UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

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

LINA MARCELA DELGADO GARCÍA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Escuela de Biociencias

Área Curricular de Biotecnología

Medellín, Colombia

2013

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

LINA MARCELA DELGADO GARCÍA

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias-Biotecnología

Director (a):

Ph.D. Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez

Línea de Investigación:

Mejoramiento genético y micropropagación clonal de plantas

Grupo de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Escuela de Biociencias

Área Curricular de Biotecnología

Medellín, Colombia

2013

A mi familia, por ser el pilar fundamental de todo lo que soy, por su inmenso amor y apoyo incondicional, todo ha sido posible gracias a ustedes.

Agradecimientos

- *A mi papá Carlos Augusto, a mi mamá Luz Marina y mi hermano Juan Manuel, por creer en mí, por su paciencia y respaldo durante todo este proceso.*

- *Al profe Rodrigo Hoyos, por dirigir la realización de este proyecto, por su dedicación, confianza y empeño y por abrirme las puertas del Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas, el cual me brindó las herramientas necesarias para su culminación.*

- *A los jurados, por aceptar la evaluación de este trabajo, por sus oportunos comentarios y el invaluable aporte al presente trabajo.*

- *A Aida Hurtado, por compartir su tiempo, enseñanzas y consejos durante mi paso por el Laboratorio.*

- *A Andrés, Lore, Lina L, Johanna; mis compañeros de camino, mis amigos de siempre, por su interés, sus palabras de aliento y porque siempre estuvieron presentes.*

- *A Carolina, Claudia y Paola por brindarme su apoyo, compañía y valiosa amistad durante la realización de este trabajo.*

- *A la Maestría en Biotecnología, profesores y administrativos, por su gestión y contribución a mi formación académica.*

Contenido

Pág.

Resumen ..... **VII**

Lista de figuras ..... **IX**

Lista de tablas ..... **XI**

Lista de Abreviaturas ..... **XII**

1. INTRODUCCIÓN **13**

2. MARCO TEÓRICO **17**
2.1 Generalidades de *Aniba perutilis* 17
2.1.1 Clasificación taxonómica 17
2.1.2 Descripción botánica 17
2.1.3 Origen y distribución 17
2.1.4 Estado de conservación 19
2.1.5 Fenología 19
2.1.6 Usos e importancia 20
2.2 Micropropagación o cultivo *in vitro* 21
2.2.1 Generalidades 21
2.2.2 Factores que afectan el cultivo *in vitro* 21
2.3 Problemas asociados al cultivo *in vitro* 23
2.3.1 Contaminación 23
2.3.2 Oxidación 23
2.3.3 Vitrificación ó hiperhidratación 24
2.3.4 Variación somaclonal 24
2.4 Cultivo *in vitro* en *Aniba perutilis* 24
2.5 Crecimiento longitudinal y dominancia apical en plantas 25

3. OBJETIVOS **27**
3.1 OBJETIVO GENERAL 27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27

4. HIPÓTESIS 28
4.1 HIPÓTESIS NULA 28
4.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA 28

5. MATERIALES Y MÉTODOS 29
5.1 Establecimiento *in vitro* de *Aniba perutilis* 29
5.1.1 Material vegetal 29
5.1.2 Desinfección de las semillas 29
5.1.3 Medio y condiciones generales de cultivo 31
5.2 Multiplicación de brotes de *A. perutilis* 31
5.3 Enraizamiento de brotes de *A. perutilis* 32
5.4 Crecimiento y desarrollo de *A. perutilis* en vivero 33
5.5 Multiplicación *in vivo* de *A. perutilis* 34
5.5.1 Material vegetal 34
5.5.2 Inducción de brotes y enraizamiento de miniesquejes en *A. perutilis* .. 34
5.6 Análisis estadístico 36

6. RESULTADOS 37
6.1 Establecimiento *in vitro* de *Aniba perutilis* 37
6.2 Multiplicación *in vitro* de brotes de *A. perutilis* 39
6.3 Enraizamiento de brotes de *A. perutilis* 42
6.3 Crecimiento y desarrollo de *Aniba perutilis* en vivero 43
6.4 Multiplicación *in vivo* de *A. perutilis* 45

7. DISCUSIÓN 49
7.1 Material vegetal y establecimiento *in vitro* 49
7.2 Multiplicación *in vitro* de brotes de *A. perutilis* 51
7.3 Enraizamiento *in vitro* de brotes de *A. perutilis* 53
7.4 Crecimiento y desarrollo de *A. perutilis* en vivero 55
7.5 Multiplicación *in vivo* de *A. perutilis* 55

8. Conclusiones y Recomendaciones 58
8.1 Conclusiones 58
8.2 Recomendaciones 59

9. Bibliografía 61

10. Anexos 66

Resumen

Se planteó una metodología para el establecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Aniba perutilis*, árbol nativo colombiano, actualmente en grave estado de amenaza. En la primera etapa, se emplearon semillas que fueron sometidas a la acción de tres desinfectantes (NaOCl, $HgCl_2$ y $AgNO_3$) en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, con el fin de obtener plántulas asépticamente germinadas. Para obtener un medio de desarrollo e inducir la formación de brotes, se empleó WPM, evaluando la acción de los reguladores de crecimiento BAP, KIN, AIA, ANA y GA_3 en diferentes concentraciones. En la fase de enraizamiento, se emplearon las auxinas ANA y AIB en diferentes concentraciones, así como los medios de cultivo MS y WPM con sus sales reducidas a la mitad y diferentes concentraciones de AIA y ANA. En la segunda etapa, realizada en plantas establecidas en vivero, se llevaron a cabo tres tipos de corte, Distal, Medio y Basal (según la distancia a la base de la planta), con el fin de obtener, plantas donantes de yemas axilares y mini esquejes para enraizar. En este trabajo, se consolida el uso de NaOCl por 15 minutos, como tratamiento óptimo de desinfección, para obtener un porcentaje de supervivencia superior al 50%. El medio WPM suplementado con BAP 3mg/L y 1,5 mg/L de GA_3 favoreció el establecimiento de 0,6 brotes/explante con longitud promedio de 0,82cm. Sin embargo, su baja capacidad de enraizamiento permite catalogarla como recalcitrante al cultivo i*n vitro*. En condiciones *in vivo,* cortes a la altura media de las plantas, promueven la formación de 1,33 brotes/explante y 66,67% de enraizamiento en los mini esquejes, constituyéndose como herramienta clave en la propagación de la especie.

Palabras claves: *Aniba perutilis***,** semillas, comino crespo, establecimiento *in vitro*, recalcitrancia, multiplicación *in vivo.*

Abstract

A method for *in vitro* e *in vivo* multiplication of *Aniba perutilis*, a native colombian tree species, critically endangered, was developed. In the first phase, seeds were submitted to three disinfectants (NaOCl, $HgCl_2$ and $AgNO_3$) in different concentrations and time of exposure, in order to obtain aseptically germinated seedlings. With the purpose of getting a development culture medium and to induce bud formation, WPM with BA, KIN, IAA, NAA and GA_3 in different concentrations were evaluated. In rooting phase, NAA and IBA were used, as well as MS and WPM with their salts half reduced and IAA and NAA were utilized. In the second stage, carried out in nursery garden plants, three types of cuts Distal, Medium and Basal (according to the distance to the base of the plant) were made, in order to obtain, donor plants of axillary buds and mini cuttings for rooting. In this work, using NaOCl for 15 minutes is considered as optimal disinfection treatment to obtain a survival rate above 50%. The WPM medium supplemented with BA 3 mg /L and 1.5 mg /L GA3 favored the establishment of 0.6 shoots/explant with an average length of 0.82 cm. However, their low rooting capacity allows classifying as recalcitrant to *in vitro* culture. *In vivo* conditions, to make Medium cuts in the plants, promote the formation of 1.33 shoots/explant and 66.67% rooting in mini cuttings, becoming a key tool in the propagation of this specie.

Keywords: *Aniba perutilis***,** seeds, *in vitro establishment*, recalcitrance, *in vivo* multiplication.

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1 a) Árbol adulto de *Aniba perutilis* en su hábitat natural **b)** Inflorescencia **c)** Artesanía realizada a partir de madera de comino crespo. **18**

Figura 5-1 a) Frutos inmaduros, **b)** Semillas frescas, **c-d)** Semillas sembradas en medio de cultivo para su germinación *in vitro.* **32**

Figura 5-2. Evaluación del crecimiento de individuos de *Aniba perutilis* en condiciones de vivero **a.** Crecimiento apical. **b.** Long promedio último par de hojas. **36**

Figura 5-3. Plantas de comino crespo **a)** antes del corte **b)** corte distal **c)** corte medio d**)** corte basal **e)** mini esquejes producto de los cortes realizados. **37**

Figura 6-1. Semillas de comino crespo después del ataque del escarabajo picudo (*Curculionidae*). **40**

Figura 6-2. a) Germinación *in vitro* de semilla de comino crespo **b)** Emergencia de varias plúmulas en semillas cultivadas *in vitro.* **41**

Figura 6-3. Efecto de **a)** 3mg/L de BAP **b)** 3mg/L de KIN en la multiplicación de brotes de *A. perutilis.* **43**

Figura 6-4. Efecto de BAP (3,0 mg/L) en combinación con GA_3 (1,5mg/L) sobre la elongación de los brotes de comino crespo. **43**

Figura 6-5. Plántulas *in vitro* de comino crespo en medio de establecimiento (3mg/L BAP + 1,5mg/L GA_3). **44**

Figura 6-6. Formación de callo en la base de los explantes de comino crespo en respuesta a los tratamientos enraizadores. **45**

Figura 6-7. a) Ápice del tallo “dormante” **b)** Ápice del tallo en período de crecimiento longitudinal y desarrollo de hojas jóvenes. **45**

Figura 6-8. Seguimiento del crecimiento apical (cm) y desarrollo foliar (cm) durante 10 semanas a seis plantas de comino crespo, establecidas en vivero. **46**

Figura 6-9. a) Longitud promedio del tallo (cm). **b)** Número promedio de brotes por planta. **c)** Longitud promedio de brotes (cm) en plantas donantes de comino **48**

crespo 30, 60 y 75 días después de la realización de cortes a diferentes alturas (Distal, Media y Basal).

Figura 6-10. Plantas de comino crespo 30, 60 y 75 días después de la decapitación **a)** Basal, **b)** Medio y **c)** Distal. Barra = 1cm **49**

Figura 6-11. Presencia de raíces en mini esquejes de comino crespo antes de su traslado a vivero. **50**

Figura 6-12. Mini esquejes de comino enraizados y exitosamente establecidos en condiciones de vivero. **50**

Figura 7-1. Necrosis apical en explantes de *A. perutilis.* **55**

Lista de tablas

Pág.

Tabla 5-1. Sitios de colecta de los frutos de comino crespo. **31**

Tabla 5-2. Concentraciones (mg/L) de BAP y KIN empleadas para evaluar la multiplicación de brotes en *A. perutilis.* **32**

Tabla 5-3. Concentraciones (mg/L) de BAP, AIA, ANA y GA_3 empleadas para evaluar la multiplicación de brotes en *A. perutilis.* **34**

Tabla 5-4. Combinaciones hormonales empleando ANA y AIB para la inducción de raíces en brotes de *A. perutilis.* **32**

Tabla 5-4. Tratamientos evaluados en la fase de multiplicación de *A. perutilis* utilizando MS½ y WPM½ y la combinación de BAP y AIA. **34**

Tabla 5-5. Combinaciones hormonales empleando ANA y AIB para la inducción de raíces en brotes de *A. perutilis.*. **35**

Tabla 5-6. Tratamientos evaluados en la fase de enraizamiento de *A. perutilis* utilizando MS½ y WPM½ y la combinación de AIA y ANA. **35**

Tabla 6-1. Efecto de diferentes desinfectantes, concentraciones y tiempos de exposición empleados en el establecimiento in vitro de comino crespo. **39**

Tabla 6-2. Efecto de diferentes concentraciones de BAP y KIN en la inducción de múltiples brotes en *A. perutilis* en medio WPM **41**

Tabla 6-3. Efecto de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP AIA, ANA y GA_3 en la inducción de múltiples brotes de *A. perutilis* en medio WPM. **42**

Tabla 6-4. Efecto de MS½ y WPM½ y los reguladores de crecimiento BAP y AIA sobre la inducción de múltiples brotes en *A. perutilis*. **43**

Tabla 6-5. Porcentaje de mini esquejes enraizados según el tipo de corte realizado a la plántula donante. **50**

Lista de Abreviaturas

ABREVIATURA	TÉRMINO
$AgNO_3$	Nitrato de plata
AIA	Ácido Indol acético
AIB	Ácido Indol butírico
ANA	Ácido Naftalenoacético
BAP	6- Bencil amino purina
GA_3	Giberelina
$HgCl_2$	Bicloruro de mercurio
KIN	Kinetina
MS	Murashige y Skoog Medium
NaOCl	Hipoclorito de sodio
WPM	Woody Plant Medium

1. INTRODUCCIÓN

Colombia ha sido categorizada como uno de los países con mayor diversidad a nivel global, sin embargo, actualmente enfrenta una gran problemática, la sobreexplotación de sus recursos naturales; factores como el crecimiento poblacional, la destrucción y fragmentación de hábitats, la expansión de la frontera agrícola y la deforestación, están contribuyendo a una acelerada pérdida de esta biodiversidad.

Los recursos forestales, presentes primariamente en los bosques han sido los más perjudicados, el índice de deforestación anual podría alcanzar 336 mil hectáreas de selva con vegetación nativa (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2010), generando como consecuencia que un sinnúmero de especies vegetales se encuentren en un grave estado de amenaza.

Aniba perutilis (Comino, comino crespo) hace parte de esta larga lista de plantas amenazadas, fue incluida bajo la categoría En Peligro (EN) en el Libro Rojo de Plantas de Colombia-Especies Maderables (Cárdenas y Salinas, 2006), clasificación ratificada también por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial en 2010. Esta planta de la familia Lauraceae, es nativa de la Amazonía colombiana; se distribuye desde las selvas húmedas de Costa Rica, extendiéndose por la región de los Andes hasta Bolivia y la Amazonía brasilera, se encuentra principalmente en zonas de bosques primarios, ubicadas entre los 0 y los 2.600 metros sobre el nivel del mar. En Colombia ha sido reportada en los departamentos de Antioquia, Huila, Meta, Santander y Valle del Cauca (Kubitzki y Renner, 1982), sin embargo, la intensa presión antrópica generada sobre los ecosistemas que habita, ha ocasionado la pérdida de muchas poblaciones en las últimas décadas, quedando sólo pocos individuos aislados; motivo por el cual, su aprovechamiento ha sido prohibido y su explotación se ha vedado en varias de éstas regiones (Corantioquia, Corpourabá, la Corporación para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga CDMB y Carder (Cárdenas y Salinas, 2006).

