

PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROLIFERACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *Bursera graveolens* (KUNTH) TRIANA & PLANCH (PALO SANTO), PROVENIENTES DEL BOSQUE SECO DE LA PROVINCIA DE LOJA.

BIOTECHNOLOGY PROCESSES FOR THE PROLIFERATION AND ROOTING *IN VITRO* OF *Bursera graveolens* (KUNTH) TRIANA & PLANCH (PALO SANTO), FOREST FROM DRY LOJA PROVINCE.

¹*Pinta Diego Manuel*, ²*Eras-Guamán Víctor Hugo**, ²*González-Zaruma Darlin Ulises*,
³*Moreno-Serrano José Antonio*, ⁴*Minchala-Patiño Julia Esther*, ⁴*Yaguana-Arévalo Magaly*,
⁴*Poma-Angamarca Ruth Alexandra*, ⁴*Valarezo-Ortega Cristian Oswaldo*, ⁴*Sinche-Freire
Mauricio Gabriel.*

1 Tesista de la Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja

2 Docentes Investigadores Carrera Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja

3 Docente Investigador Carrera Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Loja

4 Técnicos del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja

**Autor para correspondencia: victor.eras@unl.edu.ec*

Carrera de Ingeniería Forestal,
Universidad Nacional de Loja, Ecuador



Web: www.bosqueslatitudcero.com
Email: bosqueslatitudcero@unl.edu.ec

Recepción: 18 de abril del 2016

Aceptación: 27 de julio del 2016

Pinta, M, *et al.* 2016. Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de *Bursera graveolens* (kunth) triana & planch (palo santo), provenientes del bosque seco de la provincia de Loja. Universidad Nacional de Loja.

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo el establecimiento de ensayos para la propagación *in vitro* de *Bursera graveolens*. El material vegetal fue semillas y segmentos nodales obtenidos de campo e *in vitro*. Se utilizó el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (1962), suplementado con diversos reguladores de crecimiento. En el ensayo de desinfección de semillas se empleó cloro comercial en concentraciones de 25, 50 y 75%, e inmersión de 5, 10 y 15 minutos; y para la implantación de segmentos nodales de campo se ensayó cloro comercial en concentraciones de 15, 20 y 25% en inmersión de 5 y 10 minutos. Para la germinación *in vitro* de semillas se aplicó tratamientos pre-germinativos y adición de GA_3 en concentraciones de 0,5-1 mg/l. El ensayo de inducción de callos embriogénicos se empleó las auxinas 2,4-D, Dicamba, ANA y AIA en concentraciones de 0,1-0,5-1 mg/l. La utilización de cloro al 75% durante 5 minutos controló la contaminación en semillas; en lo que respecta a los explantes obtenidos de campo los tratamientos aplicados no controlaron la contaminación. La germinación en mayor porcentaje se registró en el tratamiento de escarificación mecánica y 0,5 mg/l de GA_3 . Benzilaminopurina en concentración de 1 mg/l fue el mejor tratamiento para el ensayo de multiplicación. El ensayo de inducción de callos embriogénicos empleando 1 mg/l de 2,4-D logró inducir el mayor porcentaje de formación.

Palabras claves: cultivo *in vitro*, propagación vegetativa, callos embriogénicos, conservación.

ABSTRACT

The research aimed to establish *in vitro* assays for the spread of *Bursera graveolens*. The plant material was obtained seeds and nodal segments field and *in vitro*. The basal culture medium Murashige and Skoog (1962) was used, supplemented with various growth regulators. In the test seed disinfection commercial chloride was used in concentrations of 25, 50 and 75%, and immersion of 5, 10 and 15 minutes; and for implementing field nodal segments commercial chlorine was tested at concentrations of 15, 20 and 25% by dip 5 and 10 minutes. For *in vitro* germination of seeds pre-germinative treatments and addition of GA_3 at concentrations of 0.5-1 mg/l was applied. The induction assay embryogenic callus auxin 2,4-D, Dicamba, ANA and AIA was used in concentrations of 0,1-0,5-1 mg / l. The use of chlorine at 75% for 5 minutes controlled pollution seeds; with respect to the field explants obtained treatments applied not control pollution. The highest percentage germination was recorded in the treatment of mechanical scarification and 0.5 mg / l GA_3 . Benzylaminopurine in concentration of 1 mg / l was the best treatment for assaying multiplication. The induction assay embryogenic calli using 1 mg / l 2,4-D was able to induce the highest percentage of formation.

Keywords: *in vitro* culture, vegetative propagation, embryogenic callus, conservation.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador los bosques secos se encuentran en el centro y sur de la región occidental de los Andes, en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas, El Oro y Loja. Originalmente cerca del 35 % (28 000 km²) del Ecuador occidental estaba cubierto por bosque seco, se estima que el 50 % habría desaparecido (Sierra *et al.*, 1999). Los bosques secos son formaciones caducifolias donde más del 75 % de sus individuos pierden estacionalmente sus hojas (Aguirre y Kvist, 2005; Linares y Ponce, 2005; Chamba, 2014). Según Aguirre (2009), los bosques secos de la Región Tumbesina son considerados como EBA (Endemic Birds Area), la misma que tiene una gran importancia por ser un área de endemismo definida por la superposición de uno o más rangos de especies cuya distribución es menor a 50 000 km². La mayoría de estas EBAs también son importantes porque definen áreas de endemismos para otros grupos de fauna y flora. Los bosques secos tumbesinos están restringidos en un área geográfica pequeña, 50 000km², entre Ecuador y Perú (Dinerstein *et al.*, 1995; Chamba, 2014).

