

Callogénesis *in vitro* de El Redondo  
(*Magnolia yoronconte* Dandy) a partir de la  
siembra apolar de explantes foliares

Freddy Mauricio Llive Condor

**Zamorano - Honduras**  
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Noviembre, 2005

**ZAMORANO  
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN  
AGROPECUARIA**

***Callogénesis in vitro* de El Redondo (*Magnolia yoronconte* Dandy) a partir de la siembra apolar de explantes foliares**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el  
Grado Académico de Licenciatura

**Presentado por:**

**Freddy Mauricio Llive Condor**

**Honduras  
Noviembre, 2005**

El autor concede permiso a Zamorano para distribuir y reproducir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reserva los derechos de autor.

---

Freddy Mauricio Llive Condor

Honduras  
Noviembre, 2005

**Callogénesis *in vitro* de El Redondo (*Magnolia yoronconte* Dandy) a partir de la siembra apolar explantes foliares**

**Presentado por:**

Freddy Mauricio Llive Condor

**Aprobada:**

---

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.  
Asesor Principal

---

Abelino Pitty, Ph.D.  
Cordinador de Área temática  
Fitotecnia.

---

George Pilz, Ph. D.  
Asesor

---

Abelino Pitty, Ph.D.  
Director de la Carrera de  
Ciencia y Producción Agropecuaria.

---

José Linares, M.Sc.  
Asesor

---

George Pilz, Ph. D.  
Decano Académico

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A Dios por siempre estar a mi lado, ser una luz y nunca abandonarme en mis peores momentos.

A la Virgencita del Quinche y a la Virgen Dolorosa por siempre ser mis compañeras y mis guías en todo este camino.

A mis padres Jorge y Sarita por ser un ejemplo de trabajo, esfuerzo y sacrificio en la vida.

A mi tía Rosita por ser como mi segunda madre, darme su amor y ser un ejemplo en la vida.

A mis hermanos Wilson, Doris y Verónica por ser mi ejemplo de superación y amigos incondicionales.

A mis sobrinos Mayrita, Santi, Sarita y Ronny por ser los angelitos que alumbran nuestra familia.

## AGRADECIMIENTO

A Dios por su comprensión, compañía y siempre darme un día más de vida.

A toda mi familia por siempre confiar en mí y nunca darme la espalda en los malos momentos.

A la familia Pilatasig-Criollo, en especial a Juan Carlos y Elenita por darme su amistad sincera y hacerme sentir como en familia.

A la clase GENOMA´04 por permitirme vivir momentos únicos el tiempo que estuve con ellos.

A la clase NEMESIS´05 por acogerme, ser mis amigos y compañeros durante estos años en Zamorano.

A Karina A. por enseñarme a ver la vida desde otro punto de vista, ser mi amiga, mi colega y sobretodo por permitirme estar a su lado en sus momentos difíciles.

A Magus S., Carlos M., Fausto V., Isabel S., Guillermo C., Kenia M., Juan P. O., Fernando C., Silvia P., por ser siempre hacerme sentir su colega y sobretodo por su amistad sincera.

A Verónica M., Johanna E., Melina M., José M., Wilmer Ch., Diana G., Lian O., Xochil F., por su compañía, amistad desinteresada y siempre apoyarme durante todo este tiempo en la EAP.

A Gaby Q., Karla P., Gaby A., Cintia R., Alejandra G., Mónica M., por darme su amistad.

A la Ing. Dinie de Rueda, Dr. George Pilz y Ing. José Linares por sus consejos y apoyo en todo momento, durante todo el tiempo que duro este experimento.

A la Ing. María Bravo por su ayuda, amistad, consejos y apoyo incondicional durante el tiempo que la conocí.

A Zoila Sandoval y Erica Ramos por todo su apoyo, enseñanzas y amistad sincera durante todo el tiempo que compartimos en el laboratorio.