El comino es ampliamente conocido también, por su alto potencial como árbol maderable; su madera, ha sido definida como extremadamente bella y la más fina de América. Se le llama el oro vegetal porque tratada en ebanistería da el color de un lingote de oro; es considerada por sus cualidades físicas y mecánicas (lustre, satinado, color, durabilidad, resistencia, veta y grano), como una de las materias primas más apreciadas para la elaboración de diferentes productos madereros de alta calidad, logrando reconocimiento internacional (Hurtado, 2007).

Adicionalmente, se ha reportado que el árbol de comino presenta interacciones con todas las especies que se desarrollan en los bosques en los cuales se encuentra, ya sea como soporte de trepadoras, alimento para aves, mamíferos o reptiles que coman sus frutos, como sombra para otras especies del bosque, proporcionando el néctar a insectos y algunas aves (Alzate, 1987), lo que eleva su nivel de importancia y su gran valor ambiental. Sin embargo, resulta paradójico, que a pesar de las valiosas propiedades de esta especie, sean pocos los estudios direccionados al conocimiento y conservación de su germoplasma.

Dada la situación actual de esta especie, es evidente la necesidad de buscar mecanismos encaminados a su recuperación, protección y multiplicación; por lo que la aplicación de técnicas biotecnológicas, se convierte en una importante alternativa. En los últimos años, el uso del Cultivo *in vitro* o micropropagación, ha venido en aumento, ya que permite la producción de un gran número de plántulas, generalmente de genotipos élite, en corto tiempo (Toribio, 2003), venciendo algunos de las dificultades propias de los métodos convencionales; y constituye una gran herramienta particularmente para la multiplicación de especies forestales como ésta, cuyas características como su gran tamaño, producciones irregulares de semilla, corta viabilidad, baja germinación y recalcitrancia; lentitud en el crecimiento y retardo de la floración, hacen difíciles y lentos los procesos de regeneración. Además, la aplicación de ésta técnica, permite el almacenamiento de germoplasma con propósitos de conservación y producción de plantas con fines comerciales (Muñóz-Concha, 2010).

De igual manera, resulta de gran interés explorar herramientas fundamentadas en procesos fisiológicos y relaciones hormonales; como puede llegar a ser, la producción y enraizamiento de mini esquejes a partir de plantas donantes establecidas en vivero con el fin de favorecer la propagación vegetativa de ésta especie.

En este contexto y teniendo en cuenta que los protocolos de multiplicación reportados para esta especie son escasos y poco exitosos, es de vital importancia desarrollar un mecanismo que garantice la multiplicación asexual y sostenible de *A. perutilis*; implementando técnicas de propagación tanto en laboratorio como en condiciones de vivero. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología para la multiplicación *in vitro e in vivo* de esta importante especie forestal.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Aniba perutilis*

2.1.1 Clasificación taxonómica

CLASE Equisetopsida >> SUBCLASE: Magnoliidae >> SUPERORDEN: Magnolianae >> ORDEN Laurales >> FAMILIA Lauraceae >> GÉNERO Aniba >> ESPECIE: *Aniba perutilis* Hemsley >> SINÓNIMO: *Aniba compacta*

NOMBRES COMUNES: Comino, Laurel Comino, Comino Crespo, Comino Canelo, Caparrapí, Aceite de Palo, Comino Real, Punte, Chachajo.

2.1.2 Descripción botánica

Son árboles corpulentos (Figura 2-1a), de madera muy fina y fragante, especialmente cuando seca, de ramitas angulosas, hojas alternas, glabras; láminas de hasta 15cm de longitud y 6cm de ancho, elíptica a lanceolada; peciolo de 1-2cm, inflorescencia subterminal, en panículas con abundantes flores; flores de hasta 3mm, tépalos seríceos en la cara interna y de hasta 1.4mm, pedicelos de hasta 3mm (Figura 2-1b); fruto elipsoide de hasta 2.5cm, cúpula de margen delgada. Al madurar es morado y su pulpa tiene olor a aguacate, el mesocarpio es carnoso, delgado, aceitoso y de color verde amarillento. Las semillas son oblongas, de color café oscuro, testa lisa, con dimensiones promedias de 20,8 mm de longitud y 21,1 mm de diámetro. (Kubitsky y Renner, 1982).

2.1.3 Origen y distribución

El género *Aniba* fue establecido por Aublet en 1775, comprende 41 especies, su centro de distribución se encuentra en la Región de la Amazonía Central y en Guyana, con especies individuales presentes en los Andes, al norte de Venezuela, las Antillas Menores y el Sur de Brasil (Georg, 1981).

Aniba perutilis es una especie nativa de la Amazonía colombiana, su distribución natural se da desde las selvas húmedas de Costa Rica, extendiéndose por la región de los Andes hasta Bolivia y la Amazonía Brasilera, en zonas de bosques primarios ubicadas entre los 0 y los 2.600 m.s.n.m. De forma solitaria crece favorablemente en suelos de bosques nublados o selvas húmedas y, algunas veces en grupo, sobre los filos de montaña (Múnera, 1998).

En Colombia se distribuye en la Costa del Pacífico, y en los departamentos de Arauca, Antioquia, Caldas, Chocó, Santander, Valle del Cauca, Risaralda, Huila, Meta y en estribaciones de las Cordilleras Occidental y Central (Kubitzki y Renner, 1982).
En el departamento de Antioquia se le ha encontrado en los municipios de Andes, Jericó, Támesis, Jardín, Sonsón, Liborina, Caldas, Barbosa, Anorí, San Carlos, San Luís, Urrao y Mutatá. (Gómez y Toro, 2007).

Figura 2-1: a) Árbol adulto de *Aniba perutilis* en su hábitat natural **b)** Inflorescencia (Tomado de Catálogo Virtual Ilustrado de la Flora del Oriente Antioqueño. Universidad Católica de Oriente). **c)** Artesanía realizada a partir de madera de comino crespo (Tomado de Catálogo de imágenes de la Reserva natural Nirvana).

2.1.4 Estado de conservación

El Estado de Conservación actual para la especie según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN) es dentro de la categoría En/Cr, unidad sistemática de clasificación, que hace referencia a que la “especie se enfrenta a un riesgo extremadamente alto de extinción en estado silvestre” (IUCN, 2001). Del mismo modo, Cárdenas y Salinas en 2007, la clasificaron como una especie En Peligro y prioritaria de conservación, en el Listado Rojo de Plantas de Colombia.

Por esto, algunas corporaciones regionales como CORANTIOQUIA (resolución 3183 de 2000), CORPOURABÁ (resolución 076395 de 1995) y la Corporación para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga CDMB (resolución 1986 de 1984) han prohibido el aprovechamiento de ésta especie y se ha vedado su explotación bajo cualquier modalidad en el área de sus respectivas jurisdicciones. La Corporación Autónoma Regional de Risaralda CARDER (resolución 177 de 1997), por su parte prohíbe cualquier aprovechamiento en Risaralda, a excepción de plantaciones o rodales. (Cárdenas y Salinas, 2007).

2.1.5 Fenología

Los árboles de comino que crecen en zonas altas por encima de los 2000 m, presentan dos períodos de floración al año, el primero de marzo a junio y el segundo de octubre a enero. La floración no suele ser sincrónica, de acuerdo con la información acopiada, los principales picos de floración se presentan durante los meses de mayo y diciembre, lo cual coincide con el inicio y el final de la temporada de lluvias, respectivamente (Gómez y Toro, 2007).

Los árboles ubicados a menos de 1000 m presentan un sólo evento reproductivo en el año, el cual se concentra en los meses de septiembre a noviembre. Al igual que en las procedencias de zona alta, la floración coincide con el final de la época de lluvias y el inicio de la temporada seca. (Gómez y Toro, 2007).

En los árboles de zonas altas no se presenta un período definido de fructificación pues, como se indicó anteriormente, los árboles no producen las flores al mismo tiempo y es usual encontrar individuos con flores y frutos verdes de diferentes tamaños simultáneamente. Muchas veces la producción de frutos es muy discreta y no coincide

con el porcentaje de floración reportado, esto se explica por cuanto hay pérdida de la floración y aborto de gran cantidad de frutos pequeños. En los individuos de zonas bajas el período de fructificación se presenta durante los meses de octubre a enero. El desarrollo y maduración de los frutos tarda aproximadamente de 4 a 5 meses (Gómez y Toro, 2007).

El comino es una especie perennifolia que todo el tiempo permanece con hojas y no llega a presentar grandes cambios en su copa. La caída y el brote de follaje ocurren en forma ligera (inferior al 10%) durante todo el año, con un leve incremento en la época de menor precipitación (Gómez y Toro, 2007).

2.1.6 Usos e importancia

El acabado, aroma, brillo y duración de su madera hicieron de esta especie una de las más importantes en las regiones andinas colombianas, ha sido definida por fabricantes de muebles, artesanos, diseñadores y ebanistas, como extremadamente bella y gracias a sus cualidades, es una de las maderas finas favoritas para la elaboración de muebles de alta calidad, logrando reconocimiento internacional. Las diferentes aplicaciones de la madera de Comino crespo, incluyen trabajos de ebanistería y carpintería, como la elaboración de muebles finos, de enchapes para muebles modernos y de armarios y gabinete. También es empleada en trabajos artesanales para esculturas, talla y en la elaboración de estantes, bateas y pilones (Hurtado, 2007) (Figura 2-1c).

Igualmente, por su olor agradable, la especie es apreciada para la producción de aceites aromáticos, semillas medicinales y cortezas fragantes. Así mismo, los frutos de comino tienen una capa carnosa muy nutritiva y rica en grasa que sirve de alimento a diferentes animales como tucanes, pavas y pequeños mamíferos como murciélagos. Algunos roedores consumen sus semillas (Múnera, 1998).

2.2 Micropropagación o cultivo *in vitro*

2.2.1 Generalidades

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa. La división y desdiferenciación de las células puede inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios (Pierik, 1988).

El cultivo *in vitro* se utiliza para realizar estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica general; para la obtención de plantas libres de patógenos; para la conservación de germoplasma; para la producción de metabolitos secundarios; para la mejora genética mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* o la hibridación somática; para la introducción de nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas (Roca y Mroginski, 1991).

La micropropagación es una alternativa importante a la propagación de plantas convencional. Implica la producción de plantas utilizando explantes como yemas apicales o laterales, segmentos de hoja, segmentos de raíz o protoplastos (en condiciones asépticas), en un recipiente donde se pueden controlar las condiciones ambientales y los nutrientes.

La micropropagación puede abordarse cuando los métodos convencionales no son factibles debido a dificultades técnicas, tiempo de multiplicación muy largo, y/o el coste de producción es elevado (Pérez-Ponce, 1998).

2.2.2 Factores que afectan el cultivo *in vitro*

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y las condiciones físicas y químicas que se crean.

En el caso del **material vegetal,** influye la constitución genética de la planta, la edad de la planta, la edad del órgano o tejido, el estado fisiológico, el estado sanitario, así como la posición del explante dentro de la planta, el tamaño, el ambiente y las condiciones en el que se ha desarrollado la planta madre, el tipo de corte que se realice y la forma en la que se coloque el explante en el medio (Roca y Mroginski, 1991).

Los **factores físicos** en los que desarrolla la planta son principalmente la luz (intensidad y fotoperiodo), la temperatura, el pH, la humedad relativa y la concentración de O2 y CO2. Las condiciones de luz y temperatura que se eligen para el cultivo *in vitro* generalmente son las que constituyen un óptimo para el crecimiento y el desarrollo del material experimental *in vivo* (Pérez-Ponce, 1998).

Las **condiciones químicas** están establecidas por los componentes nutritivos del medio de cultivo, agua, azúcar, macro y microelementos, reguladores de crecimiento, vitaminas y agar. Uno de los temas más importantes en la investigación en cultivo *in vitro,* consiste en la optimización del medio nutritivo ya que cumple con dos funciones principales: proporcionar soporte físico y todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del explante. (Roca y Mroginski, 1991).

La nutrición mineral está compuesta de macro y micronutrientes. Se han formulado muchas soluciones nutritivas. La más utilizada es la formulación MS (Murashige y Skoog, 1962), otros medios de cultivo son LS (Linsmaier y Skoog, 1965) que es una revisión del medio MS donde se modifica la composición de las vitaminas; White (White, 1963); B5 (Gamborg *et al.*, 1968); Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) desarrollado para el cultivo de anteras; WPM (Lloyd y McCown, 1980) para el cultivo de plantas leñosas.
La elección de una de las distintas soluciones nutritivas depende de la planta con la que se trabaja y de la etapa de micropropagación. El pH suele estar entre 5,0 y 6,5 ya que pH más bajo o más alto frenan el crecimiento y desarrollo *in vitro*.

Los reguladores de crecimiento pueden dividirse en hormonas, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores y otros productos sintéticos que actúan de forma semejante. Éstos son responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y que determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (George, 2008).

2.3 Problemas asociados al cultivo *in vitro*

2.3.1 Contaminación

La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo.

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas. A pesar de esto, el material puede no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Razdan, 2003).

Adicional al uso de sustancias químicas de desinfección, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia (Roca & Mroginski, 1991).

2.3.2 Oxidación

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo (como la composición del medio). Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos. La síntesis de fenoles va a producir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, llevando finalmente a una muerte prematura (George, 2008).

Teniendo en cuenta que, los fenoles pueden alterar eventos morfogenéticos y/o de crecimiento y desarrollo, en el cultivo de tejidos se hace necesario controlar el efecto de la oxidación. Métodos que han dado buen resultado cuando la síntesis de fenoles no puede evitarse son: el lavado, con sustancias como el carbón activado (CA) o la polivinilpirrolidona (PVP); la modificación del potencial redox (disminuyendo los agentes

redox), o la disponibilidad de oxígeno; la inactivación de enzimas de tipo fenolasa (quelantes), y otros sistemas como la incubación en condiciones de oscuridad, bajo pH, incubación a temperaturas más bajas, entre otros. En general lo que se busca al proporcionar éstas condiciones es reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos para esta enzima (Pérez-Ponce, 1998; Razdan, 2003).