Los bosques secos son ecosistemas que están amenazados principalmente por la ampliación de la frontera agrícola, quema de vegetación y pastoreo; además, el desarrollo de zonas urbanas reduce los parches con vegetación en la zona de amortiguamiento, los mismos que tradicionalmente han interactuado directamente con la población local, facilitando la extracción de recursos forestales madereros, incluso se han sobreexplotado especies forestales valiosas como: el guayacán (*Handroanthus crisanthus*); hualtaco (*Loxopterigium huasango*); palo santo (*Bursera graveolens*), las mismas que son especies representativas del bosque seco de la región sur del Ecuador (Aguirre y Kvist, 2005; Herbario Loja *et al.* 2001; Aguirre y

Delgado, 2005). Los bosques secos de Loja son poco conocidos, muy amenazados y tienen gran importancia económica, debido a los múltiples recursos forestales (maderables y no maderables) que la población obtiene de ellos (Aguirre y Kvist, 2005).

La micropropagación vegetal se plantea como una alternativa de propagación vegetal, ya que esta técnica permite tener un mayor conocimiento de los factores fisiológicos y ambientales involucrados en la formación de órganos adventicios, mediante la propagación *in vitro*. Bajo esta perspectiva la presente investigación tuvo como objetivo realizar ensayos para el establecimiento de protocolos de micropropagación de *Bursera graveolens*, a partir de semillas y segmentos nodales de campo e *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal (semillas, estacas y regeneración natural) fue colectado de árboles con características fenotípicas sobresalientes identificados en el cantón Zapotillo (sector Malvas) y fueron trasladados al Laboratorio de Micropropagación Vegetal e Invernadero del Área Agropecuaria de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, respectivamente. Las semillas colectadas fueron seleccionadas en base a criterios fisiológicos de madurez, tamaño y estado fitosanitario. Para la inducción de callos embrionarios la extracción de los embriones se realizó a partir de las semillas colectadas, en las cuales se extrajo los embriones con la ayuda de un martillo proporcionando un golpe y con la ayuda de un bisturí se procedió a limpiar el embrión y colocarlos en cajas petri. Las estacas recolectadas fueron sumergidas en un recipiente con una solución de 50 mg/l de (ácido giberélico) AG₃ y 100 mg/l de benzilaminopurina (BAP), en el cual permanecieron durante ocho días para promover brotaciones, y pulverizadas con

solución fungicida–bactericida - insecticida (2 ml/l de Kasumin + 2 g/l de Benomyl + 2,5 ml/l de Neem-X) cada dos días. Las plántulas de regeneración natural fueron sembradas en sustrato de tierra del sector y colocadas bajo cobertores en el cuarto de aclimatación y rociadas periódicamente con una solución de 50 mg/l de ácido giberélico (AG₃) y 100 mg/l de benzilaminopurina (BAP), con la finalidad de promover la formación de nuevos brotes. De igual forma las plántulas fueron tratadas con soluciones fungicidas y bactericidas (Kasumin, Benomyl); e, insecticida Neem-X, para controlar el ataque de enfermedades y plagas respectivamente.

Establecimiento

Semillas: Las semillas seleccionadas posteriormente fueron desinfectadas con alcohol etílico al 70%, durante 1 minuto y enjuagadas con agua destilada estéril. La solución desinfectante consistió en hipoclorito de sodio en concentraciones de 25, 50 y 75% e inmersión de 5, 10 y 15 minutos, respectivamente, en seguida fueron realizados tres enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas posteriormente fueron inoculadas a razón de una por cada tubo de ensayo, el cual contenía el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas 1 mg/l de tiamina y 100 mg/l de mio-inositol, 20 g/l de sacarosa y 6 g/l de bacto agar. El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,2$. El delineamiento utilizado fue completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x3, con tres repeticiones y 15 tubos por tratamiento, teniendo una semilla. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de contaminación y número de días a la contaminación.

Callos embriogénicos: La desinfección de los embriones se emplearon frascos de vidrio, en los cuales se colocan los embriones, a razón de 50 embriones/frasco, envueltos en tul para facilitar su manipulación durante la

desinfección debido a su tamaño pequeño. Se aplicó alcohol etílico 70 % durante 1 minuto, posteriormente se procedió aplicar hipoclorito de sodio al 50 % durante 10 minutos.

Estacas: Las yemas terminales y axilares fueron colectados de las estacas mantenidas en el invernadero y posteriormente desinfectadas con una solución fungicida (2 ml/l Kasumin) durante 20 minutos y enjuague tres veces con agua destilada estéril. A continuación, los explantes obtenidos fueron lavados con solución de detergente comercial y tres enjuagues con agua destilada. Posteriormente fueron colocados en una solución antioxidante (ácido cítrico 150 mg/l + ácido ascórbico 100 mg/l) hasta su desinfección. La solución desinfectante consistió en hipoclorito de sodio en concentraciones de 15, 20 y 25% e inmersión de 5 y 10 minutos, respectivamente, en seguida fueron realizados tres enjuagues con agua destilada estéril. Los explantes fueron cortados de 1 a 1,5 cm de longitud e inoculados a razón de un explante por cada tubo de ensayo, el cual contenía el medio de cultivo similar al medio de cultivo empleado en el ensayo para evaluar la desinfección *in vitro* de semillas, agregándose de forma complementaria como agentes antioxidantes 1,5 g/l de carbón activado, 150 mg/l de ácido cítrico y 100 mg/l de ácido ascórbico. El delineamiento utilizado fue completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x2, con tres repeticiones y 10 tubos por tratamiento, teniendo un explante. Las variables que se evaluaron por 30 días fueron: porcentaje de contaminación y porcentaje de oxidación fenólica.