## RESUMEN

Llive, Freddy. 2005. Callogénesis *in vitro* de El Redondo (*Magnolia yoronconte* Dandy) a partir de la siembra apolar de explantes foliares. Proyecto de graduación del programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras.18p.

Los bosques latifoliados en los últimos años se han visto afectados por la pérdida de la biodiversidad, debido principalmente a la sobreexplotación de especies maderables. El Redondo (*Magnolia yoroconte*), por ser una especie endémica de la región centroamericana, también se ha visto afectada por este hecho, por tener baja regeneración natural. El cultivo de tejidos por ser una técnica de respuesta rápida y regeneración masiva fue utilizado en el estudio con el objetivo de crear un protocolo de establecimiento a partir de explantes foliares maduros. Para obtener la mejor formulación nutritiva, se realizó una prueba preliminar comparando WPM (Woody Plant Médium) y MS (Murashige y Skoog). También se realizó otras dos pruebas preliminares para evaluar el comportamiento de dos tipos de explantes: yemas axilares y láminas foliares. En el experimento de establecimiento se utilizaron las citocininas Kin y BAP con la auxina 2,4-D. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA), con dos niveles por cada tipo de citocinina: 20 y 30  $\mu\text{M}$  y dos niveles de auxina 7 y 14  $\mu\text{M}$ . Las variables analizadas fueron: la contaminación, oxidación y necrosis del explante. Se presentó un valor de 1.78 de necrosis (< 40% del explante afectado), al utilizar 20  $\mu\text{M}$  y 0  $\mu\text{M}$  de Kin y 2,4-D, respectivamente. La concentración de 14  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 20  $\mu\text{M}$  de Kin resultó ser la mejor para inducir formación callogénica, con un callo promedio de 2.37, es decir más del 10% de la lamina foliar formo callo. Se puede concluir que el mejor procedimiento para el establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte* a partir de láminas foliares fue utilizando las sales básicas del medio WPM y una concentración hormonal de 14  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 20  $\mu\text{M}$  de Kin, aunque presenta problemas de necrosis y oxidación de los explantes. Por este motivo se recomienda probar varios tipos y concentraciones de soluciones/mezclas de antioxidantes colocadas al medio, al igual que probar con diferentes consistencias del medio de siembra, para así bajar los niveles de oxidación. Además, se recomienda evaluar otros explantes de *M. yoroconte* para su regeneración *in vitro*.

**Palabras clave:** BAP, Kinetina, 2,4-D, establecimiento *in vitro*, WPM.

## CONTENIDO

	Pág.
Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de Firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de Cuadros.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Anexos.....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.2.1 General.....	2
1.2.2 Específicos.....	2
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	3
2.2 MATERIAL VEGETAL.....	3
2.3 PRUEBAS PRELIMINARES.....	3
2.3.1 Primera prueba preliminar: Evaluación de dos formulaciones nutritivas y dos tipos de explantes para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Magnolia yoronconte</i> .....	4
2.3.2 Segunda prueba preliminar: Siembra de yemas axilares en medio de cultivo WPM, modificando el procedimiento de desinfección.....	6
2.3.3 Tercera prueba preliminar: Siembra apolar de explantes foliares en medio WPM conteniendo cisteína como antioxidante.....	6
2.4 EXPERIMENTO PRINCIPAL.....	7
2.4.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Magnolia yoroconte</i> a partir de la siembra apolar de explantes foliares.....	7
2.4.2 Medio de cultivo.....	7
2.4.3 Desinfección del material.....	8
2.4.4 Siembra.....	8
2.4.5 Toma de datos.....	9
2.4.6 Diseño estadístico.....	9