2.3.3 Vitrificación ó hiperhidratación

La vitrificación ó hiperhidratación, es un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos cultivados in vitro, especialmente en las hojas, que incide sobre dos de los procesos más importantes que realizan estas estructuras: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso. En menor medida los tallos y raíces también resultan afectados por estas anomalías anatómicas, que en ciertos casos van a impedir el establecimiento de plantas micropropagadas en condiciones *ex vitro* (Razdan, 2003).

2.3.4 Variación somaclonal

La variación somaclonal se caracteriza por la aparición de nuevos caracteres diferentes a los de las plantas madre debidos al cultivo *in vitro.* Suelen consistir en la aparición de plantas más pequeñas, cambios de color o mosaicos (clorosis, perdida de quimeras), cambios en el hábito de crecimiento (vigor, forma de las hojas, porte erecto) y cambios en la productividad (esterilidad, juvenilidad más prolongada). En ocasiones estos cambios pueden llegar a crear nuevas variedades (Razdan, 2003).

2.4 Cultivo *in vitro* en *Aniba perutilis*

Existen pocos estudios reportados sobre micropropagación de especies en Lauraceae, algunas investigaciones se han llevado a cabo con el fin de establecer protocolos de regeneración para especies forestales de la familia que presentan algún tipo de importancia ecológica o económica como *Persea americana* (Schroeder, 1980), *Ocothea catarinensis* (Moura-Costa *et al.*, 1993), *Ocotea bullata* (Kowalsky y van Staden, 2001), *Cinnamomun camphora* (Babu, *et al*., 2003), entre otros.

Dentro del género *Aniba*, Jardím y colaboradores, 2010 empleando brotes apicales y segmentos nodales de plantas jóvenes germinadas en vivero de *Aniba rosaeodora* (pau-rosa), estimularon la formación de brotes, callos y raíces adventicias. El medio de cultivo

utilizado por los investigadores para la inducción de brotes fue MS1 (con las soluciones nutritivas reducidas a la mitad) suplementado con 4,0 mg/L de BAP + 6,0 mg/L de AIA el cual generó una producción de 2,13 brotes por explante, por su parte el medio de enraizamiento más eficiente fue MS1 con 3,0 mg/L de ANA, dando como resultado 2,53 raíces por explante. Con relación a la inducción de callo, el medio de cultivo más efectivo fue MS1 y los reguladores 4,0 mg/L de BAP + 6,0 mg/L de 2,4-D el cual permitió la formación de 1,67 callos por explante.

En Colombia, Castro y colaboradores (1993) emplearon esquejes de 1.5-2.0cm, tomados de árboles jóvenes de 1 año de edad aproximadamente y de plántulas 60 días después de germinadas, evaluaron el efecto de BAP en el porcentaje de brotación, obteniendo que al someter los explantes a 1mg/L de BAP, se logró 50-60% de brotación. Así mismo emplearon ANA y AIB para la producción de raíces, ésta última utilizada a 1 mg/L produjo la mayor cantidad de plantas enraizadas, sin embargo, en la etapa de endurecimiento hubo un porcentaje de supervivencia muy bajo y al llevar las plantas al campo hubo total mortalidad.

Por su parte, Hoyos y García (en prensa), realizaron alguno estudios de micropropagación, en el que determinaron que el medio de cultivo WPM conteniendo 1mg/L de la hormona BAP, es el medio óptimo para la producción de esquejes a partir de semillas germinadas en condiciones *in vitro*.

En consecuencia, resulta necesario optimizar estos protocolos, con el objetivo de mejorar las características de desarrollo de la planta en condiciones in *vitro.*

2.5 Crecimiento longitudinal y dominancia apical en plantas

Durante el proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas, el proceso de ramificación del tallo, generalmente involucra dos estados de desarrollo; la formación de meristemos en las axilas de las hojas, comúnmente llamados meristemos axilares y el posterior crecimiento de éstos. En muchas especies, el crecimiento de los meristemos axilares es inhibido por el brote primario, generalmente llamado apical, o inflorescencia primaria; fenómeno generalmente conocido como *dominancia apical*. La dominancia apical es definida como “el control inhibidor del brote apical sobre la expansión de los brotes

laterales", de tal modo que puede controlar el crecimiento de los brotes en los estados de desarrollo vegetativo, principalmente en plantas herbáceas o estados juveniles de árboles, como en el caso de comino crespo (Shimizu-Sato y Mori, 2003).

La dominancia apical actúa como un mecanismo de supervivencia de la planta, brindando un reservorio de meristemos que pueden reemplazar el brote primario cuando ha sufrido daño o ataque por enfermedad, herbivoría o poda (Shimizu-Sato y Mori, 2003).

Poco tiempo después de la remoción de la dominancia apical, mediante la "decapitación" del ápice, se pueden detectar aumentos medibles en la longitud de algunas especies, en otras, el período de latencia puede ser mayor, dependiendo del grado de inhibición y del estado del ciclo celular en el momento de la inhibición. En los días y semanas siguientes a la decapitación se produce la elongación y desarrollo de brotes laterales (Cline, 1997).
Tal situación puede ser capitalizada así mismo, en la inducción de raíces, considerando que éstas pueden o no ser producidas obedeciendo a las condiciones de tipo biótico o abiótico haciendo que ellas se acumulándose en los tejidos de las plantas

Las hormonas vegetales auxinas y citoquininas pueden jugar un gran papel en la regulación de éste proceso, las auxinas tienen un efecto inhibidor en el crecimiento de los brotes axilares, mientras que las citoquininas promueven la expansión de los brotes axilares. Este mecanismo depende entonces de la proporción de esas dos hormonas más que el nivel absoluto de alguna de las dos hormonas (Shimizu-Sato y Mori, 2001).

El proceso de desarrollo aunque puede variar entre las especies, puede ser dividido en cuatro etapas: I formación del brote lateral (promovida por citoquininas), II imposición de la inhibición-dominancia apical (reprimida por auxinas), III iniciación del crecimiento del brote lateral siguiente a la decapitación (liberación de citoquininas) y IV elongación y desarrollo del brote lateral en una rama (promovida por auxinas y giberelinas). (Cline, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología para la multiplicación clonal de *Aniba perutilis,* mediante el uso de técnicas biotecnológicas y estudiar el desarrollo fisiológico de plantas en vivero para la inducción de raíces a partir de mini esquejes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones óptimas para la proliferación de brotes de *A. perutilis*, evaluando la acción de las citoquininas BAP y Kinetina en diferentes concentraciones.

- Definir los parámetros apropiados para el enraizamiento de brotes de *A. perutilis*, evaluando el efecto de las auxinas ANA y AIB en diferentes concentraciones.

- Evaluar la proliferación *in vivo* de brotes y la inducción de raíces en mini esquejes de *A. perutilis*.

4. HIPÓTESIS

4.1 HIPÓTESIS NULA

H_0: No existen diferencias significativas entre los tratamientos que evalúan la acción de las citoquininas BAP y Kinetina en la proliferación *in vitro* de brotes de *A. perutilis.*

H_0: Los reguladores ANA e AIB no generan efecto significativo en el enraizamiento *in vitro* de los brotes de *A. perutilis*.

H_0: Los tamaños de los miniesquejes no tienen efecto significativo sobre la inducción *in vivo* de raíces y la proliferación de brotes en plantas donantes de *A. perutilis.*

4.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

H_1: Existen diferencias significativas entre los tratamientos que evalúan la acción de las citoquininas BAP y Kinetina en la proliferación *in vitro* de brotes de *A. perutilis.*

H_1: Los reguladores ANA e AIB generan efecto en el enraizamiento *in vitro* de los brotes de *A. perutilis*.

H_1: Los tamaños de los miniesquejes tienen efecto significativo sobre la inducción *in vivo* de raíces y la proliferación de brotes en las plantas donantes de *A. perutilis.*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Se dividió en dos fases; la fase *in vitro* realizada en el laboratorio y la Fase *in vivo*, realizada en condiciones de vivero.

FASE *in vitro*

5.1 Establecimiento *in vitro* de *Aniba perutilis*

5.1.1 Material vegetal

Se recolectaron frutos provenientes de árboles en estado de madurez, ubicados en relictos boscosos de los municipios de Támesis y Cocorná, Antioquia (Tabla 5-1). Los frutos fueron despulpados y las semillas fueron extraídas y almacenadas en papel periódico hasta su llegada al laboratorio.

Tabla 5-1. Sitios de colecta de los frutos de comino crespo.

Localidad	Altitud	Temperatura
Cocorná	1300-1400 msnm	23°C
Tamésis	1638 msnm	21°C

5.1.2 Desinfección de las semillas

Previo al proceso de desinfección, las semillas de comino crespo se limpiaron y lavaron muy bien con detergente comercial, después se sumergieron en una solución de Benlate® al 2% durante 60 minutos y se enjuagaron con agua destilada. En cabina de

flujo laminar se sometieron a una solución de etanol al 70% durante 3 minutos con su correspondiente lavado y se escarificaron mecánicamente (eliminación de la testa) con el fin de inducir su germinación. Para la desinfección, las semillas desnudas fueron tratadas con tres desinfectantes: Hipoclorito de sodio (NaOCl), Bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) y Nitrato de plata ($AgNO_3$) en concentraciones y tiempos diferentes. Con NaOCl se evaluaron tres concentraciones (5, 10 y 15%) en lapsos de 5, 10 y 15 minutos; en el caso del $HgCl_2$ se evaluaron dos concentraciones (0,1 y 0,01%) por 10 minutos y para $AgNO_3$ se evaluaron 0,1 y 0,5% por 5 minutos, para un total de 13 tratamientos.

Finalmente, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en condiciones *in vitro* para su germinación y posterior recolecta de explantes (Figura 5-1).

Figura 5-1 a) Frutos inmaduros, **b)** Semillas frescas, **c-d)** Semillas sembradas en medio de cultivo para su germinación *in vitro* Barra=1cm.

5.1.3 Medio y condiciones generales de cultivo

Con el fin de inducir la germinación *in vitro* de comino crespo, se empleó como medio base las soluciones minerales y vitaminas del medio WPM (Woody Plant Medium, Lloyd & McCown 1981) (Anexo 10-1), suplementado con 2% de sacarosa, 1,7gr de Phytagel®, 1g/L de Carbón Activado y 1 mg/L de BAP.

El pH se ajustó a 5,8 y el medio se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 120°C a 15 lb de presión durante 15 minutos. Una vez realizada la siembra en recipientes de vidrio con 20ml de medio, fueron incubados en cuartos de crecimiento con temperatura de 24 ±2°C, bajo fotoperíodo de 12 horas luz, con lámparas de luz blanca a una intensidad lumínica de 1500 lux aproximadamente. Aquellos explantes que no presentaron evidencia de contaminación, oxidación o muerte, fueron transferidos de medio cada cuatro semanas**.**

5.2 Multiplicación de brotes de *A. perutilis*

Las semillas que lograron sobrevivir y germinar exitosamente, fueron utilizadas como fuente de material vegetal para los ensayos de multiplicación. Para la inducción de múltiples brotes se empleó el medio WPM (Lloyd & McCown, 1981), suplementado con las citoquininas BAP y KIN en diferentes concentraciones (0; 1,5; 2,0 y 3,0 mg/L) (Tabla 5-2).

Tabla 5-2. Concentraciones (mg/L) de BAP y KIN empleadas para evaluar la multiplicación de brotes en *A. perutilis.*

Tratamiento		1	2	3	4	5	6	7	8	9
CITOQUININAS mg/L	BAP	1,0	1,5	2,0	3,0	-	-	-	-	0
	KIN	-	-	-	-	1,0	1,5	2,0	3,0	0

Adicionalmente, se evaluó el efecto de las auxinas ANA y AIA y la giberelina GA_3 en concentraciones de 1,0 y 1,5 mg/L en combinación con BAP (3mg/L) (Tabla 5-3).

Tabla 5-3. Concentraciones (mg/L) de BAP, AIA, ANA y GA_3 empleadas para evaluar la multiplicación de brotes en *A. perutilis.*

Tratamiento		1	2	3	4	5	6
Reguladores de crecimiento (mg/L)	**BAP**	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	AIA	1,0	-	-	1,5	-	-
	ANA	-	1,0	-	-	1,5	-
	GA_3	-	-	1,0	-	-	1,5

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de sales en la multiplicación de brotes de *A. perutilis*, se emplearon los medios MS (Murashige & Skoog, 1962) (Anexo 10-2) y WPM (Lloyd & McCown, 1981) con sus sales de macro y micronutrientes reducidas a la mitad y los reguladores de crecimiento BAP (4 mg/L) y AIA en concentraciones de 3,0 y 6,0 mg/L, según lo establecido por Jardim y colaboradores en 2010 para *Aniba rosaeodora* (Tabla 5-4).

Tabla 5-4. Tratamientos evaluados en la fase de multiplicación de *A. perutilis* utilizando MS½ y WPM½ y la combinación de BAP y AIA.

Tratamiento	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg/L)	
		BAP	AIA
1	**MS ½**	4	6
2		4	-
3		4	3
4		-	-
5	**WPM ½**	4	6
6		4	-
7		4	3
8		-	-

5.3 Enraizamiento de brotes de *A. perutilis*

Para la inducción de raíces en explantes de *A. perutilis*, brotes individuales fueron sembrados en medio WPM (Lloyd & McCown, 1981) con las auxinas ANA y AIB solas y en combinación en diferentes concentraciones (0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L) (Tabla 5-5).

Tabla 5-5. Combinaciones hormonales empleando ANA y AIB para la inducción de raíces en brotes de *A. perutilis.*

Tratamiento		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AUXINAS mg/L	ANA	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	-	-	-	-
	AIB	-	-	-	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	-

De la misma manera, siguiendo las combinaciones planteadas por Jardim y colaboradores en 2010 para el enraizamiento de brotes en *A. rosaeodora,* se evaluó el efecto de los medios de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) y WPM (Lloyd & McCown, 1981) con sus sales reducidas a la mitad y la acción de las auxinas AIA y ANA en concentraciones de 3 y 6 mg/L (Tabla 5-6).

Tabla 5-6. Tratamientos evaluados en la fase de enraizamiento de *A. perutilis* utilizando MS½ y WPM½ y la combinación de AIA y ANA.