Regeneración natural: La desinfección se realizó en dos fases: Primera fase (fuera de cámara de flujo laminar): 1) Los explantes fueron colocados en una solución de detergente y agua corriente, luego se eliminó la solución de detergente con enjuagues de agua destilada estéril. 2)

Inmersión de los explantes en solución de fungicida (Kasumín 2 ml/l) durante 10 minutos, enjuagues con agua destilada estéril. 3) Inmersión en povidón (Jabón líquido) al 10 %, por 10 minutos. 4) Posteriormente se procedió a eliminar el agente desinfectante. Segunda fase (cámara de flujo laminar): 1) Inmersión de los explantes en alcohol al 75 % durante 1 minuto. 2) Inmersión en hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 5 %, por 15 minutos. 3) Inmersión en hipoclorito de sodio al 50 % y 20 % en periodos de 2 y 3 minutos respectivamente. 4) Enjuagues con agua destilada estéril, hasta eliminar la solución desinfectante. 5) Para la siembra *in vitro* se eliminó las partes afectadas del explante reduciendo a un tamaño de $\pm 1,5$ cm. de longitud. 6) Se realizó una segunda desinfección con peróxido de hidrogeno al 2,5 % y 5 % por 10 y 5 minutos respectivamente. 7) Enjuague de los explantes en una solución antioxidante (150 mg/l de ácido cítrico más 100 ml/l de ácido ascórbico) y agua destilada estéril. 8) Finalmente, se dejó los explantes en agua destilada estéril más la solución antioxidante para la inoculación *in vitro*, al medio de cultivo basal MS se enriqueció

con tres citocininas (BAP, KIN y 2ip) en dos concentraciones (1 y 2 mg/l) respectivamente. El delineamiento utilizado fue completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x2, con tres repeticiones y 10 tubos por tratamiento, teniendo un explante. Las variables que se evaluaron por 30 días fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación fenólica, número de brotes formados, número de hojas y longitud del brote.

Germinación de Semillas

La germinación *in vitro* de semillas se realizó aplicando diferentes métodos de escarificación con varias concentraciones de AG₃ adicionadas al medio de cultivo. La desinfección de semillas se realizó con 75 % hipoclorito de sodio + 5 min, posteriormente se procedió a inocular una semilla por cada tubo de ensayo, considerando el método de escarificación y la concentración de AG₃, de acuerdo a la Tabla 1; y, posteriormente se colocaron en el cuarto de incubación. Para evaluar las condiciones del ensayo se utilizó el diseño completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x3, con 9 tratamientos y 3 repeticiones.

Tabla 1. Tratamientos aplicados para evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *B. graveolens*.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	Sin escarificación + 0 mg/l de AG ₃	T1 = E1M1
2	Escarificación física + 0 mg/l de AG ₃	T2 = E2M1
3	Escarificación mecánica + 0 mg/l de AG ₃	T3 = E3M1
4	Escarificación química + 0 mg/l de AG ₃	T4 = E4M1
5	Sin escarificación + 0,5 mg/l de AG ₃	T5 = E1M2
6	Escarificación física + 0,5 mg/l de AG ₃	T6 = E2M2
7	Escarificación mecánica + 0,5 mg/l de AG ₃	T7 = E3M2
8	Escarificación química + 0,5 mg/l de AG ₃	T8 = E4M2
9	Sin escarificación + 1 mg/l de AG ₃	T9 = E1M3
10	Escarificación física + 1 mg/l de AG ₃	T10 = E2M3
11	Escarificación mecánica + 1 mg/l de AG ₃	T11 = E3M3
12	Escarificación química + 1 mg/l de AG ₃	T12 = E4M3

Inducción de callos embriogénicos

Ensayo 1. Embriones maduros fueron utilizados para inducir la formación de

callos. El medio de cultivo utilizado fue el MS (1962) suplementado con 10 mg/l de

tiamina y 100 mg/l de mio-inositol, 1mg/l de piridoxina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 2 mg de glicina, 20 g/l de sacarosa, 6 g/l de agar y 2,4-D como auxina en cuatro concentraciones (0,0 , 1,0 , 1,5 y 2,0 mg/l). El pH óptimo fue de $5,8 \pm 0,2$. El delineamiento utilizado fue simple al azar, con 12 tratamientos, 3 repeticiones y 5 frascos tubos por tratamiento, teniendo tres embriones por frasco. Las variables que se evaluaron por 50 días fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de mortalidad, porcentaje de fenolización, porcentaje de formación de callo y, porcentaje de germinación.

Ensayo 2. Embriones maduros fueron utilizados para inducir la formación de callos. El medio de cultivo utilizado fue el MS (1962) suplementado con vitaminas: 10 mg/l de tiamina y 100 mg/l de mio-inositol, 1 mg/l de piridoxina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 2 mg de glicina, 20 g/l de sacarosa, 6 g/l de agar; además, se enriqueció con cuatro tipos de auxinas (2,4-D, Dicamba, ANA, AIA), en tres concentraciones (0,1; 0,5 y 1,0 mg/l). El pH óptimo fue de $5,8 \pm 0,2$. El delineamiento utilizado fue completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x4, 3 repeticiones y 5 frascos por tratamiento, teniendo dos embriones por frasco. Las variables que se evaluaron por 50 días

fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de mortalidad, porcentaje de fenolización, porcentaje de formación de callo y, porcentaje de germinación.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron procesados en el software Info Stat (Di Rienzo *et al.* 2009), en cual se realizó un análisis de varianza (ANAVA), estableciendo diferencias significativas con el test de LSD Fisher a un nivel de significancia de 0,05, en cada uno de los ensayos realizados.