<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>10</b>
3.1	PRUEBAS PRELIMINARES.....	10
3.1.1	Primera prueba preliminar: Evaluación de dos formulaciones nutritivas y dos tipos de explantes para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Magnolia yoroconce</i> .....	10
3.1.2	Segunda prueba preliminar: Siembra de yemas axilares en medio de cultivo WPM, modificando el procedimiento de desinfección.....	10
3.1.3	Tercera prueba preliminar: Siembra apolar de explantes foliares en medio WPM conteniendo cisteína como antioxidante.....	10
3.2	EXPERIMENTO PRINCIPAL.....	11
3.2.1	Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Magnolia yoroconce</i> a partir de la siembra apolar de explantes foliares.....	11
3.2.2	Calogénesis.....	11
3.2.3	Necrosis.....	12
3.2.4	Contaminación.....	13
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>16</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>18</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Pág.</b>
1.	Formulaciones básicas de Murashige y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) utilizadas para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Magnolia yoroconte</i> . Zamorano, Honduras, 2005.....	5
2.	Tratamientos hormonales de 2,4-D, Kin y BAP utilizados en el experimento principal para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. yoroconte</i> . Zamorano, Honduras, 2005.....	8
3.	Efecto de la auxina 2,4-D y las citocininas Kin y BAP, en la regeneración callogénica durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M.yoroconte</i> . Zamorano, Honduras, 2005.....	12
4.	Análisis de la necrosis durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. yoroconte</i> a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.	13
5.	Análisis de contaminación durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. yoroconte</i> a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.....	14

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
1	Mapa de distribución de la especie <i>Magnolia yoroconte</i> Dandi en Honduras.....	19

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>		<b>Pág.</b>
1	Descripción de El Redondo.....	18
2	Micropropagación de especies leñosas.....	20
3	Planta de <i>M. yoroconte</i> adquirida en el Jardín Botánico Lancetilla, que tiene un año de edad. Zamorano, Honduras, 2005.....	22
4	Estudio de propagación clonal de la especie <i>Magnolia grandiflora</i> , realizado por el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Querétar.....	22
5	Parámetros de categorización de formación callogénica que se observó en el experimento de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. yoroconte</i> a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005...	23
6	Tipos de oxidación que se presentaron en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. yoroconte</i> a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.....	23
7	Niveles de necrosis que se presentaron en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. yoroconte</i> a partir de explantes foliares Zamorano, Honduras, 2005.....	24

## 1. INTRODUCCIÓN

La República de Honduras ubicada en América Central, tiene un área territorial de 112,492 km<sup>2</sup>; de esta área, el 80% (89,993.6 km<sup>2</sup>) reúne características para vocación forestal. En la actualidad la cobertura forestal es de 56,805 km<sup>2</sup> (63%), de los cuales 28,990 km<sup>2</sup> (51%) corresponden a bosque latifoliado (Brown 1997).

Durante años y debido principalmente a la deforestación y la expansión de la frontera agrícola los bosques latifoliados han sido muy mal manejados, causando un efecto de pérdida de la biodiversidad de varias especies forestales. Como consecuencia, varias especies forestales se encuentran en peligro de extinción, algunas de alto valor económico y la mayoría de alto valor biológico (ESNACIFOR y OIMT 1998).

El número de estudios realizados en los viveros forestales utilizando propagación convencional por medio de estacas o semillas de Redondo (*Magnolia yoroconte* Dandy) (Anexo 1), es bastante reducido. Un estudio en Honduras estableció que de un kilogramo de semillas, únicamente germinó un 43%, teniendo un prendimiento del 60% y un 5% de las plántulas fueron malformadas (PROECEN 2001). De esta especie, no se dispone de información suficiente de métodos alternativos de reproducción que permitan mantener la variabilidad genética para llegar a su domesticación en plantaciones y poderla explotar de forma comercialmente sostenible.

La información sobre investigaciones de reproducción *in vitro* de especies forestales es igualmente muy escasa (Anexo 2), siendo necesario investigar más a fondo la reproducción de cada una de las especies que en la actualidad están siendo sobreexplotadas por su alto valor económico. Son muchas las especies maderables no tradicionales de bosque tropical húmedo en Honduras que se han visto afectadas, una de ellas es El Redondo (*Magnolia yoroconte* Dandy), que es una especie endémica de Centroamérica (Honduras, Guatemala y Belice) (PROECEN 2001).