Tratamiento	Medio de cultivo	AIA mg/L	ANA mg/L
1		3	3
2		-	6
3	**MS ½**	6	-
4		-	-
5		3	3
6		-	6
7	**WPM ½**	6	-
8		-	-

FASE *in vivo*

5.4 Crecimiento y desarrollo de *A. perutilis* en vivero

Partiendo de observaciones previas en las que se evidenció un patrón de crecimiento en las plantas de comino crespo establecidas en vivero y con el fin de confirmar dicho patrón, se identificaron y seleccionaron seis individuos a los cuales se les tomó datos de crecimiento apical (desde el último nudo de crecimiento hasta la base de la yema apical) y longitud promedio del último par de hojas (desde la base hasta el ápice de cada hoja) a intervalos semanales, para un total de 10 semanas.

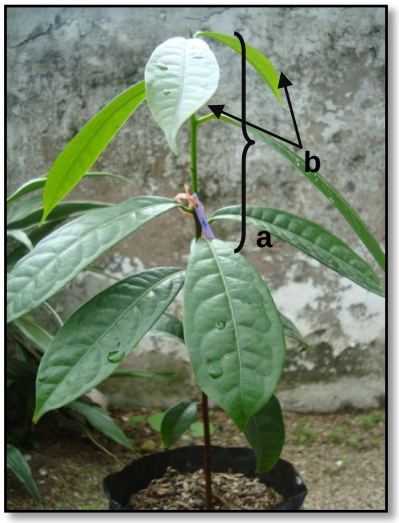


Figura 5-2. Evaluación del crecimiento de individuos de *Aniba perutilis* en condiciones de vivero **a.** Crecimiento apical. **b.** Long promedio último par de hojas.

5.5 Multiplicación *in vivo* de *A. perutilis*.

5.5.1 Material vegetal

Se sembraron semillas de comino crespo en vivero, en un sustrato compuesto por: Tierra: Arena: Cascarilla de arroz en proporción 3:1:1, de modo que una vez germinaran y se establecieran, pudieran ser utilizadas en la producción y enraizamiento de mini esquejes.

5.5.2 Inducción de brotes y enraizamiento de miniesquejes en *A. perutilis*

Cuando las plántulas alcanzaron tamaños homogéneos (longitud promedio 17 cm, aproximadamente cinco meses posteriores a la siembra) (Figura 5-3a), se realizaron cortes a diferentes distancia de la base de la planta, estos cortes se denominaron: *Distal* (entre 11-14 cm) (Figura 5-3b), *Medio* (7-8cm) (Figura 5-3c) y *Basal* (3-4cm) (Figura 5-3d), esto con el fin de obtener por un lado, plantas donantes y productoras de yemas axilares y por otro lado mini esquejes producto del corte.

Figura 5-3. Plantas de comino crespo **a)** antes del corte **b)** corte distal **c)** corte medio d**)** corte basal **e)** mini esquejes producto de los cortes realizados.

A las plantas donantes se les aplicó semanalmente 30ml de solución nutritiva suplementada con sales y vitaminas del medio líquido WPM, para estimular la brotación y crecimiento de las yemas axilares. Paralelamente, los mini esquejes resultantes de los cortes y los brotes producidos (aislados una vez alcanzaran la longitud deseada) fueron sumergidos en una solución enraizadora (AIB 5mg/L), luego sembrados en bolsas con turba previamente esterilizada y llevadas a cuartos de crecimiento bajo condiciones controladas, para así inducir la formación de raíces (Figura 5-3e). Una vez formada la raíz las plantas fueron trasladadas nuevamente a vivero para su aclimatación.

Se llevaron a cabo observaciones semanales y se registraron datos como tiempo de emergencia de los brotes, altura, diámetro; supervivencia y porcentaje de enraizamiento de los mini esquejes, con el fin de establecer relaciones entre los cortes evaluados.

5.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos realizados fueron desarrollados bajo un diseño completamente al azar, empleando cinco repeticiones por tratamiento (excepto en la fase de desinfección, donde 15 unidades experimentales y tres repeticiones por tratamiento fueron evaluadas), cada repetición representada por un frasco de cultivo con un explante. Se realizaron observaciones semanales y seguimiento fotográfico, se registraron datos como número de explantes sobrevivientes, número de explantes con brotes axilares, número de brotes por explante, longitud promedio de cada brote, presencia de raíz; así como también observaciones generales de cada tratamiento. Para comparar las diferencias y las interacciones entre los tratamientos a analizar, se realizaron Análisis de varianza con ayuda del paquete estadístico SAS/STAT® V.9.0 para Windows, verificando, en primer lugar la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza. En aquellos casos donde se encontró significancia en el análisis de varianza, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey.

Dada la disponibilidad de material vegetal los experimentos realizados fueron llevados a cabo con un número limitado de repeticiones. Esto fue tenido en cuenta para la interpretación de los resultados y puede ser considerada una fuente de variación.

6. RESULTADOS

6.1 Establecimiento *in vitro* de *Aniba perutilis*

En la fase de desinfección, el análisis de varianza reveló que existen diferencias significativas (p= 0,0001) entre los 13 tratamientos que evalúan la acción de tres desinfectantes y diferentes tiempos de exposición, sobre el porcentaje de supervivencia de las semillas de comino crespo (Tabla 6-1).

Tabla 6-1. Efecto de diferentes desinfectantes, concentraciones y tiempos de exposición empleados en el establecimiento in vitro de comino crespo.

TTO	DESINFECTANTE	CONCENTRACIÓN (%)	TIEMPO (min)	SUPERVIVENCIA (%)*
1	Hipoclorito de Sodio NaOCl	**5**	5	6,67±1,72 [d]
2			10	11,11±2,63 [d,c]
3			15	15,56±2,63 [d]
4		**10**	5	35,56±3,58 [b,d,c]
5			10	35,56±2,63 [b,d,c]
6			15	46,67±1,72 [b,a,c]
7		**15**	5	28,89±1,99 [d,c]
8			10	64,44±2,63 [b,a]
9			15	66,67±1,72 [a]
10	Bicloruro de mercurio $HgCl_2$	**0,1**	10	22,22±3,58 [d,c]
11		**0,01**		8,89±2,63 [d]
12	Nitrato de Plata $AgNO_3$	**0,1**	3	13,33±3,44 [d]
13		**0,5**		35,56±2,63 [b,d,c]

*Estos datos representan las medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos. Las medias seguidas por la mismas letras no son significativamente diferentes (p=0.05) usando la prueba de Tukey.

Los tratamientos ocho (15% por 15 min) y nueve (15% por 10 min) que emplean Hipoclorito de sodio permitieron obtener el mayor porcentaje de explantes libres de microorganismos patógenos (66,67 y 64,44% respectivamente) (Tabla 6-1). Por su parte, el uso de bajas concentraciones de Hipoclorito, Bicloruro de mercurio y Nitrato de plata, generaron los porcentajes de supervivencia de explantes más bajos (Tratamientos 1,2, 11 y 12) (Tabla 6-1).

Dentro de los agentes contaminantes presentes, los más frecuentes fueron *Colletotrichum gloeosporoides* y *Penicillium* sp. (identificación realizada en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín), su aparición fue evidente entre 8 y 10 días después de la siembra; se observó inicialmente un halo de contaminación en la base del explante, que luego proliferó alrededor del mismo. De igual manera, en algunas de las semillas empleadas en este estudio, se observó la testa perforada; al realizar la disección, se encontró en su interior el estado larval de un coleóptero (*Curculionidae spp.*) afectando el endospermo y ejerciendo daño el embrión cigótico (Figura 6-1). Este fenómeno limitó la introducción *in vitro* del material vegetal, pues bien o era descartado por su estado avanzado de descomposición o, se contaminaba rápidamente en el medio de cultivo.

Figura 6-1. Semillas de comino crespo después del ataque del escarabajo picudo (*Curculionidae*). Barra=1cm.

El medio de cultivo empleado para la germinación (WPM-1mg/L BAP) reportado anteriormente por García y Hoyos (en prensa) favoreció el normal desarrollo de las plántulas *in vitro* (Figura 6-2a). Con referencia a la velocidad del proceso de germinación *in vitro* los datos evidencian que fue similar al encontrado en condiciones naturales, que como lo reporta CORANTIOQUIA (2007), se presenta entre 45 y 60 días después de la siembra, es hipogea y es usual que de una misma semilla se desarrollen varias plúmulas

(que posteriormente generarán las hojas) (Figura 6-2b).

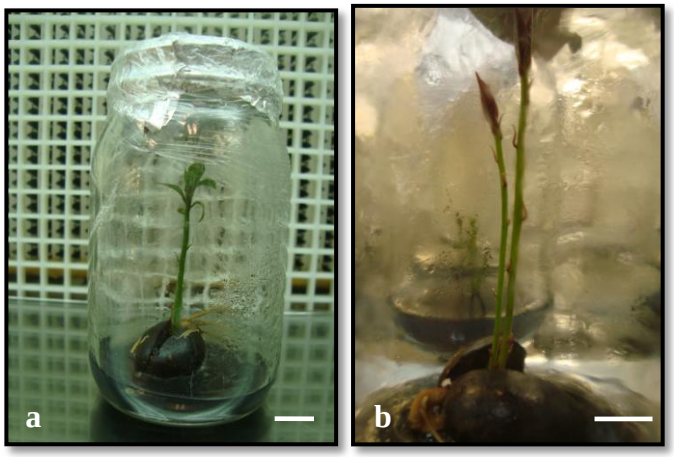


Figura 6-2. a) Germinación *in vitro* de semilla de comino crespo **b)** Emergencia de varias plúmulas en semillas cultivadas *in vitro.* Barra=1cm.

6.2 Multiplicación *in vitro* de brotes de *A. perutilis*

Los nueve tratamientos en los que se evalúa el efecto de las citoquininas BAP y KIN sobre el número (0,2089) o longitud promedio de los brotes (0,1346) no reflejaron diferencias significativas, debido probablemente al bajo número de unidades experimentales empleadas; pero es importante señalar que el uso de 3mg/l de BAP permitió obtener mayor número promedio de brotes (0,6) y mayor longitud promedio de brotes (0,54) (Tabla 6-2) (Figura 6-3a).

Tabla 6-2. Efecto de diferentes concentraciones de BAP y KIN en la inducción de múltiples brotes en *A. perutilis* en medio WPM.

Citoquininas (mg/l)		% Explantes con respuesta	Número de brotes /explante*	Longitud brote (cm)*
BAP	**KIN**			
1,0	**-**	40	0,4±0,24	0,2±0,12
1,5	**-**	40	0,4±0,24	0,32±0,19
2,0	**-**	60	0,6±0,24	0,5±0,21
3,0	**-**	60	0,6±0,24	0,54±0,26
-	**1,0**	0	0	0
-	**1,5**	20	0,2±0,2	0,1±0,1
-	**2,0**	0	0	0
-	**3,0**	20	0,2±0,2	0,14±0,12
0	**0**	0	0	0

*Estos datos representan las medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos.

Mientras tanto, el uso de KIN en concentraciones de 1 y 2mg/L, generó los valores más bajos en ambas variables (Tabla 6-2) (Figura 6-3b).

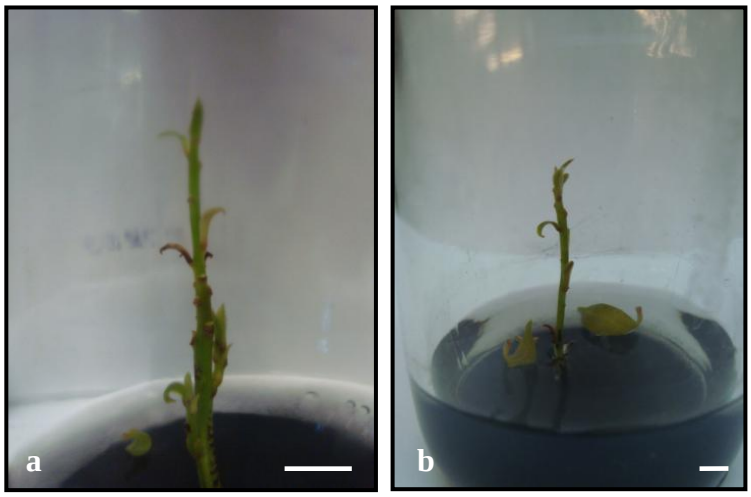


Figura 6-3. Efecto de **a)** 3mg/L de BAP **b)** 3mg/L de KIN en la multiplicación de brotes de *A. perutilis.* Barra=1cm.

Al evaluar la acción combinada de BAP con AIA, ANA o con GA_3 sobre la regeneración de brotes de comino crespo, el anova realizado no arrojó diferencias significativas con respecto a las variables número promedio de brotes (0,205) y longitud de brotes (0,120); sin embargo, fue posible observar que el uso de 3mg/L de BAP y 1mg/L de GA_3 generó un aumento en el número promedio de brotes (1,2) con respecto al primer experimento (Tabla 6-3). Al analizar los datos correspondientes a la longitud promedio de brotes se observó que el tratamiento suplementado con 3 mg/L de BAP y 1,5mg/L de GA_3 permitió un mayor crecimiento de los brotes con respecto a los demás tratamientos evaluados (0,82cm) (Figura 6-4).

Tabla 6-3. Efecto de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP AIA, ANA y GA_3 en la inducción de múltiples brotes de *A. perutilis* en medio WPM.

Reguladores de crecimiento (mg/L)				% Explantes con Respuesta	Número de brotes /explante*	Longitud brote (cm)*
BAP	**AIA**	**ANA**	**GA_3**			
3,0	1,0	-	-	20	0,2±0,2	0,14±0,14
3,0	-	1,0	-	20	0,2±0,2	0,26±0,26
3,0	-	-	1,0	80	1,2±0,49	0,646±0,26
3,0	1,5	-	-	40	0,4±0,24	0,16±0,1
3,0	-	1,5	-	40	0,4±0,24	0,32±0,19
3,0	-	-	1,5	60	0,6±0,24	0,82±0,37

*Estos datos representan las medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos.

Figura 6-4. Efecto de BAP (3,0 mg/L) en combinación con GA_3 (1,5mg/L) sobre la elongación de los brotes de comino crespo. Barra=1cm.