RESULTADOS

Desinfección de semillas: según los resultados respecto al porcentaje de contaminación, no se presentaron diferencias significativas ($p=0,3107$) entre tratamientos. El T3 (25 % de hipoclorito de sodio +15 minutos inmersión) y T7 (75 % de hipoclorito de sodio + 5 minutos inmersión) obtuvieron el valor promedio más bajo ($0,00 \pm 2,77$) de contaminación. Respecto a la aparición de la contaminación se evidenció al cuarto día de evaluación, a partir de la siembra en los tratamientos y se estabilizó a los 21 días (Fig.1).

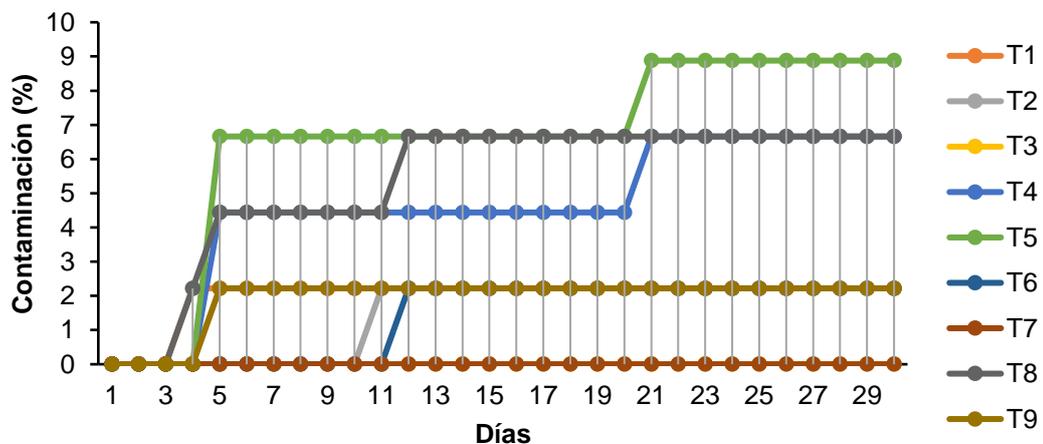


Figura 1. Promedios de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados para la desinfección de semillas de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch

Desinfección e implantación *in vitro* de explantes de campo: Los resultados obtenidos referentes al porcentaje de contaminación no mostraron diferencias significativas ($p=0,8082$) entre

tratamientos; para la variable porcentaje de oxidación fenólica si se encontraron diferencias significativas ($p=0,0040$) entre tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios de las variables evaluadas en el ensayo de desinfección e implantación de explantes proveniente de estacas de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch.

Tratamientos	% Contaminación		% Oxidación fenólica	
	p-valor	CV	p-valor	CV
	$p=0,8082$		$p=0,0040$	
T1	$100 \pm 4,91^a$	8,84	$16,67 \pm 3,85a$	20,34
T2	$96,67 \pm 4,91^a$		$33,33 \pm 3,85bc$	
T3	$93,33 \pm 4,91^a$		$26,67 \pm 3,85ab$	
T4	$93,33 \pm 4,91^a$		$40 \pm 3,85c$	
T5	$100 \pm 4,91^a$		$43,33 \pm 3,85c$	
T6	$93,33 \pm 4,91^a$		$36,67 \pm 3,85bc$	

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas; \pm error estándar

Desinfección e implantación *in vitro* de explantes provenientes de regeneración natural: Los resultados referentes al porcentaje de contaminación y porcentaje de fenolización, si mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0078$ y $p<0,0001$ respectivamente). En cuanto a las variables número de brotes/explante

($p=0,069$), tamaño del brote (mm) ($p=0,0701$), no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para las variables: número hojas/explante ($p<0,1971$) entre tratamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Promedios de las variables evaluadas a los tres meses en el ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes provenientes de regeneración natural *Bursera graveolens* (Kunth).

Tratamientos	% Contaminación		Oxidación		N° de Brotes		Tamaño del Brote		Numero de Hojas		
	p-valor	CV	p-valor	C V	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	
	$0,08$		$22,0$		$0,06$		$77,5$		$0,0701$		$87,5$
1	$53,33 \pm 8,05a$		$3,33 \pm 3,60a$	46	$0,37 \pm 0,07b$		$0,12 \pm 0,03b$		$0,40 \pm 0,10b$		
2	$53,33 \pm 8,05a$		$6,67 \pm 3,60a$		$0,17 \pm 0,07ab$		$0,06 \pm 0,03ab$		$0,13 \pm 0,10ab$		
3	$93,33 \pm 8,05b$		$40,00 \pm 3,60c$		$0,07 \pm 0,07^a$		$0,02 \pm 0,03a$		$0,102 \pm 0,10ab$		
4	$46,67 \pm 8,05a$		$6,67 \pm 3,60a$		$0,27 \pm 0,07ab$		$0,08 \pm 0,03ab$		$0,23 \pm 0,10ab$		
5	$53,33 \pm 8,05a$		$20 \pm 3,60b$		$0,07 \pm 0,07^a$		$0,01 \pm 0,03a$		$0,07 \pm 0,10a$		
6	$80 \pm 8,05b$		$3,33 \pm 3,60a$		$0,07 \pm 0,07^a$		$0,01 \pm 0,03a$		$0,07 \pm 0,10a$		

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas; \pm error estándar.

Germinación *in vitro* de semillas: La velocidad de germinación se inició al cuarto día y se al día 27 de instalado el ensayo (Fig. 3). En cuanto a los porcentajes de germinación si presentaron diferencias significativas ($p=0,0010$) entre tratamientos, en donde el T7 (Escarificación mecánica + 0,5 mg/l de AG_3) presentó el valor promedio más alto ($11,11 \pm 1,57$). Referente al porcentaje de

contaminación, no se presentaron diferencias significativas ($p=0,3198$) entre tratamientos, donde el T2 (Escarificación física + 0 mg/l AG_3) y T5 (Escarificación física + 0,5 mg/l AG_3), obtuvieron el promedio más alto de contaminación de semillas ($20,00 \pm 5,25$) mientras que, el T8 (Escarificación química + 0,5 mg/l de AG_3) presentó contaminación nula.