Para *M. yoroconte*, la falta de información sobre la reproducción *in vitro*, ha conducido a que se realice este estudio, puesto que esta es una de las varias especies maderables no tradicionales de los bosques húmedos tropicales que presenta serios problemas de regeneración natural. Los pocos estudios de reproducción *in vitro* realizados en magnoliáceas, datan del viejo continente y hacen mención que la propagación por medio de brotes axilares en magnolias es muy difícil, puesto que existe un alto contenido de sustancias fenólicas; también se ha reportado el uso de la propagación vía embriogénesis somática con buenos resultados (Kamenicka *et al.* 2000).

Mediante este estudio se pretende encontrar una técnica que permita facilitar el establecimiento *in vitro* de el Redondo (*Magnolia yoroconte*). Teniendo como principal limitante que la literatura no reporta experimentos utilizando explantes foliares para la propagación *in vitro* de árboles forestales.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 General**

- Desarrollar un protocolo de establecimiento para la reproducción *in vitro*, que permita la inducción callogénica de la especie *Magnolia yoroconte*, partiendo de explantes foliares maduros.

### **1.2.2 Específicos**

- Evaluar la auxina 2,4-D y las citocininas BAP y Kin durante la etapa de establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte*.
- Evaluar el nivel de las hormonas 2,4-D, BAP y Kin durante la etapa de establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte*.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación (LCTM) de Zamorano, Honduras durante los meses de mayo - agosto de 2005. Dentro del laboratorio se contó con todas las condiciones y el equipo adecuado para el desarrollo del experimento.

### **2.2 MATERIAL VEGETATIVO**

Las plantas de *Magnolia yoroconte* que se utilizaron tanto en el experimento principal como en las pruebas preliminares de establecimiento, fueron compradas en el Jardín Botánico Lancetilla en enero del año en curso. Estas plantas fueron reproducidas a partir de semillas y tenían 1 año de edad en promedio. El material vegetativo tuvo un costo de 15 L./planta, adquiriéndose 12 plantas de tamaño casi similar con una altura promedio de 1.0 m (Anexo 3).

### **2.3 PRUEBAS PRELIMINARES**

Una de las principales limitantes de este estudio fue la insuficiente cantidad de material vegetal disponible, motivo por el cual se hizo necesario realizar tres pruebas preliminares para establecer el procedimiento de desinfección y el mejor tipo de explante a utilizar para el establecimiento del experimento principal.

En estos tres ensayos preliminares se consideraron dos tipos de explantes: foliares procedentes de hojas maduras y yemas axilares. A pesar de que la literatura no hace mención de resultados de experimentos utilizando explantes foliares de especies arbóreas se decidió utilizarlos dentro de estos experimentos para aportar información sobre su comportamiento.

Para la siembra se tomaron en cuenta dos medios de cultivo el WPM (Woody Plant Medium) y MS (Murashige y Skoog) dispensados en tubos de ensayo de 25 x 150 mm a razón de 10 ml por contenedor (Cuadro 1). En la primera prueba preliminar se utilizó las dos soluciones nutritivas, mientras que en las pruebas posteriores se utilizó únicamente el medio WPM. Las hormonas que se utilizaron para ambas formulaciones nutritivas fueron Kin 4 mg/l y 2,4-D 1.1 mg/l. El uso de estas hormonas se ha reportado en el medio MS de propagación *in vitro* de café a partir de explantes foliares (CIAT 1993).