Con respecto a los tratamientos en los que se evalúa el efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo así como el efecto del BAP y AIA sobre el número y longitud promedio de brotes, los resultados del ANOVA no reflejaron diferencias significativas (valor p=0,8361 y 0,8526 respectivamente). El tratamiento tres, correspondiente a MS½ más BAP 4mg/L y AIA 3mg/L produjo un número de brotes de 0,6 y una longitud de brote de 0,37cm; por su parte el tratamiento cuatro (WPM½, BAP 4mg/L y AIA 6mg/L) produjo un número de brotes de 0,4 y una longitud de 0,6cm (Tabla 6-4); valores que no superan los resultados previamente obtenidos.

Tabla 6-4. Efecto de MS½ y WPM½ y los reguladores de crecimiento BAP y AIA sobre la inducción de múltiples brotes en *A. perutilis*.

Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg/L)		% Explantes con respuesta	Número de brotes /explante	Longitud brote (cm)
	BAP	AIA			
MS ½	4	6	20	0,2±0,2	0,38±0,38
	4	-	20	0,2±0,2	0,16±0,16
	4	3	60	0,6±0,4	0,37±0,26
	-	-	20	0,2±0,1	0,1±0,1
WPM ½	4	6	40	0,4±0,24	0,6±0,46
	4	-	20	0,2±0,2	0,18±0,18
	4	3	20	0,4±0,4	0,11±0,11
	-	-	0	0	0

*Estos datos representan las medias ± error estándar de cada uno de los tratamientos.

La ausencia de significancia estadística no impide indicar como resultado de los experimentos realizados, que entre las combinaciones evaluadas, la respuesta óptima en términos de regeneración de brotes se obtuvo adicionando 3mg/L de BAP y 1,5mg/L de GA_3 (Figura 6-5).

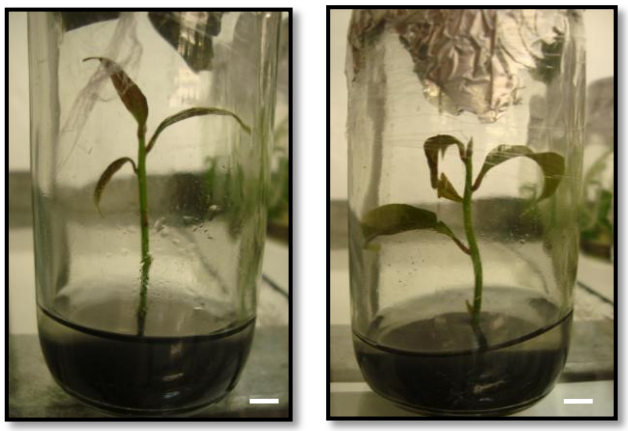


Figura 6-5. Plántulas *in vitro* de comino crespo en medio de establecimiento (3mg/L BAP + 1,5mg/L GA_3). Barra=1cm.

6.3 Enraizamiento de brotes de *A. perutilis*

Los brotes de *A. perutilis* presentaron una baja capacidad de enraizamiento, ya que no se evidenció la aparición de primordios radicales en ninguna de las combinaciones hormonales empleadas, aún en medios libres de reguladores de crecimiento, sólo se observó la formación de callo alrededor de la base del explante (Figura 6-6).

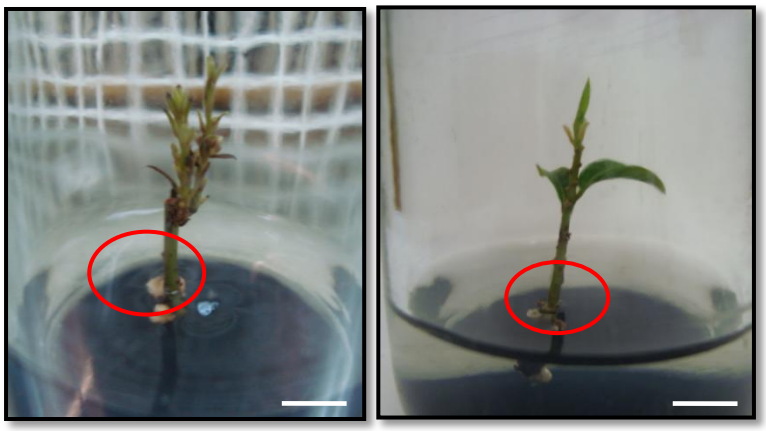


Figura 6-6. Formación de callo en la base de los explantes de comino crespo en respuesta a los tratamientos enraizadores. Barra = 1cm.

6.3 Crecimiento y desarrollo de *Aniba perutilis* en vivero

En relación a el seguimiento del proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas de comino crespo establecidas en vivero, los resultados sugieren dos estados; uno de "dormancia" de las yemas apicales (Figura 6-7a), seguido de un período de crecimiento activo en el ápice (6-7b).

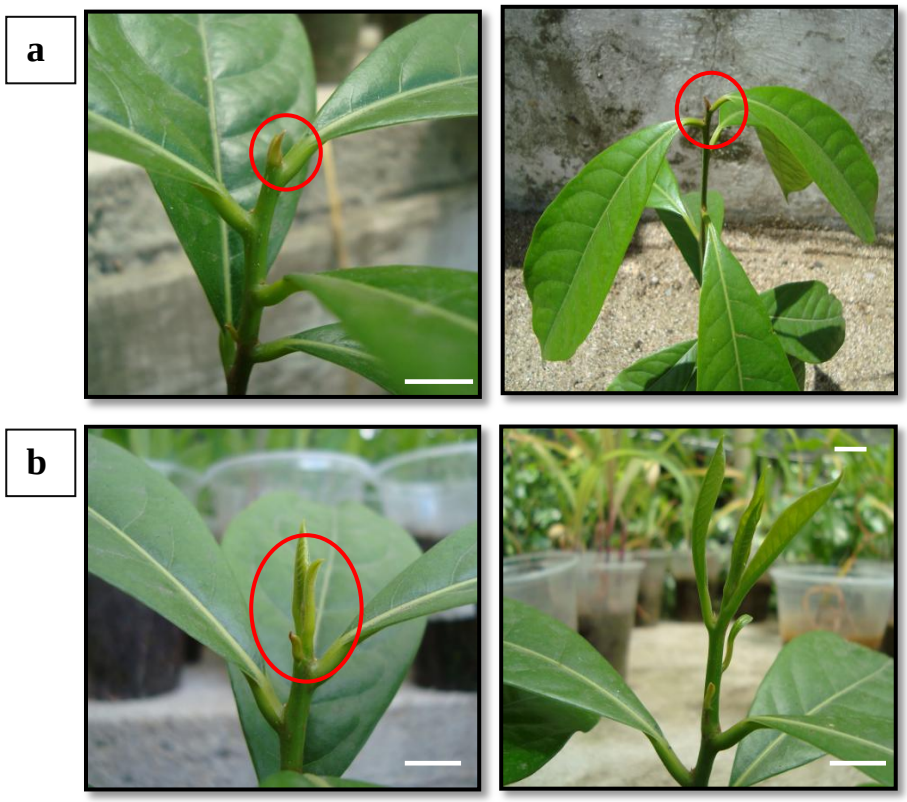


Figura 6-7. a) Ápice del tallo "dormante" **b)** Ápice del tallo en período de crecimiento activo y desarrollo de hojas jóvenes. Barra = 1cm

Los datos obtenidos para las plantas evaluadas, demuestran entre la primera y la cuarta semana un crecimiento longitudinal detenido (Figuras 6-7a y 6-8), etapa en la que paralelamente hay un desarrollo foliar representado en un incremento en la longitud promedio de las hojas (Figuras 6-7a y 6-8).

A partir de la cuarta semana es evidente en algunas plantas que a medida que empieza a incrementar la longitud del ápice (Figura 6-7b), se observa la aparición de nuevas hojas (reflejado en la drástica reducción en la curva de crecimiento) y la elongación de éstas de manera simultánea (Figuras 6-7b y 6-8).

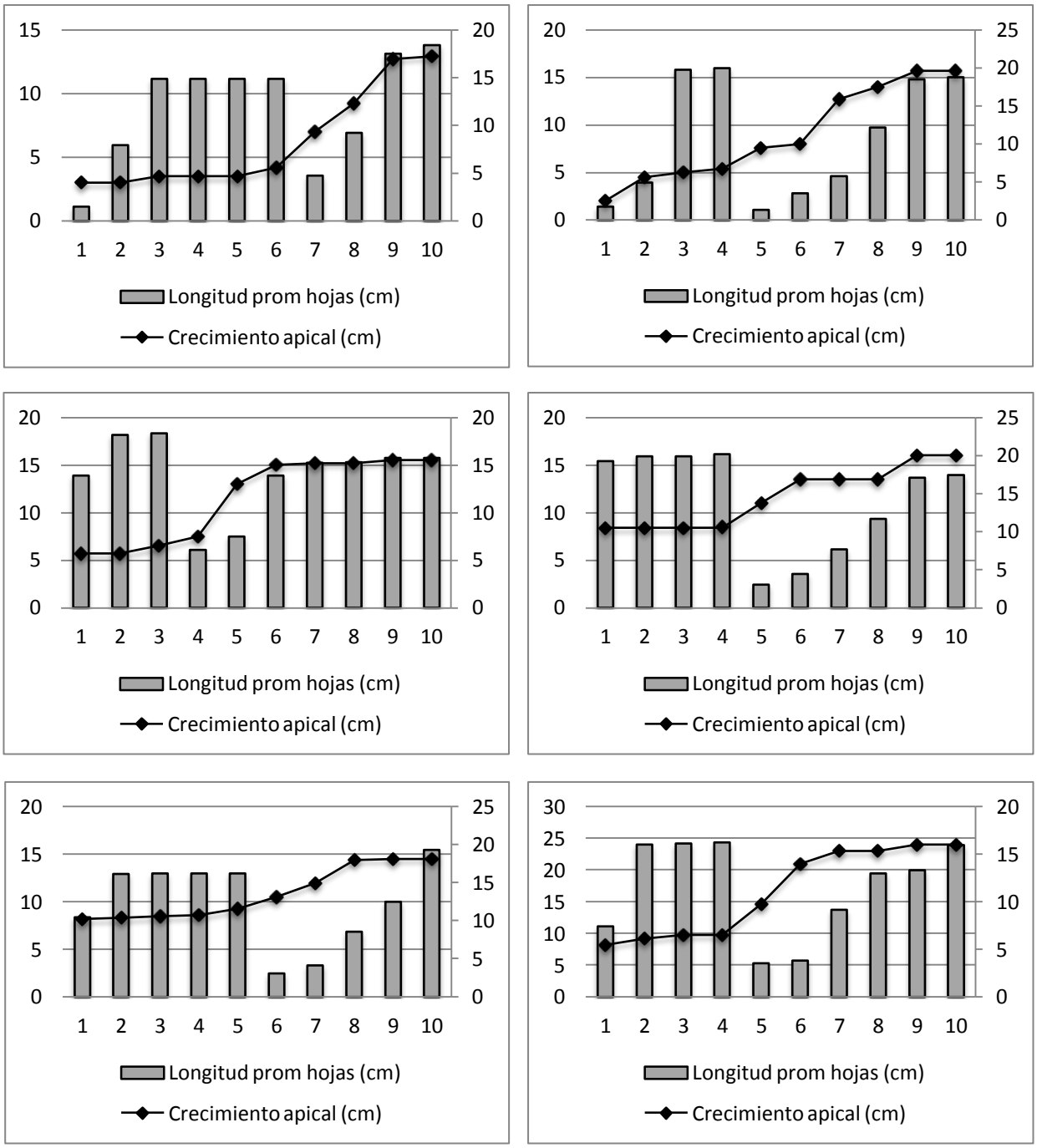


Figura 6-8. Seguimiento del crecimiento apical (cm) y desarrollo foliar (cm) durante 10 semanas a seis plantas de comino crespo, establecidas en vivero.

6.4 Multiplicación *in vivo* de *A. perutilis*.

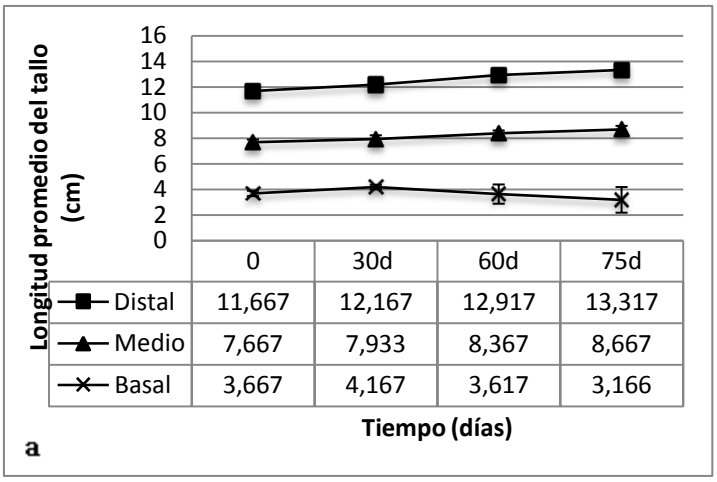
Los cortes realizados a las plantas de vivero, generaron una respuesta diferencial tanto en la longitud del tallo, número y longitud de los brotes; como en la capacidad de enraizamiento de los mini esquejes producidos.

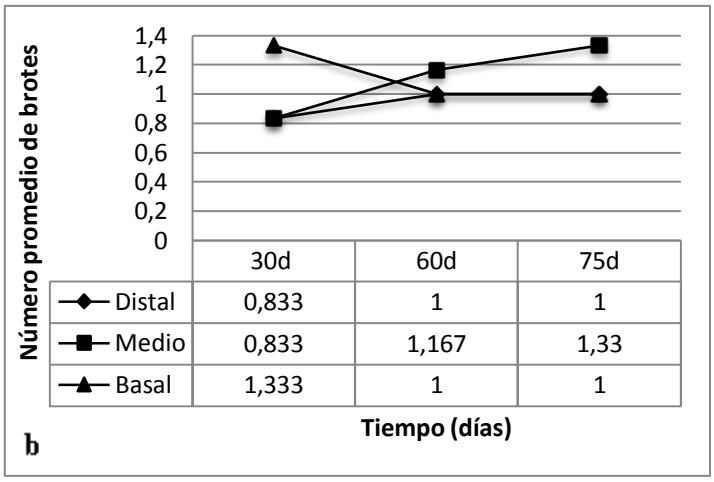
Con respecto a la longitud promedio del tallo de las plantas donantes de comino, 30, 60 y 75 días después de la decapitación aumentó levemente en los tratamientos Distal y Medio (Figura 6-9a), la disminución observada en las plantas cuyo corte fue Basal, después de 60 días podría ser atribuida a la muerte de dos de las repeticiones empleadas (Figura 6-9a).