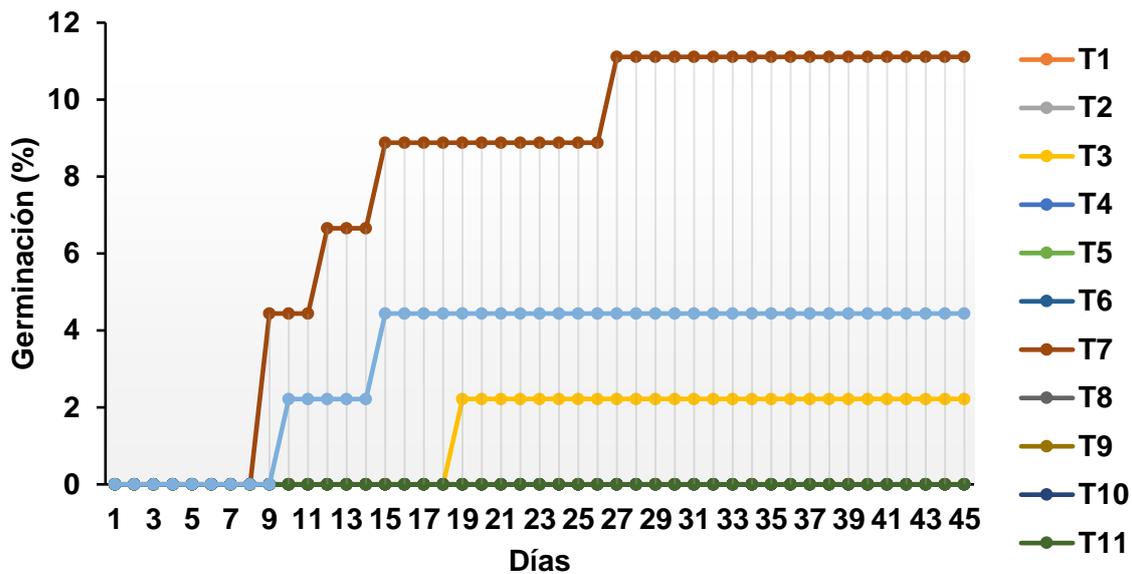


Figura 2. Curva de germinación acumulativa de los distintos tratamientos aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch

Efecto de la auxina (2,4-D) para la inducción de callos embriogénicos (ensayo 1): Los resultados registrados muestran que el porcentaje de contaminación no presentó diferencias significativas

($p=0,0519$), no se presentó fenolización, sin embargo, para las variables formación de callos embriogénicos y germinación de embriones, si presentaron diferencias significativas ($p=0,0028$ y $p=0,001$ respectivamente) entre tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Promedios de las variables inducción de callos embriogénicos con la auxina 2,4-D de semillas de *Bursera graveolens*

Tratamiento	Contaminación		Formación de callo		Germinación	
	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV
	0,0519	34,64	0,0028	34,11	0,0001	40
T1	$2,22 \pm 1,11a$		$2,22 \pm 4,16a$		$33,33 \pm 1,92a$	
T2	$6,67 \pm 1,11b$		$20,00 \pm 4,16b$		$0,00 \pm 1,92b$	
T3	$6,67 \pm 1,11b$		$26,67 \pm 4,16bc$		$0,00 \pm 1,92b$	
T4	$6,67 \pm 1,11b$		$35,56 \pm 4,16c$		$0,00 \pm 1,92b$	

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas; \pm error estándar.

Ensayo del efecto de las auxinas (2,4-D, Dicamba, AIA y ANA) para la inducción de callos embriogénicos (ensayo 2): Los resultados de la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de las auxinas (2,4-D, Dicamba, AIA y ANA), en la inducción de callos embriogénicos, se obtuvo que la variable porcentaje de contaminación y porcentaje de

fenolización si presentó diferencias significativas ($p=0,001$ y $p=0,0022$) entre tratamientos, mientras tanto para las variables formación de callos embriogénicos y germinación de embriones, si presentaron diferencias significativas ($p=0,0001$ y $p=0,001$ respectivamente) entre tratamiento (Tabla 5).

Tabla 5. Promedios de las variables inducción de callos embriogénicos con las auxinas (2,4-D, Dicamba, AIA y ANA) de semillas de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch

Tratamiento	Contaminación		Fenolización		Formación de callo		Germinación	
	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV
	0,0001	60,61	0,0022	300	0,0001	16,89	0,0001	15,64
T1	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		46,67 ± 2,36c		6,67 ± 2,36a	
T2	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		56,67 ± 2,36de		0,00 ± 2,36a	
T3	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		63,33 ± 2,36e		0,00 ± 2,36a	
T4	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		0,00 ± 2,36a		60,00 ± 2,36e	
T5	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		53,33 ± 2,36cd		6,67 ± 2,36a	
T6	10,00 ± 1,36b		0,00 ± 0,96a		53,33 ± 2,36cd		0,00 ± 2,36a	
T7	10,00 ± 1,36b		0,00 ± 0,96a		0,00 ± 2,36a		33,33 ± 2,36c	
T8	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		6,67 ± 2,36ab		16,67 ± 2,36b	
T9	13,33 ± 1,36b		6,67 ± 0,96b		0,00 ± 2,36a		26,67 ± 2,36c	
T10	13,33 ± 1,36b		0,00 ± 0,96a		0,00 ± 2,36a		50,00 ± 2,36d	
T11	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		0,00 ± 2,36a		53,33 ± 2,36de	
T12	0,00 ± 1,36a		0,00 ± 0,96a		10,00 ± 2,36b		60,00 ± 2,36ea	

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Brotamiento y Enraizamiento: La escasa disponibilidad de material vegetal aséptico, no permitió dar cumplimiento a este objetivo, puesto que en el ensayo de germinación in vitro de semillas los resultados no fueron favorables, así como también, los resultados obtenidos en la fase de multiplicación in vitro de explantes provenientes del invernadero, no permitieron inducir la formación de brotes; además, los porcentajes de contaminación de los explantes obtenidos del invernadero fueron superiores al 46 %, por lo cual se procedió a ensayar métodos de embriogénesis a partir de embriones extraídos de las semillas.

