. *Pentapona helborni*) mediante proliferación de yemas caulinares e inducción de embriogénesis somática. Bogotá. Universidad Nacional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. 1990.

PIERIK, R.L.M. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa, 1990.

RIVERA, N. Técnicas de cultivo de tejidos para la propagación de *Weinmannia tomentosa* L.f. Bogotá. Universidad Javeriana. Departamento de Biología. Unidad de Biotecnología Vegetal. 1989.

ROCA, W. y MROGINSKI, L. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia: CIAT, 1991.

ROJAS, M. Fisiología vegetal aplicada. México: Mc Graw Hill. 1974. p.152 – 158.

ANEXOS

ANEXO A

EVALUACIONES CUALITATIVAS PARA EXPLANTES DE RODAMONTE.

NUMERO DE EXPLANTE	CONTAMINACIÓN		GRADO DE FENOLIZACION
	ENDÓGENA	EXÓGENA	
Ro. F2	0%	0%	0%
Ro. F3	0%	0%	0%
Ro. F4	0%	0%	0%
Ro. F5	0%	0%	0%
Ro. F6	0%	0%	0%
Ro. F7	0%	0%	0%
Ro. F8	0%	0%	0%
Ro. F9	95%	85%	95%

EVALUACIONES CUANTITATIVAS PARA EXPLANTES DE RODAMONTE

NUMERO DE EXPLANTE	FORMACIÓN DE HOJAS	FORMACIÓN DE TALLOS	FORMACIÓN DE RAÍCES
Ro. F2	0%	0%	0%
Ro. F3	0%	0%	0%
Ro. F4	0%	0%	0%
Ro. F5	20%	20%	20%
Ro. F6	80%	80%	60%
Ro. F7	95%	95%	65%
Ro. F8	95%	95%	65%
Ro. F9	0%	0%	0%

ANEXO B

EVALUACIONES CUALITATIVAS PARA EXPLANTES DE ENCENILLO.

NUMERO DE EXPLANTE	CONTAMINACIÓN		GRADO DE FENOLIZACION
	ENDÓGENA	EXÓGENA	
E. F1	0%	0%	0%
E. F2	0%	0%	0%
E. F3	95%	95%	100%

EVALUACIONES CUANTITATIVAS PARA EXPLANTES DE ENCENILLO

NUMERO DE EXPLANTE	FORMACIÓN DE HOJAS	FORMACIÓN DE TALLOS	FORMACIÓN DE RAÍCES
E. F1	0%	0%	0%
E. F2	95%	100%	80%
E. F3	0%	0%	0%

ANEXO C

TABLA 3. FICHA DE CONTROL PARA EL BANCO DE GERMOPLASMA.

DIA	MES	AÑO
ESPECIE:		
NÚMERO:		
ANAQUEL:		
FRASCOS SEMBRADOS:		
CONTAMINADOS:		
FRASCOS DISPONIBLES:		

ANEXO D

COMPARACIÓN ENTRE FASES DE LOS FRUTOS DE RODAMONTE



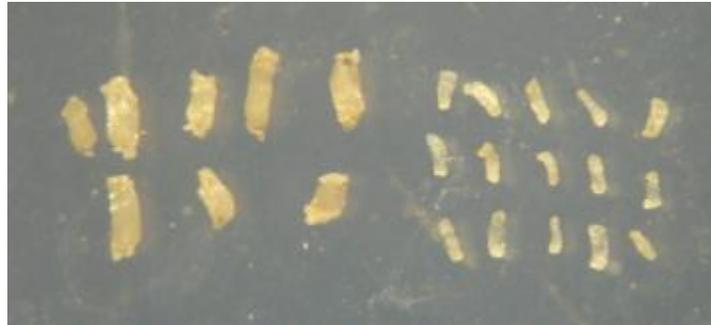
ANEXO E

SEMILLAS DE RODAMONTE SEMBRADAS EN MEDIO WPM



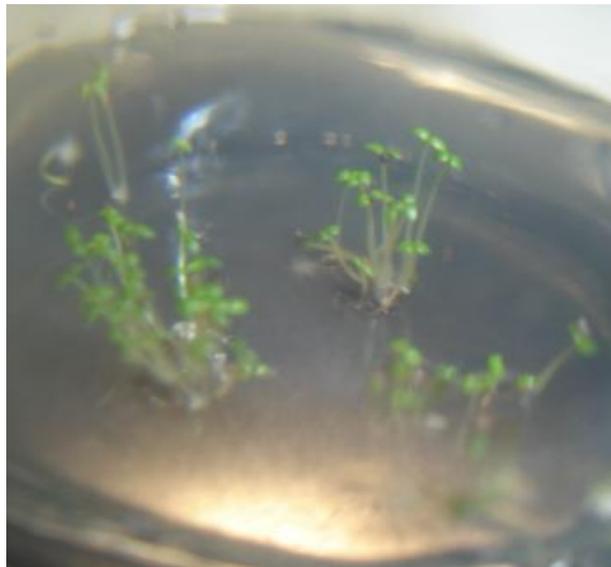
ANEXO F

COMPARACIÓN ENTRE SEMILLAS DE RODAMONTE VIABLES (MAYOR TAMAÑO) Y NO VIABLES (MENOR TAMAÑO) PARA GERMINACIÓN IN VITRO



ANEXO G

SEMILLAS GERMINADAS DE RODAMONTE EN MEDIO WPM



ANEXO H

SEMILLAS DE ENCENILLO GERMINADAS EN MEDIO WPM



ANEXO I

CUARTO DE INCUBACIÓN