En términos de número promedio de brotes producidos, 30 días post-corte, las plantas donantes cuyo corte se realizó basalmente, generaron mayor número de brotes (1,33) (Figuras 6-9b y 6-10a); sin embargo, como se aclaraba previamente, la muerte de dos las repeticiones empleadas ocasionó que 60 y 75 días post corte este número no aumentara como se esperaba.

Por su parte, las plantas donantes correspondientes al corte Medio a los 60 y 75 d post-corte evidenciaron un aumento en el número de brotes (1,16 y 1,33 respectivamente) (Figura 6-9b y 6-10b). Las plantas del corte basal y distal presentaron en promedio un brote por planta (Figura 6-9b).

En lo que respecta a la longitud promedio de brotes por planta, las plantas del corte Medio generaron brotes más largos 30, 60 y 75 días post-corte (2,22; 3,40 y 3,65cm) (Figura 6-9c y 6-10b); los valores más bajos para esta variable los presentaron las plantas del corte Basal (1,36; 2,71 y 2,81cm) (Figura 6-9c). Las plantas del corte Distal, 75 días post-corte presentaron un aumento en ésta variable (3,93cm) (Figura 6-9c y 6-10c).





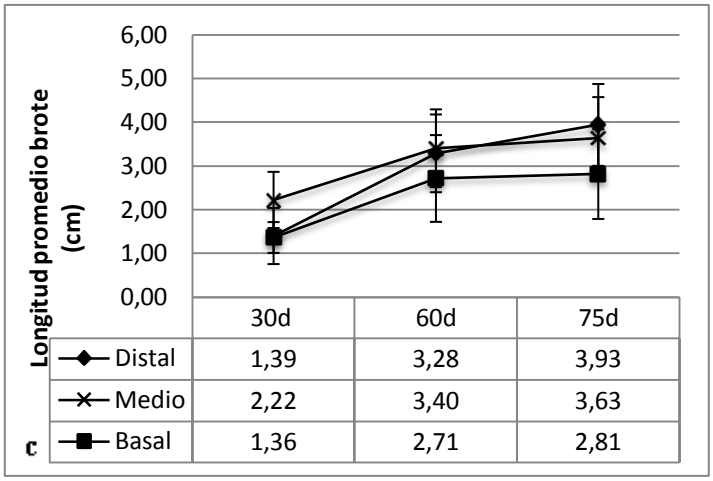


Figura 6-9. a) Longitud promedio del tallo (cm). **b)** Número promedio de brotes por planta. **c)** Longitud promedio de brotes (cm) en plantas donantes de comino crespo 30, 60 y 75 días después de la realización de cortes a diferentes alturas (Distal, Media y Basal).

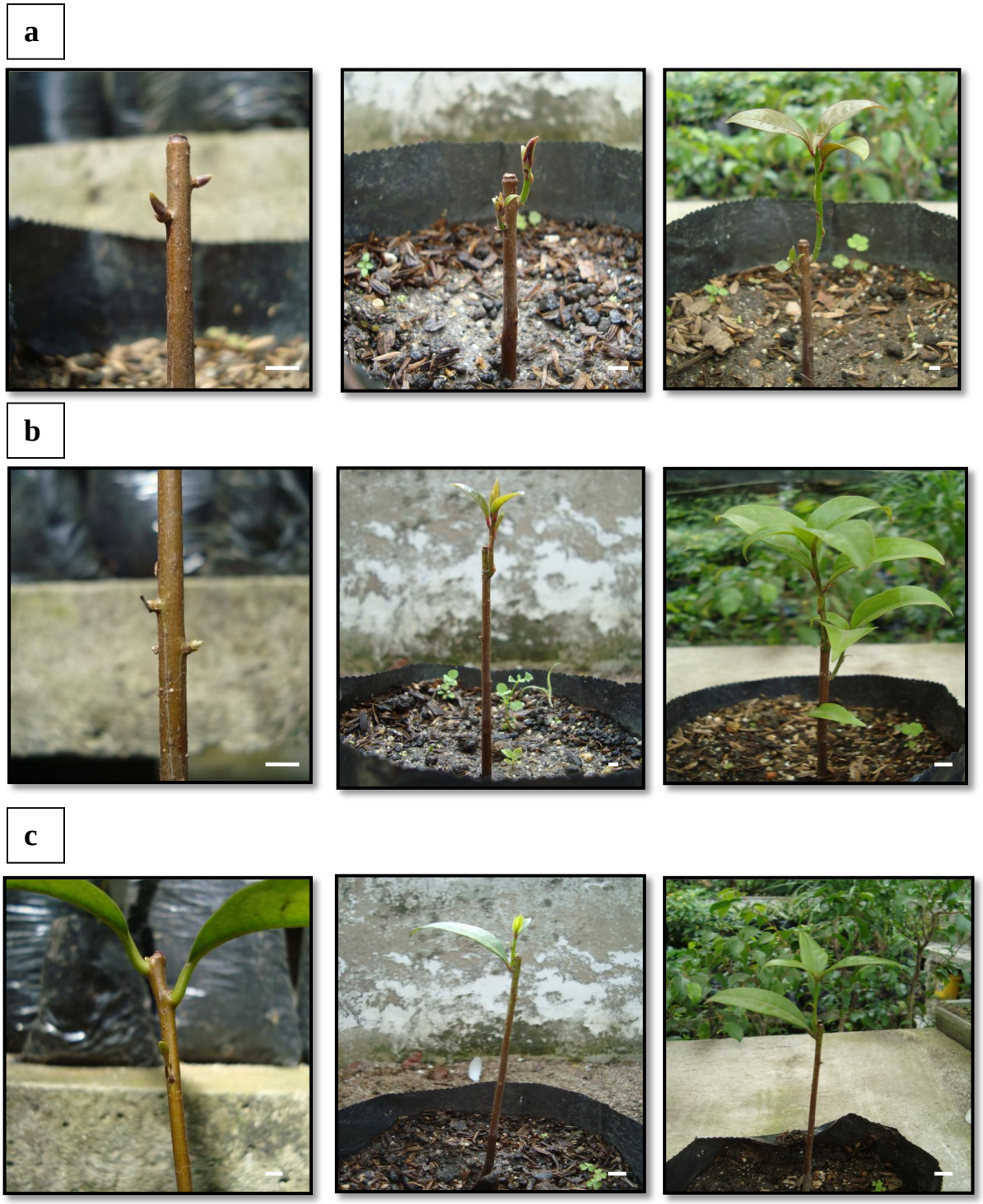


Figura 6-10. Plantas de comino crespo 30, 60 y 75 días después de la decapitación **a)** Basal, **b)** Medio y **c)** Distal. Barra = 1cm.

Por otra parte, la aparición de raíces fue evidente en los mini esquejes, aproximadamente 90 días posteriores al corte (Figura 6-11), los mini esquejes producto de los cortes Distal y Medio presentaran mayor capacidad de enraizamiento (Tabla 6-5, Enraizamiento= 75%).

Figura 6-11. Presencia de raíces en mini esquejes de comino crespo antes de su traslado a vivero. Barra = 1cm.

Tabla 6-5. Porcentaje de mini esquejes enraizados según el tipo de corte realizado a la plántula donante.

Altura del corte	Mini esquejes enraizados	Enraizamiento (%)
Distal	9	75
Medio	9	75
Basal	5	50

Por su parte, el acondicionamiento en vivero de los mini esquejes productos de los diversos cortes se llevó a cabo de manera exitosa con 100% de supervivencia (Figura 6-12).

Figura 6-12. Mini esquejes de comino enraizados y exitosamente establecidos en condiciones de vivero.

7. DISCUSIÓN

7.1 Material vegetal y establecimiento *in vitro*

Teniendo en cuenta la importancia de las especies forestales nativas colombianas en el área comercial o industrial y siendo el comino crespo una de ellas, reportada en peligro de extinción, debido principalmente a su sobreexplotación, se hace imperativa la búsqueda de alternativas que conlleven a la obtención de protocolos de regeneración masiva de individuos.

El uso de semillas con fines de propagación y conservación de la diversidad genética de una especie, se ha constituido como uno de los métodos más empleados cuando de técnicas convencionales se trata, no obstante, la aplicación del cultivo *in vitro* a éste proceso puede contribuir a su optimización. En este trabajo, con el fin de obtener explantes aptos para la propagación en laboratorio se recurrió a la germinación *in vitro* de comino crespo.

En el cultivo *in vitro* de plantas, uno de los principales problemas es la enorme dificultad para establecer los explantes en condiciones asépticas y lograr brotación, debido a la alta incidencia de contaminación fúngica y bacteriana (Leifert *et al*., 1999; Leifert y Casells, 2001; Vidales Fernández, 2002). Éstos contaminantes pueden ser introducidos con el explante, durante manipulación en el laboratorio o a través de algunos vectores.

Los resultados obtenidos en la etapa de esterilización del material vegetal, permiten consolidar el uso del hipoclorito de sodio como uno de los desinfectantes más útiles en el cultivo de tejidos vegetales, pues generó los porcentajes de supervivencia más altos, con respecto a los demás tratamientos; precisamente, las soluciones con cloro son empleadas regularmente por su seguridad, adecuado costo, simplicidad de uso, rápida acción y gran espectro antimicrobiano. De hecho el hipoclorito de sodio es el

desinfectante a base de cloro más empleado en micropropagación (Pedroza y Tibocha, 2008).

Estos datos pueden ser contrastados con reportes de contaminación superiores a 90% en especies leñosas como *Psidium guajaba* (Viloria *et al*., 1993), *Erythrina fusca y E. poeppigiana* (Jímenez-Bonilla, 1990), caoba y cedro (Abdelnour y Muñoz, 1997); aún empleando fungicidas en la pre-desinfección, los porcentajes de asepsia no superaron el 70%. Chung y Carrasco (1998), comprobaron que una mezcla de fungicidas (Benlate®-Captan®) e Hipoclorito de sodio al 10% por 20 y 30 min permitió mantener niveles de asepsia mayores al 70 % en *Salix* sp. Esto pone en evidencia que el proceso de desinfección de cualquier tipo de explante y en particular de los provenientes de plantas leñosas, ha sido una de las limitantes más severas en el establecimiento *in vitro* de éstas especies.

Los principales contaminantes que afectan las plantas *in vitro*, son las bacterias y los hongos, éstos son muy comunes en condiciones *in vivo* y pueden llegar a tener efectos devastadores en condiciones *in vitro* (Skirvin *et al.,* 1999). Precisamente, debido al uso de medios de cultivo enriquecidos con sustancias nutritivas y azúcar se aumenta la susceptibilidad de los explantes a estos microorganismos.

A pesar de las altas concentraciones, los tiempos prolongados en los que se emplearon los desinfectantes, enjuagues previos con fungicidas y el uso de antibióticos de amplio espectro; la incidencia de contaminación bacteriana y fúngica fue persistente. En algunos casos, los microorganismos sobrevivientes en la superficie de los explantes pudieron no ser evidentes inicialmente, pero crecieron posteriormente alrededor de los explantes, ésta expresión tardía en algunas semillas sanas después de varios sub-cultivos permite catalogarlos como microorganismos endógenos, asociados a la naturaleza del árbol parental.

La presencia de frutos perforados de comino como la observada durante la realización de éste trabajo, ha sido reportado con anterioridad, en diferentes regiones de Antioquia, en 1998, en el Seminario Regional de Especies Vegetales promisorias, se propuso como agente causante de este fenómeno al gusano “cogollero blanco”, el mismo que ataca las semillas de roble, igualmente, se planteó que puede afectar su germinación. Más adelante, CORANTIOQUIA (2007), plantea que los frutos de comino son atacados desde que están en el árbol por un escarabajo picudo del género *Heilipus sp.*, familia

Curculionidae; sus larvas se alimentan de la semilla y alcanzan allí su desarrollo completo. Como ocurre en este estudio, se observa que algunas de las semillas que no presentaron ataque muy severo logran germinar, sin embargo, las plántulas mueren rápidamente porque el daño previo en la semilla pudo haber favorecido la introducción de agentes patogénos que alteraron la viabilidad, germinación y/o desarrollo del embrión.

En lo que se refiere al fenómeno de oxidación en la etapa de establecimiento del material vegetal, se observó que los medios de cultivo en los que fueron inoculadas las semillas de comino, principalmente, aquellos casos en los que la germinación no fue observada, se tornaron de color marrón, indicando la presencia de compuestos fenólicos. Jiménez-Bonilla (1990), reporta que cuando la testa es removida se genera daño en los tejidos y los compuestos fenólicos que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastidios y otros orgánulos donde están confinadas las polifenoloxidasas y aparece la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación.

En especies leñosas, particularmente, el establecimiento *in vitro* de tejidos está limitado en gran parte por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo, constituyéndose en uno de los problemas más frecuentes en el mantenimiento de un tejido *in vitro* (George *et al*., 2008; Azofeifa, 2009). En este caso, la adición de 1mg/L de carbón activado al medio de cultivo, reportado por García y Hoyos (en prensa) para *A. perutilis*, favoreció la absorción de estas sustancias tóxicas, por lo que este fenómeno no fue un factor limitante durante el proceso. El efecto benéfico del CA también ha sido reportado para especies forestales como *Sequoiadendron giganteim* (Bon *et al.* 1988), *Hevea brasiliensis* (Seneviratne y Wijesekara 1996) y *Anacardium occidentale* (Aliyu 2005) y se atribuye a su capacidad para remover y absorber sustancias tóxicas del medio de cultivo.

7.2 Multiplicación *in vitro* de brotes de *A. perutilis*

Las citoquininas se utilizan frecuentemente para inducir la multiplicación de brotes *in vitro*, dado su efecto opuesto a la dominancia apical favorecida por auxinas. La tasa de multiplicación de brotes se puede optimizar sustancialmente con la adición en el medio nutritivo de concentraciones apropiadas de citoquininas con o sin auxina (Fay, 1992). En

este trabajo en un primer experimento, se emplearon dos compuestos con actividad citoquinina: BAP y KIN.