DISCUSIÓN

Los tratamientos aplicados para la desinfección de las semillas de *Bursera*

graveolens, demostraron que las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión influyeron en la desinfección de las semillas, pues en el T3 (25 % de hipoclorito de sodio, durante 15 min) y el T7 (75 % de hipoclorito de sodio, durante 5 min) la contaminación fue nula, estos resultados son mejores a los obtenidos por Santamaría *et al.*, (2012), pues en la germinación de semillas de *Cedrela montana*, obtuvo 3,7% de contaminación utilizando 0,50% de hipoclorito de sodio, así como también, a los obtenidos por Minchala *et al.*, 2013, quienes mencionan que la desinfección de semillas de *T. billbergii*, con hipoclorito de sodio al 70 %, no presentaron contaminación.

Álvarez *et al.* (2008) mencionan que, a medida que se incrementa la concentración

de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición, existe menor incidencia de contaminación; sin embargo, el hipoclorito de sodio es eficaz en la mayoría de las bacterias patógenas, pero es imprevisible contra hongos y virus, lo cual se corrobora con los resultados obtenidos en la presente investigación, pues al utilizar 75% de hipoclorito de sodio, durante 5 minutos, se logró controlar de forma total la contaminación de semillas de *Bursera graveolens*.

Las semillas de las especies forestales, generalmente no germinan debido a que la testa dura impide la entrada de agua (latencia física) y por lo tanto la semilla no germina a menos que la testa sea escarificada (Poulsen y Stubsgaard, 1995). Con respecto a la germinación de semillas de *Bursera graveolens*, se obtuvo que el T7 (Escarificación mecánica + 0,5 mg/l de AG₃), alcanzó el porcentaje de germinación más alto con 11,11%; estos valores son inferiores a los obtenidos por Díaz, (2012), quien alcanzó el 72 % de germinación en *Cedrela montana*, utilizando 2 mg/l AG₃; y, a los obtenidos por Conde, (2015) que en un estudio realizado en el bosque seco de la provincia de Loja, *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl, obtuvo una germinación de las semillas del 77,78 %, utilizando un método sin escarificación y la aplicación de 1 mg/l AG₃.

Morillo, (2015) menciona que el bajo porcentaje de germinación de las semillas de esta especie es porque no estaban en condiciones de germinar inmediatamente después de ser cosechadas, por lo que las semillas necesitan un período de reposo, que puede ser de carácter transitorio, de aproximadamente seis meses, esto concuerda con lo manifestado por Chávez y Namoc, (1993), quienes mencionan que cuando la semilla no responde con rapidez ante la expansión a condiciones ambientales favorables, están en período

de latencia y que este fenómeno es una característica común en las plantas leñosas.

En la presente investigación la contaminación por hongos y bacterias destruyó completamente el cultivo *in vitro* de explantes provenientes del campo, pues los resultados del porcentaje de contaminación en la presente investigación, respecto a los tratamientos ensayados en la desinfección de explantes de campo, no dieron resultados favorables, los niveles de contaminación fueron superiores al 93 %; estos resultados son similares a los reportados por Rebolledo *et al.*, (2006), quienes empleando 10 % de hipoclorito de sodio durante 10 minutos para la desinfección de explantes de Pino (*Pinus pseudostrobus* Lindl), obtuvieron un porcentaje de contaminación elevado del 83 % , resultados que se contraponen con los obtenidos por Patiño, (2011), quien en un estudio realizado en la especie *Caesalpinia espinosa*, obtuvo 0 % de contaminación, en explantes provenientes del campo, empleando hipoclorito de sodio al 75 % durante 7 minutos.

Tang y Newton, (2004) y George, (1996), señalan que el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está en gran medida limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*.

El establecimiento aséptico de los cultivos representa una de las etapas más delicadas en el proceso de propagación *in vitro*, más aún cuando se trabaja con especies forestales, puesto que éstas presentan una alta incidencia de hongos, bacterias, virus y viroides principalmente (Esquivel *et al.*, 2009).

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, en la fase de multiplicación

in vitro de explantes provenientes de invernadero, el T4 (2,0 mg/l de KIN) obtuvo el menor porcentaje de contaminación ($46,67 \pm 8,05$). Respecto a la variable oxidación fenólica el T1 (1,0 mg/l de BAP) y T6 (2,0 mg/l de 2ip), fueron los mejores tratamientos, pues alcanzaron el 3,33 % de oxidación fenólica respectivamente; mientras que el T1 (1,0 mg/l de BAP) fue el tratamiento que registró los mejores resultados en cuanto a las variables de número de brotes, obteniendo un promedio de 0,37 brotes por explante; en la variable relacionada al tamaño del brote, se obtuvo un valor promedio de 0,12 cm de altura, mientras que para la variable número de hojas, el promedio de hojas formadas fue de 0,4 hojas por explante, que son inferiores a los obtenidos por Torres *et al.*, (2013), quienes trabajando en *Acacia mangium*, obtuvieron un número promedio de 4,93 brotes por explante y un promedio de 4,40 hojas formadas por explantes, utilizando BAP en proporciones de 2,22 μ M, que fueron superiores a los tratamientos en los cuales no se utilizó esta citoquinina; y, a los obtenidos Patiño *et al.*, (2013), quienes en *Swietenia macrophylla*, al añadir 2 mg/l⁻¹ de BAP en combinación con 1 mg/l⁻¹ de AIB, obtuvieron el 70 % de explantes con brotes y un promedio de 0.17 cm de longitud.