### **2.3.1 Primera prueba preliminar: Evaluación de dos formulaciones nutritivas y dos tipos de explantes para el establecimiento *in vitro* de *Magnolia yoronconte***

Para la primera prueba preliminar se utilizó dos soluciones nutritivas: WPM y MS (Cuadro 1), además de dos tipos de explantes: yemas axilares y explantes foliares procedentes de hojas maduras. Debido a la limitada cantidad de material vegetal, se determinó una cantidad de 50 contenedores con WPM y 50 contenedores con MS.

Al momento de la siembra se utilizaron 16 contenedores con WPM y 16 con MS para las yemas y 34 contenedores con WPM y 34 con MS para los explantes foliares.

Para la desinfección de las yemas, se tomó como base el procedimiento del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, cuyos experimentos se realizaron en la propagación clonal de la especie *Magnolia grandiflora*, utilizando yemas axilares como explante (Anexo 4). El procedimiento consiste en:

- Realizar un prelavado de 15 min. con jabón líquido
- Remojar por 2 min. en alcohol al 70%
- Realizar una sumersión de 15 min. en una solución desinfectante de cloro comercial al 20% (v/v) más 2 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante.
- Realizar, a nivel de cámara de flujo laminar, tres enjuagues con agua destilada estéril de 5 min. cada uno.

La desinfección de las hojas cortadas en el invernadero se llevó a cabo utilizando el procedimiento de desinfección de hojas de café del CIAT (1993), el cual consiste en:

- Realizar un prelavado colocando las hojas en un beaker con un poco de jabón líquido y llevarlas bajo el chorro de agua de la llave durante 10 min.
- Realizar una sumersión de 30 min. en una solución desinfectante de cloro comercial al 2.6% (v/v) más 2 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante.
- Realizar, a nivel de cámara de flujo laminar, tres enjuagues con agua destilada estéril de 5 min. cada uno.

Finalmente, la hoja desinfectada fue colocada en papel estraza antes de realizar cortes de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup> conteniendo porciones de nervadura central. Este proceso se realizó con cada lámina foliar de forma individual. Los explantes foliares se sembraron de forma polar, es decir con la nervadura central en contacto con el medio.

Una vez finalizada la siembra, los tubos fueron sellados con parafilm y colocados en el cuarto de crecimiento a 16 horas luz y 25 °C.



Cuadro 1. Formulaciones básicas de Murashige y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) utilizadas para el establecimiento *in vitro* de *Magnolia yoroconte*. Zamorano, Honduras, 2005.

<b>Componentes</b>		<b>WPM <sup>π</sup></b> <b>(mg/l)</b>	<b>MS <sup>ω</sup></b> <b>(mg/l)</b>
<b>Macroelementos</b>			
Nitrato de calcio monohidratado	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	556	----
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	370
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	----	1900
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
Sulfato de potasio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990	----
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	1650
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	96	440
<b>Microelementos</b>			
Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9	16.9
Acido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2
Sulfato de zing heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6
Yoduro potasio	KI	0.83	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
<b>Hierro</b>			
Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.81
FeNaEDTA		37.3	50.00
<b>Vitaminas</b>			
Tiamina		1.0	0.4
Acido nicotínico		0.5	0.5
Glicina		2.0	----
Piridoxina HCl		0.5	0.5
<b>Otros</b>			
Inositol		100	100
Sucrosa		20000	30000
Phytigel		2850	8000
pH		5.7	5.7

Fuente: Lydiane, K. 1987.

<sup>π</sup> Woody Plant Médium

<sup>ω</sup> Murashige y Skoog

La toma de datos se llevó a cabo de forma semanal durante 3 semanas, utilizando el método de observación para determinar cada una de las variables a medir. Durante este tiempo las variables que se evaluaron fueron: la sobrevivencia y la presencia o ausencia de contaminación en cada uno de los explantes para cada tratamiento.