En cada una de las pruebas realizadas el tratamiento control (en ausencia de reguladores de crecimiento) no favoreció la producción ni el crecimiento de los brotes, evidenciando que la presencia de citoquinina en el medio es determinante para la etapa de multiplicación. Precisamente, los tratamientos que presentaron los mayores valores de brotación estaban suplementados con BAP, coincidiendo con lo señalado por Cline, 1996; Roca y Mroginski, 1998 y George *et al*., 2008; que confirman que para obtener morfogénesis, iniciación y crecimiento de brotes se requiere la presencia de ésta citoquinina.

El BAP es responsable de romper la dominancia apical e inducir la proliferación de yemas axilares en explantes cultivados *in vitro,* en este estudio el uso de 3mg/L de BAP, en comparación con las concentraciones evaluadas de KIN, fue clave en la inducción de brotes en *A. perutilis*. De igual manera, Arrillaga *et al.,* 1991; Castro *et al.,* 1993; Pérez, 2001 y Babu *et al*., 2003, reportan la efectividad del BAP sobre la KIN en la proliferación de brotes.

La multiplicación de los brotes puede estar influenciada por el genotipo del explante, en general los explantes empleados fueron difíciles de propagar, dado que se formaron brotes que no presentaron elongación significativa; es posible que el lento crecimiento de los brotes pueda ser debido a un desbalance en el nivel endógeno de citoquininas o auxinas, lo que puede resultar inhibidor para su crecimiento (Gomes y Canhoto, 2009). Por este motivo, se adoptaron alternativas en las concentraciones hormonales e incluso la adición de giberelinas, con el fin de optimizar el proceso y obtener resultados más eficaces. En este trabajo, el uso de GA_3 como regulador hormonal en combinación con BAP permitió la elongación de los brotes *in vitro*; en contraste, el uso de auxinas no favoreció los procesos de crecimiento y desarrollo de los explantes *in vitro*. Estos resultados son similares a los reportados por Vengadesan y Pijut, (2009) en explantes de *Quercus rubra, Q. leucotrichophora* y *Q. glauca*, en los que el uso combinado de BAP (5mg/L) y GA_3 (1mg/L) fue esencial para inducción y crecimiento eficiente de brotes.

El uso de medios nutritivos reducidos en concentración de sales favorece en muchas especies el desarrollo de yemas, en *Q. rubra* y en otras especies de *Quercus* sp. permitió el aumento en la inducción de brotes (Vengadesan y Pijut, 2009); de igual

manera Jardim y colaboradores, (2010) reportan que el medio MS a la mitad de su fuerza iónica y suplementado con BAP 4mg/L y AIA 6mg/L, estimuló la formación de un mayor número de brotes en *Aniba rosaeodora*; contrastando con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que el medio de cultivo y las combinaciones hormonales no beneficiaron la aparición y crecimiento de brotes en comparación con los demás experimentos realizados; no obstante, se deber tener en cuenta que el efecto de las sales minerales depende en gran parte de la especie utilizada.

Por otra parte, la necrosis apical en los brotes es considerada como un desorden fisiológico común en algunas especies forestales cultivadas *in vitro* (Vengadesan y Pijut, 2009) que puede llegar a causar la muerte del explante generando severas pérdidas; algunos de los explantes cultivados de *A. perutilis* exhibieron esta característica (Figura 7-1), pero su detección a tiempo, corte e inmediato sub-cultivo, logró contrarrestar éstos efectos.

Figura 7-1. Necrosis apical en explantes de *A. perutilis* Barra = 1cm.

Este tipo de necrosis ha sido asociada con un complejo conjunto de factores que van desde la formulación de sales, reguladores de crecimiento, uso de aditivos como carbono activado, fuente de azúcar, entre otros (Chiruvella *et al*., 2011).

7.3 Enraizamiento *in vitro* de brotes de *A. perutilis*

A pesar de las combinaciones de reguladores de crecimiento empleadas, los explantes de *A. perutilis* cultivados *in vitro* no emitieron raíces, en algunos de éstos fue evidente en cambio, la aparición de una masa callogénica en la base del tallo (Figura 6-6). Se debe

considerar que no siempre las auxinas naturales o sintéticas pueden inducir enraizamiento en explantes *in vitro*, algunas especies de plantas, principalmente las leñosas, enraízan con dificultad o no enraízan en presencia de éstas, indicando que otros factores pueden influenciar la formación de primordios radicales, como lo plantean Arrillaga y colaboradores, 1999 y Jardim y colaboradores, 2010.

Factores como el genotipo, el estado fisiológico del tejido, la concentración de reguladores de crecimiento, el número de sub-cultivos, las condiciones del medio de cultivo, entre otros, pueden estar involucrados en éste proceso, llegando a variar entre diferentes especies e incluso dentro de la misma especie o cultivar (Arrillaga *et al* 1991; Gomes y Canhoto, 2009). Por esta razón, es indispensable realizar más estudios para establecer si acciones correctivas sobre éstos factores puedan aumentar el enraizamiento de brotes de *A. perutilis.*

Una planta o una fase del desarrollo de ésta puede ser calificada como recalcitrante al cultivo de tejidos, cuando a pesar de manipular las condiciones del cultivo (concentración de sales, nitrógeno, reguladores de crecimiento, entre otros) no produce la respuesta deseada (Bonga y Klimaszwewska, 2010; Benson, 2000). Debido a que los ensayos realizados en este trabajo variaron en cuanto al tipo, concentración y combinaciones de reguladores de crecimiento empleadas, se asume que la recalcitrancia, puede ser la explicación más viable para los resultados obtenidos. Este fenómeno pudo verse favorecido por el estrés al que los explantes se vieron sometidos al ser sembrados *in vitro*; como lo planteó Benson (2000), la introducción de plantas en el cultivo de tejidos induce cambios en su metabolismo, fisiología y desarrollo, generando la aparición de disturbios metabólicos que conducen eventualmente a la pérdida de totipotencialidad celular y ausencia de respuesta; y en algunos casos a un elevado nivel de necrosis y finalmente a la muerte. Merkle y Nairn, (2005) exponen la dificultad en el enraizamiento como uno de los elementos más limitantes al momento de propagar *in vitro* especies forestales; así mismo, la baja proliferación de brotes, excesiva producción de fenoles, formación de callos basales, necrosis apical son sucesos muy frecuentes durante este proceso.

Teniendo en cuenta la baja tasa de multiplicación, el lento crecimiento *in vitro* de las plántulas y que los resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento, no se ajustaron a lo esperado, se procedió a la búsqueda de una metodología que favoreciera la

propagación clonal de la especie, considerando algunos aspectos fisiológicos implicados en el crecimiento, la rebrotación y el enraizamiento de las plantas en condiciones de vivero.

7.4 Crecimiento y desarrollo de *A. perutilis* en vivero

Los resultados obtenidos de las mediciones evaluadas (crecimiento apical y longitud promedio de hojas) confirman que el crecimiento longitudinal en las plantas puede involucrar dos etapas: una elongación de los meristemos apicales y los nodos adyacentes; así como la formación de unas pocas hojas, después de un período de dormancia ("crecimiento fijo"). Estos brotes dormantes a su vez pueden reanudar su desarrollo en respuesta a su programa genético o a estímulos ambientales y estar influenciados por la acción de citoquininas y auxinas (Shimizu-Sato y Mori, 2003; Ongaro y Leyser, 2008).

Resulta de gran importancia reconocer estos períodos de crecimiento en las plantas, ya que pueden ser útiles en la implementación de técnicas de propagación clonal de la especie, por ejemplo al momento de determinar épocas adecuadas de corte, en las cuales el crecimiento longitudinal del ápice esté activo y no en etapa dormante. Sin embargo, es indispensable realizar un seguimiento más detallado, que incluya un mayor número de plantas, más variables evaluadas y mayor tiempo de estudio, con el fin de establecer parámetros fisiológicos que permitan comprender el comportamiento de estas plantas y su consecuente aplicación en programas de propagación.

7.5 Multiplicación *in vivo* de *A. perutilis*.

Partiendo del concepto de que el meristemo apical de la plantas inhibe el crecimiento de los brotes axilares más próximos a él, y que su remoción (decapitación) estimula el crecimiento y desarrollo de las yemas dormantes (Cline, 1997; Shimizu-Sato y Mori, 2003), se evaluó el efecto de tres niveles de corte en plantas de comino crespo establecidas en vivero (distal, medio y basal) en términos de brotación. Así mismo, se determinó la acción (según el tipo de corte) de las auxinas presentes en la zona apical y su efecto en la capacidad de enraizamiento de los brotes decapitados.

Los resultados obtenidos evidencian un efecto diferencial tanto en la producción de brotes como en la formación de raíces, probablemente determinados por la relación auxina–citoquinina. Considerando que las auxinas son sintetizadas en el ápice de la planta y en las hojas jóvenes en expansión, la remoción del ápice o decapitación de la planta madre, remueve una importante fuente de éstas, por lo que las citoquininas empiezan a intervenir en el proceso (Cline, 1997). En consecuencia estas hormonas, sintetizadas en la raíz, son transportadas a lo largo del tallo, promoviendo el crecimiento de los brotes; situación reflejada en los datos obtenidos, en los que el número de brotes y la longitud de los mismos, se ve favorecido por el corte realizado a las plantas.

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

Se han realizado algunos experimentos que demuestran la acción de estas hormonas, en garbanzos, por ejemplo se ha reportado que tras la decapitación, las citoquininas de la raíz se acumulan en el brote; de igual forma en guisantes y en fríjol; después del corte los niveles de citoquininas exportados desde la raíz aumentan (Ongaro y Leyser, 2008).

En términos generales, la realización de cortes a la altura Media de plantas de comino crespo promovió por un lado, la formación de brotes axilares y por el otro lado mini esquejes que, en las condiciones adecuadas enraizaron y se desarrollaron como plantas aptas para ser utilizadas con fines de conservación o a largo plazo de aprovechamiento sostenible.

Este trabajo basado en la realización de cortes diferenciales en plantas de comino crespo (*A. perutilis)*, con el fin de inducir brotes y el posterior enraizamiento de los mismos, se propone como metodología pionera en el campo de la propagación clonal de la especie. Otros estudios, se han orientado a entender el fenómeno de dominancia apical, etapas de dormancia y el papel de las hormonas en estos procesos, desde perspectivas morfológicas, fisiológicas y moleculares, sin embargo, poca atención se ha prestado a su aplicabilidad.

Es por esto, que esta metodología se proyecta como una potencial herramienta, aún poco explorada, que a partir del conocimiento de la fisiología de las plantas de comino crespo y sus relaciones hormonales, permitiría la propagación clonal masiva de la especie.

8. Conclusiones y Recomendaciones

8.1 Conclusiones

- Se logró el establecimiento del comino crespo en condiciones *in vitro*, hasta la fecha, las plántulas permanecen en condiciones estables en los medios de cultivo propuestos. Aunque la respuesta al enraizamiento *in vitro* bajo diferentes tratamientos fue nula, dificultando el proceso de aclimatación y endurecimiento, los resultados obtenidos se constituyen en un precedente para trabajos posteriores en la especie.

- La realización de cortes a plantas jóvenes establecidas en vivero, favorece la producción de brotes y mini esquejes aptos para enraizamiento y traslado exitoso a vivero.

- En términos generales, se proponen dos alternativas para la propagación clonal de comino crespo que pueden ser la base de futuros protocolos para propagación masiva eficiente, con fines de conservación o producción comercial, así como ser modelo para otras especies forestales con características similares.

8.2 Recomendaciones

- Se sugiere optimizar la fase de enraizamiento *in vitro* de la especie evaluando reguladores de crecimiento como Tidiazurón, ampliamente recomendado en especies forestales, para su posterior aclimatación a condiciones de vivero.

- De igual modo, es indispensable caracterizar el estado del crecimiento y desarrollo *in vivo* de plantas de comino crespo, en función de la presencia y concentración de hormonas; ampliando el tamaño de la muestra y el tiempo de observación, con el fin de contribuir al conocimiento de la especie y su implementación en estrategias de multiplicación y conservación.

9. Bibliografía

ABDELNOUR, E. Y MUÑOZ, A. Micropropagación de especies forestales. X Congreso Forestal Nacional de Especies Forestales, San José de Costa Rica. 1997.

ALZATE CN. La influencia del Guácharo (*Steatornis caripensis*) en la germinación de varias especies forestales y en la regeneración del Comino (*Aniba perutilis* Hemsley) en la región de Río Claro (Antioquia) [Tesis de Pregrado].Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. 1987.

ARRILLAGA I, MARZO T, SEGURA J. Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 341-348, 1991

AZOFEIFA, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. Agronomía Mesoamericana, Vol. 20, Núm. 1, enero-julio, 2009, pp. 153-175

BABU N, SAJINA A, MINOO D, JOHN CZ, MINI PM, TUSHAR KV, REMA J, RAVINDRAN PN. Micropropagation of camphor tree (*Cinnamommum camphora*). *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture* **74:** 179–183, 2003.

BENSON E. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36:141–148. 2000.

BON M, GENDRAUD M, FRANCLET A. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. Scientia Horticulturae 34: 283-291. 1988.

BONGA JM, KLIMASZEWSKA KK, ADERKAS P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 100:241–254. 2010.

CASTRO RD, JÍMENEZ CM, RÍOS GD, RESTREPO AC, GIRALDO MC. Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro para la propagación y conservación de germoplasma de 4 especies vegetales en vías de extinción en el oriente antioqueño. Comino, abarco, almendrón y guayacán. CUADERNO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO REGIONAL N.8. El santuario-Cornare. 1993. 94pp.

CÁRDENAS LD, SALINAS NR. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas I parte. Instituto de investigaciones Científicas SINCHI. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá D.C. Febrero, 2006.

CHIRUVELLA K, MOHAMMED A, DAMURI G, GHANTA G. *In vitro* Shoot Regeneration and Control of Shoot Tip Necrosis in Tissue Cultures of *Soymida febrifuga* (Roxb.) A. Juss. Plant Tissue Cult. & Biotech. 21(1): 11-25, 2011.

CHUNG P, CARRASCO B. Micropropagación de *Salix sp.* a través de mersitemos foliares. Ciencia e Investigación Forestal. Vol. 12 N°1.1998.

CLINE M. Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany* 84(9): 1064–1069. 1997.

Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia-CORANTIOQUIA. 2007. Manejo de las semillas y la propagación de diez especies forestales del bosque Andino. Eds. Gómez Restrepo ML, Toro Murillo JL. Boletín Técnico Biodiversidad N°1. 72p.

FAY MF. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. *In vitro Cell. & Develop. Biol.-Plant*. Vol 28:1, pp. 1-4. 1992.