En la presente investigación, se evidencio que el porcentaje de contaminación de embriones fue bajo con 6,67 % en el T2 (1 mg/L de 2,4-D), T3 (1,5 mg/l de 2,4-D) y T4 (2 mg/l de 2,4-D), respectivamente, resultados que son similares a los obtenidos por Luna, (2002), quien trabajando en *Abies religiosa*, alcanzó una contaminación de 5,4 2%, empleando hipoclorito de sodio comercial (6 % de cloro activo) durante 30 minutos. Los resultados bajos en la contaminación de los embriones, se deben probablemente a que el embrión es una estructura vegetal que está protegido por los tegumentos de la semilla, lo que lo vuelve mucho más

aséptico que los órganos exógenos de la planta.

En la presente investigación se evidenció que la adición de 1 mg/l de 2,4-D al medio de cultivo MS, permitió obtener el 35,56% de formación de callos embriogénicos; estos resultados son inferiores a los alcanzados por Díaz, (2011) en *Cedrela montana*, donde, empleando 2 mg/l de 2,4-D en el medio de cultivo MS, obtuvo el 80 % de callos formados, partiendo de hipocótilos y embriones inmaduros, así como también, a los reportados por ICTA (2003), que alcanzó un 40 % de formación de callos en *Abies guatemalensis*, Redher, usando una combinación hormonal a base de 2,4-D (2.0 mg/l) más BAP (1.0 mg/l).

La desinfección de los embriones obtenidos de las semillas de *Bursera graveolens*, utilizando hipoclorito de sodio al 50 %, por 10 minutos, permitieron evidenciar que el T9 (1 mg/L de ANA) y T10 (0,1 mg/L de AIA) presentaron el 13,33% de contaminación, respectivamente, estos datos son inferiores a los alcanzados por Bonilla (2014), quien trabajando en *Erithrina edulis*, obtuvo una contaminación del 75%, aplicando hipoclorito de sodio, al 5,25%; pero superiores a los alcanzados por Vacca (2014), quien obtuvo en su investigación el 1% de contaminación de los embriones, aplicando hipoclorito de sodio al 10%, en *Pterogyne nitens*.

En la fase de inducción de callos embriogénicos de *Bursera graveolens*, utilizando cuatro tipos de auxinas, en tres concentraciones, los resultados obtenidos demostraron que el T3 (1 mg/L de 2,4-D) alcanzó el valor promedio más alto de formación de callos embriogénicos ($63,33 \pm 2,36$), estos resultados son superiores a los obtenidos por Santamaría (2012), quien obtuvo un 55% de callos embriogénicos en *Cedrela montana*, usando una concentración hormonal de 4mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); así como

también, a los obtenidos por Ortega (2013), en *Caesalpinia spinosa*, que obtuvo un 56,7% de callos embriogénicos, mediante la utilización de 2 mg/L de 2,4-D + 1 mg/L de Kinetina; pero inferiores a los alcanzados por Gómez *et al* (2006), quienes trabajando en *Eucalyptus globulus*, obtuvieron un 80% de formación de callos, utilización una combinación hormonal de 2,0 mg/L de 2,4-D + 0,5 mg/L de BAP, con lo cual queda evidenciado que al existir un equilibrio hormonal auxina-citoquinina, existen mayores posibilidades de inducir la formación de callos embriogénicos.

CONCLUSIONES

Los mejores tratamientos para la desinfección de semillas de *Bursera graveolens* fueron utilizando 25 % de hipoclorito de sodio en un tiempo de inmersión de 15 minutos; y, 75 % de hipoclorito de sodio en un tiempo de inmersión de 5 minutos, los mismos que permitieron controlar la contaminación.

En la fase de desinfección e implantación *in vitro* de explantes de *Bursera graveolens* provenientes de campo, no se logró controlar la contaminación.

En el proceso de germinación de semillas de *Bursera graveolens*, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el método de escarificación mecánica.

En la fase de multiplicación *in vitro* de los explantes provenientes del invernadero, los resultados no fueron satisfactorios, obteniéndose en el T1 (1,0 mg/l de BAP) el mejor crecimiento de los explantes con un promedio de 0,04 mm. de altura y 0,4 hojas formadas por explante.

En la fase de inducción de callos embriogénicos a partir de embriones obtenidos de semillas de *Bursera graveolens*, con la utilización de 1mg/l de 2,4-D y Dicamba (0,5 y 1 mg/l) en el

medio de cultivo de MS, se obtuvieron los mayores porcentajes de formación de callos embriogénicos con un 35,56% y un 53,33%, respectivamente.

En la fase de inducción de callos embriogénicos, con la aplicación de 0,1 mg/l de Dicamba y 1 mg/l de AIA, se logró los valores más altos (60%) en la germinación de embriones provenientes de semillas de *Bursera graveolens*.