### **2.3.2 Segunda prueba preliminar: Siembra de yemas axilares en medio de cultivo WPM, modificando el procedimiento de desinfección**

La segunda prueba preliminar consistió en realizar la siembra únicamente de yemas axilares, con el fin de evaluar un diferente procedimiento de desinfección al de la primera prueba y conocer la reacción del explante. Para esta prueba se utilizó una solución antioxidante preparada a razón de 150 mg/l de ácido cítrico y 100 mg/l de ácido ascórbico al momento de la desinfección para reducir el alto índice de oxidación que se observó en la primera prueba.

Por ser una de las limitantes la poca cantidad de material vegetativo se realizaron únicamente 22 contenedores con medio WPM, el cual en la primera prueba preliminar dio una respuesta favorable.

La desinfección de las yemas se realizó utilizando como base el procedimiento de desinfección del Instituto Tecnológico de Monterrey tal como se describe en el apartado 3.3.1 con las siguientes modificaciones:

- Realizar un prelavado de 15 min con jabón líquido.
- Remojar por 2 min. en alcohol al 70%.
- Realizar una sumersión de 20 min. en una solución desinfectante de cloro comercial al 25% (v/v) mas 2 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante.
- Realizar, a nivel de cámara de flujo laminar, tres enjuagues con agua destilada estéril por 5 min. cada uno.
- Enjuagar en la solución antioxidante por 3 min.

Una vez finalizada la siembra, los tubos fueron sellados con parafilm y colocados en el cuarto de crecimiento a 16 horas luz y 25 °C.

La toma de datos se realizó de forma semanal durante 2 semanas, utilizando el método de observación para evaluar como única variable la presencia o ausencia de contaminación en las yemas axilares.

### **2.3.3 Tercera prueba preliminar: Siembra apolar de explantes foliares en medio WPM conteniendo cisteína como antioxidante**

En la tercera prueba preliminar se sembró únicamente explantes foliares, debido a que las yemas no respondieron de una forma favorable en las pruebas anteriores. Los explantes foliares se evaluaron utilizando como solución nutritiva el medio WPM, al que se le adicionó 100 mg/l de cisteína como antioxidante. Para la desinfección de las hojas cortadas y la preparación de explantes foliares se utilizó el mismo procedimiento que se describe para la primera prueba preliminar en el apartado 2.3.1.

Para poder llevar a cabo esta prueba se evaluaron 141 contenedores, en los que se sembraron 99 explantes foliares nuevos. El resto de los contenedores fue utilizado para

transferir 42 explantes que sobrevivieron de la primera prueba preliminar ya que el medio en que estaban presentaba oxidación.

Para esta prueba los explantes foliares se sembraron de forma apolar debido a que en la primera prueba preliminar se observó que las formaciones de tejido callogénico aparecían en el envés, en la porción de la nervadura central. En esta ocasión los explantes permanecieron en la oscuridad durante dos semanas, tomando como referencia que en el proceso de embriogénesis somática de café, los explantes foliares se mantuvieron por un período entre 4 a 6 semanas en total oscuridad.

La toma de datos se realizó de forma semanal durante 2 semanas, tomando el método de observación para la evaluación de las variables presencia o ausencia de contaminación, de necrosis del explante y de oxidación.

## **2.4 EXPERIMENTO PRINCIPAL**

### **2.4.1 Establecimiento *in vitro* de *Magnolia yoroconte* a partir de la siembra apolar de explantes foliares**

Basado en las observaciones realizadas en las tres pruebas preliminares, se logró determinar la mejor formulación nutritiva (WPM), el mejor tipo de explante (explantes foliares) y la mejor forma de siembra (apolar). Con esta información y observaciones preliminares se procedió a establecer el experimento principal para esta investigación.

### **2.4.2 Medio de cultivo**

La preparación del medio es una de las actividades esenciales dentro del experimento, puesto que brinda todos los elementos que determinarán la regeneración y la respuesta del tejido vegetal. El medio de cultivo utilizado en este experimento fue el medio básico WPM (Cuadro 1), al que se le añadió el antioxidante PVP (Polyvinyl Pyrrolidone). Se utilizó este antioxidante por ser uno de los antioxidantes más fuertes que se encuentran en el mercado y debido a los serios problemas de oxidación que presentó el material en las pruebas preliminares, causando necrosis y posteriormente muerte al tejido vegetal.