GARCÍA H, HOYOS R. Establecimiento *In vitro* de abarco y comino. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. (Inédito).

GEORG RH. Wood and Bark Anatomy of Lauraceae I. *Aniba* Aublet. IAWA Bulletin vol2 (2-3). 1981.

GEORGE E, HALL M, DE CLERCK G. Plant propagation by tissue culture. 3rd Edition. Vol 1. The Background. 2008. 495pp.

GOMES F *& CANHOTO JM*. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo L*.) from adult plants. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. 45:72–82. 2009.

GÓMEZ RESTREPO ML, TORO MURILLO JL. 2007. Manejo de las semillas y la propagación de diez especies forestales del bosque Andino. Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia- CORANTIOQUIA. Boletín Técnico Biodiversidad N°1. 72p.

HURTADO C. Uso de modelos de predicción como herramienta para estimar el área de distribución potencial de la especie *Aniba perutilis* Hemsley (comino crespo) en el departamento del valle del cauca. [Tesis Pregrado]. Facultad de Ciencias Naturales. Fundación Universitaria de Popayán. 2007.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. IUCN Red List Categ. Crit. v. 3.1_ii, 1–30. 2001.

JARDIM LS, SAMPAIO PB, COSTA SS, GONÇALVES CB, BRANDÃO HL. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) *Acta Amazonica* VOL. 40(2): 275 – 280.2010.

JÍMENEZ-BONILLA V. Establecimiento aséptico y propagación in vitro de *Erythrina fusca y E. poeppigiana* por microestacas. TESIS Centro Agronómico Tropical de Enseñanza. 69 pp. 1990.

KOWALSKY B, VAN STADEN J. *In vitro* culture of two threatened South African medicinal trees: *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris. Plant Growth Regulation* 34**:** 223–228, 2001.

KUBITZKY K & RENNER S. Lauraceae I. *Aniba and Aiouea*. Flora Neotropica. Monograph 31. The New York botanical garden. New York. 1982. 126pp.

LEIFERT C AND CASSELLS C. Microbial Hazards in plant tissue and cell cultures*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant***.** Vol 37:137-138. 2001.

LEIFERT C, RITCHIE JY AND WAITES WM. Contaminants of plant tissue and cell cultures. Review. Word journal of Microbiology and Biotechnology **7:**452-469.1991.

LLOYD G, MCCOWN B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proceedings of the International Plant Propagators Society. (30): 421-427. 1981

MERKLE S, NAIRN J. Hardwood tree biotechnology*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:602–619. 2005.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución Número 383. "Por la cual se declaran las especies silvestres que se encuentran amenazadas en el territorio nacional y se toman otras determinaciones". 23 de Febrero de 2010.

MOURA-COSTA PH, VIANA AM, MANTELL SH. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*: an endangered Brazilian hardwood forest tree. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 35: 279-285.1993.

MÚNERA L. Especies vegetales promisorias. El Comino. Memorias. Seminario regional. Universidad Nacional. Sede Medellín. Facultad de Ciencias agropecuarias. Departamento de Agronomía. 1998.

MUÑÓZ-CONCHA D. *Gomortega kaule*: Micropropagation and Germplasm Charaterization. [Tesis Doctoral]. University of Nottingham. January, 2010.

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497. 1962.

ONGARO V, LEYSER O. Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 1, pp. 67–74, 2008.

PEDROZA-MANRIQUE J., BEJARANO-TIBOCHA. Propagación vegetativa *In Vitro* de *Puya santossi*. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol X. N.1.2008.

PÉREZ, FJ. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odotata* L. Tesis Mag. Sc. CATIE.Turrialba, Costa Rica. 2001. 81 p.

PÉREZ Y PONCE JN. Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Ed. Santa Clara. Instituto de Biotecnología de las plantas. Cuba. 1998.

PIERIK RLM. Cultivo in vitro de las plantas superiores. 3ra edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 1988. 326 *pp*.

RAZDAN, M.K. Introduction to plant tissue culture. 2ª ed. Enfield. New Hampshire, U.S.A. 2003. 375 *pp.*

ROCA W, MROGINSKI L. Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT. 1991. 969 *pp.*

SAS. Institute SAS software version 9.1.3. SAS Institute, Cary, NC, USA 2005.

SCHROEDER, C.A. Avocado Tissue *in vitro*. Calif. Avocado Soc. Yearbook 63: 86-89. 1980.

SEMINARIO REGIONAL SOBRE ESPECIES PROMISORIAS. Memorias. Eds. Reyes SC, Gómez CE, Landínez GR. Medellín. Octubre, 1998. 164 *pp.*

SENEVIRATNE, P; WIJESEKARA, G.. The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. Journal of Plantation Crop 24: 54-62. 1996

SHIMIZU-SATO S, MORI H. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology*, Vol. 127. pp. 1405–1413. 2001.

SKIRVIN RM, MOTOIKE S, NORTON MA, OZGUR M, AL-JUBOORY K AND MCMEANS OM. Workshop on micropropagation establishment of contaminant free perennial plants *In vitro. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. Vol 35:4. 278-280. 1999.

TORIBIO I. M. Embriogénesis somática en especies forestales. V Reunión De La Sociedad Española De Cultivo *In Vitro* De Tejidos Vegetales. Pamplona. 2003.

VENGADESAN G, PIJUT P. *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro Cell.Dev.Biol*.-Plant 45:474–482. 2009.

VILORIA, Z. Cultivo *in vitro* de nudos de guayaba (*Psidium guajaba* L.). TESIS. Universidad del Zulia, Maracaibo. 1993. 35*p*.

10. Anexos

Anexo 10-1. Soluciones minerales y vitaminas propuestas por Lloyd & McCown (1981) para la adición al medio de cultivo utilizado en el establecimiento de *A. perutilis.*

SALES DE MACRONUTRIENTES (mg/L)		SALES DE MICRONUTRIENTES (mg/L)		VITAMINAS (mg/L)	
NH4NO3	400	H3BO3	6,2	Glicina	**2**
Ca(NO3)•2H2O	556	MnSO4•H2O	16,9	Tiamina- HCl	**0,10**
CaCl2•2H2O	96	ZnSO4•7H2O	8,6	Piridoxina- HCl	**0,50**
MgSO4•5H2O	370	Na2MoO4•2H2O	0,25	Acido Nicotinico	**0,50**
KH2PO4	170	CuSO4•5H2O	0,025	Myo- inositol	**100**
K2SO4	990	CoCl2•6H2O	0,025		
		FeSO4•7H2O	27,8		
		Na2EDTA•2H2O	37,3		

Tabla 10-2. Soluciones minerales y vitaminas propuestas por Murashige & Skoog (1962) para la adición al medio de cultivo utilizado en el establecimiento de *A. perutilis*.

SALES DE MACRONUTRIENTES (mg/L)		SALES DE MICRONUTRIENTES (mg/L)		VITAMINAS (mg/L)	
NH4NO3	1650	KI	0.83	Glicina	**2**
KNO3	1900	H3BO3	6.2	Tiamina- HCl	**0.10**
CaCl2•2H2O	440	MnSO4•4H2O	22.3	Piridoxina- HCl	**0.50**
MgSO4•7H2O	370	ZnSO4•7H2O	8.6	Acido Nicotinico	**0.50**
KH2PO4	170	Na2MoO4•2H2O	0.25	Myo- inositol	**100**
		CuSO4•5H2O	0.025		
		CoCl2•6H2O	0.025		
		FeSO4•7H2O	27.8		
		Na2EDTA•2H2O	37.3		

Anexo 10-3. Análisis de Varianza para Porcentaje de supervivencia

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	12	13644.51895	1137.04325	11.06	<.0001
Error	25	2570.31878	102.81275		
Total correcto	37	16214.83774			

Anexo 10-4. Análisis de varianza para Número de brotes empleando BAP y KIN

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	0.61527151	0.07690894	1.55	0.2089
Error	18	0.89313606	0.04961867		
Total correcto	26	1.50840756			

Anexo 10-5. Análisis de varianza para Longitud promedio de brotes empleando BAP y KIN

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	1.54300000	0.22042857	1.74	0.1346
Error	32	4.05200000	0.12662500		
Total correcto	39	5.59500000			

Anexo 10-6. Análisis de varianza para Número de brotes empleando BAP, AIA, ANA y GA_3

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.68101058	0.13620212	1.58	0.2050
Error	24	2.07536496	0.08647354		
Total correcto	29	2.75637554			

Anexo 10-7. Análisis de varianza para Longitud de brotes empleando BAP, AIA, ANA y GA_3

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	2.56459891	0.64114973	2.12	0.1204
Error	18	5.44617500	0.30256528		
Total correcto	22	8.01077391			

Anexo 10-8. Análisis de varianza para Número de brotes empleando MS½ y WPM½ y los reguladores de crecimiento BAP y AIA

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.85700000	0.17140000	0.41	0.8361
Error	24	9.99800000	0.41658333		
Total correcto	29	10.85500000			

Anexo 10-9. Análisis de varianza para Longitud de brotes empleando MS½ y WPM½ y los reguladores de crecimiento BAP y AIA.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	0.24751726	0.03535961	0.46	0.8526
Error	32	2.43460809	0.07608150		
Total correcto	39	2.68212535			

Efecto del corte (A=Distal, B=Medio y C=Basal) sobre la longitud y número de brotes en plantas de comino crespo

TTO	LIP (cm)	L 30d (cm)	LP 30d (cm)	NB 30d (cm)	NBP 30 d (cm)	LB 30d (cm)	LPB 30d (cm)	L 60d (cm)	LP 60d (cm)	NB 60d (cm)	NBP 60d (cm)	LB 60d (cm)
A1		12,1		0		0		13		0		0
A2		13,5		0		0		14,5		1		1
A3		12,7		2		1,25		12,7		2		2,7
A4		12,5		1		4,5		12,5		1		8,4
A5		11,2		1	5	1,6		12,8		1	6	4,6
A6	11,6	11	12,16	1	0,83	1	1,39	12	12,91	1	1	3
B1		8,6		0		0		9		1		0,5
B2		8,4		1		1,5		8,7		1		2,5
B3		7,2		1		2,9		8,5		2		3,4
B4		7		1		1,4		7,5		1		2,4
B5		8		1	5	3		8		1	7	4,8
B6	7,66	8,4	7,93	1	0,83	4,5	2,21	8,5	8,36	1	1,16	6,8
C1		4,6		1		1,3		4,7		1		3,5
C2		4,3		0		0		0		0		0
C3		4		1		2,7		4,7		1		4,5
C4		4,6		2		1,3		4,8		2		6,00
C5		3,5		2	8	1		3,5		0	6	0
C6	3,66	4	4,16	2	1,33	1,25	1,25	4	3,61	2	1	2,25

Cont.

LPB 60d (cm)	L 75d (cm)	LP 75d (cm)	NB 75d (cm)	NPB 75d (cm)	LB 75d (cm)	LPB 75d (cm)	L 105d (cm)	LP 105d (cm)	NB 105d (cm)	NBP 105d (cm)	LB 105d (cm)	LPB 105d (cm)
	13		0		0		13		1		3	
	14,5		1		2,5		14,5		1		2,5	
	13,9		2		3,8		14		2		5	
	13		1		9,1		13		1		1	
	13		1	6	5		13		1	7	6	
3,28	12,5	13,3	1	1	3,2	3,93	12,5	13,33	1	1,16	3,5	3,5
	9		2		0,6		9		0		0	
	9,5		1		2,6		9,5		1		3	
	8,5		2		3,4		8,5		3		2,53	
	7,5		1		2,6		7,7		1		3,5	
	9		1	8	5,7		9		0	6	0	
3,4	8,5	8,66	1	1,33	6,9	3,63	8,5	8,7	1	1	0,5	1,58
	4,7		1		3,6		4,7		1		5,5	
	0		0		0		0		0		0	
	5		1		4,6		5,3		1		4,6	
	5		2		6,25		5		2		6,5	
	0		0	6	0		0		0	6	0	
2,70	4,3	3,16	2	1	2,4	2,808	4,3	3,21	2	1	2,35	3,15

LIP: Longitud Inicial Promedio del tallo
NBP: Número de Brotes Promedio
LP: Longitud Promedio del Tallo
L: Longitud del tallo
LB: Longitud del Brote
LPB: Longitud promedio de Brote
NB: Número de Brotes

Seguimiento al crecimiento apical y a la longitud de hojas en plantas de comino crespo establecidas en vivero durante diez semanas.

Planta N°	**Semana 1**			**Semana 2**			**Semana 3**			**Semana 4**		
	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)
1	3	1,5	1,5	3	6,8	9	3,5	14,6	15,1	3,5	14,6	15,1
2	2	1,5	2	4,5	4,5	5,4	5	20,9	18,6	5,4	21	18,9
3	5,7	13,4	14,4	5,7	18,4	17,9	6,5	18,4	18,3	7,5	6	6,1
4	8,4	18,9	19,6	8,4	20,2	19,6	8,4	20,2	19,6	8,5	20,5	19,8
5	8,2	8,2	12,7	8,3	12,8	19,5	8,5	12,9	19,5	8,6	12,9	19,5
6	8,2	6,2	8,6	9,2	15	17,1	9,8	15	17,3	9,8	15	17,5

Cont

Semana 5			**Semana 6**			**Semana 7**			**Semana 8**			**Semana 9**			**Semana 10**		
CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)	CA (cm)	H1 (cm)	H2 (cm)
3,5	14,6	15,1	4,2	14,6	15,1	7	4,5	5	9,2	8,3	10,1	12,7	17	18	12,9	18,3	18,5
7,6	1,2	1,5	8	3,6	3,4	12,7	5,3	6,2	14	11,5	12,8	15,7	18	19	15,7	18,1	19,4
13	6,6	8,4	15	12,5	15,3	15,2	14	16,5	15,2	14,4	16,2	15,5	14,5	17	15,5	14,5	17
11	1,6	4,4	13,5	5,5	3,3	13,5	6	9,3	13,5	9,9	13,5	16	15	19,2	16	15,2	19,6
9,3	12,9	19,6	10,5	3	3,2	12	3,6	4,7	14,4	7,1	10	14,5	11,5	13,5	14,5	17,1	21,5
14	3,6	3,5	21	3,7	3,9	23	7,2	11,1	23	11,5	14,5	24	12	14,6	24	12,4	19,5

CA: Crecimiento Apical
H1: Longitud Hoja 1
H2: Longitud Hoja