AGRADECIMIENTOS

A las Autoridades de la Universidad Nacional de Loja y al Laboratorio de Micropropagación Vegetal, por el apoyo técnico y financiero brindado para la ejecución de la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z. y Delgado, T. 2005. *Vegetación de los bosques secos de Cerro Negro-Cazaderos, Occidente de la Provincia de Loja*. 9-24 pp. En: Vázquez M., J. Freire y L. Suárez (Eds.). 2005. *Biodiversidad en los bosques secos de la zona de Cerro Negro-Cazaderos, occidente de la provincia de Loja: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas*. EcoCiencia, MAE y Proyecto Bosque Seco. Quito.
- Aguirre, Z. y Kvist, P. 2005. *Composición florística y estado de conservación de los bosques secos del sur-occidente del Ecuador*. Lyonia. Volumen 8 (2): 41-67pp.
- Aguirre, Z. y Kvist, P. 2005. *Composición florística y estado de conservación de los bosques secos del sur-occidente del Ecuador*. 35p.
- Aguirre, Z. y Kvist, P. 2009. *Composición florística y estructura de bosques estacionalmente secos en el sur-occidental de Ecuador, provincia de Loja, municipios de Macara y Zapotillo*. Arnaldoa 16 (2): 87 - 99, 2009.

- Álvarez, J., Rodríguez, J. y García, J. 2008. *Desinfección y selección de inóculo in vitro de Abies religiosa*. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. 4pag.
- Bonilla, A. 2014. *Microinjertación in vitro de Erythrina edulis* M. Familia (Fabaceae). Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias Programa de Biología. 63p.
- Chamba, P. 2014. *Estudio fenológico y análisis de calidad de semillas de tres especies forestales nativas, Promisorias del Bosque Seco, Provincia de Loja*. 135p.
- Chávez, E. y Namoc, J. 1993. *Informe: inventario forestal de bosques secos de la comunidad campesina de Andanjo – IDEAS Piura*.
- Conde, V. 2015. *Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento in vitro de hualtaco Loxopterygium huasango Spruce ex Engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja*. 125 p.
- Díaz, G. 2012. *Procesos morfogénicos in vitro de cedro (Cedrela montana moritz ex turcz.) Inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma*. Tesis Ing. Forestal. Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja. 90p.
- Dinerstein, E., Olson, D., Graham, D., Webster, A., Primm, S., Bookbinder, M., y Ledec, G. 1995. *A Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean*.
- Esquivel, E., Flores, A., Pérez, J., Jiménez, J. y Aguilar, M. A. 2009. *Mejoramiento genético y conservación de cultivos agrícolas y especies forestales*. CATIE.
- George, E. 1996. *Plant propagation by tissue culture; part 2*. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- Gómez, C., Uribe, M., Ríos, D. y Sánchez, M. 2006. *Inducción de callo embriogénico en Eucalyptus globulus Labill*. INCI. 31(10): 734-738p.
- Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. 2003. *Adaptación de un Método de Embriogénesis Somática Para La Regeneración de Embriones Asexuales de Pinabete (Abies guatemalensis Redher)*. 30p.
- Linares, P; Ponce, Á. 2005. *Tree community patterns in seasonally dry tropical forests in the Cerros de Amotape Cordillera, Tumbes, Perú*. Forest Ecology and Management 209:261-272.
- Luna, V. 2002. *“Inducción de respuesta morfogénica en Abies religiosa (Kunth) Schltdl. & Cham. y A. hickelii Flous & Gausen de la región del Cofre de Perote, Veracruz.”*. 72p.
- Minchala, J., Eras, V., Muñoz, L., Yaguana, M., Poma, R. y Delgado. G. 2013. *Propagación sexual y asexual de cuatro especies forestales nativas y promisorias de la Región Sur del Ecuador*. Revista CEDAMAZ. Vol.3. N°1. 15-17 p.
- Morillo, L. 2015. *Estudio Fenológico y Propagación de Bursera graveolens (Kunth) Triana & Planch En La Comunidad de Malvas, Cantón Zapotillo, Provincia de Loja*.
- Ortega, G., Soria, N., Taipe, M. y Reyes, C. 2013. *Inducción al proceso de callogenesis in vitro a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de Guarango (Caesalpinia spinosa) como coadyuvante para su preservación en el distrito metropolitano de Quito*. Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMOP-Q. Sangolqui - Ecuador. 12 p.
- Patiño, M. 2011. *Evaluación de métodos de desinfección y medios de cultivos para la multiplicación in vitro de Guarango (Caesalpinia spinosa Mol. O. Kuntz)*. 99p.
- Patiño, M., Reyes, H., Mora, W., Cevallos, O., Escobar, A., Arévalo, M., Nieto, J. y Morante, J. 2013. *Propagación clonal*

- in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (CAOBA). Ciencia y Tecnología. UTEQ. Quevedo-Ecuador. 8p.
- Poulsen, K; Stubsgaard, F. 1995. *Tres métodos de escarificación mecánica de semillas de testa dura. Técnicas para la escarificación de semillas forestales.* Serie Técnica. Manual Técnico, (36), 35p.
- Rebolledo, V., Aparicio, A. y Cruz, H. 2006. *Estudio Preliminar Para La Propagación in vitro de Dos Especies de Pinos.* Sistema de Información Científica Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 7p.
- Santamaría, A., Páez, T., Soria, N. y Reyes, C. 2012. *Establecimiento de un protocolo para la germinación in vitro e inducción a callo embriogénico de cedro (Cedrela montana) a partir de embriones zigóticos.*
- Sierra, R. (ed.). 1999. *Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental.* Proyecto INFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia, Quito. 194 pp.
- Tang, W. y Newton, R. 2004. *Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (Pinus virginiana Mill.).* Plant Science 167: 621-628pp.
- Torres, L., Suarez, I. y Gatti, K. 2013. *Propagación in vitro de Acacia mangium Willd. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* Vol 11 No. 1 (81 - 87) Enero - Junio 2013. 7p.
- Vacca, M., Bonomo, M., Avilés, Z. y Díaz, L. 2014. *Inducción de callos embriogénicos y formación de proembriones somáticos en Pterogyne nitens Tull "tipa colorada".*