Cada uno de los macroelementos fue pesado y añadido de forma individual al medio de cultivo y para los microelementos se utilizaron las sales básicas WPM que fueron dispensadas en forma de solución madre. El PVP, por ser un producto cancerígeno fue pesado utilizando el equipo necesario de protección (guantes, mascarilla, una cuchara plástica).

Seguidamente el medio de cultivo fue dispensado en 15 beakers de 500 ml cada uno, para colocar los 15 tratamientos a base de 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), kinetina (6-furfurylamino purine) y BAP (6-benzylaminopurina) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos hormonales de 2,4-D, Kin y BAP utilizados en el experimento principal para el establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte*. Zamorano, Honduras, 2005.

2,4-D( $\mu$ M)	Testigo	Kin( $\mu$ M)		BAP( $\mu$ M)	
	0	20	30	20	30
0	0 - 0	0 - 20	0 - 30	0 - 20	0 - 30
7	7 - 0	7 - 20	7 - 30	7 - 20	7 - 30
14	14 - 0	14 - 20	14 - 30	14 - 20	14 - 30

Una vez realizado el medio de cultivo con los 15 tratamientos, se dispensó en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con la ayuda de jeringas dosificadoras, colocando 10 ml por contenedor. Previo a la preparación y dispensado del medio de cultivo los tubos de ensayo fueron rotulados en forma individual para llevar un mejor control de cada tratamiento. Una vez dispensado el medio, los contenedores fueron llevados al autoclave para ser esterilizados durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 psi. Después de la esterilización en el autoclave los tubos fueron colocados en gradillas inclinadas para que el medio se solidifique y después ser almacenados en la refrigeradora hasta el momento de la siembra.

#### 2.4.3 Desinfección del material

La parte de la planta que se extrajo fueron las hojas maduras que tenían una coloración verde oscuro y que se fueron seleccionando desde la parte apical superior de la planta hacia la base de la misma. Antes de ser utilizadas las plantas para este experimento fueron puestas en cuarentena por tres semanas dentro del invernadero para reducir los riesgos de contaminación dentro del experimento. Durante el período de cuarentena se realizaron dos aplicaciones semanales del bactericida Agrymicin<sup>®</sup> 16.5 WP (2g/l) y del fungicida Benlate<sup>®</sup> 50WP (2g/l); además se realizó una fertilización foliar con Florifert<sup>®</sup> (20-20-20) cada semana a razón de cuatro cucharaditas por bomba de 15 litros.

Las hojas fueron cosechadas el mismo día de la siembra para evitar su deshidratación. A continuación se prosiguió con la desinfección del material vegetal siguiendo el mismo procedimiento para la desinfección de las hojas como se detalla en la sección 2.3.1. Este procedimiento de desinfección fue establecido en la primera prueba preliminar, teniendo excelentes resultados en la desinfección de laminas foliares de *Magnolia yoroconte*.

#### 2.4.4 Siembra

Una vez desinfectadas las hojas, se procedió a la siembra en la cámara de flujo laminar. La hoja desinfectada fue colocada en papel estraza antes de preparar los explantes de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup> que contienen porciones de nervadura central. Este proceso se realizó con cada lámina foliar de forma individual.

Una vez preparados los explantes, se procedió a colocar un explante por contenedor de forma apolar (el haz en contacto con el medio). Después de la siembra los contenedores fueron sellados con papel parafilm y transportados al cuarto de crecimiento donde

permanecieron en completa oscuridad por un periodo de 6 semanas a una temperatura de 25 °C.

#### **2.4.5 Toma de datos**

La toma de datos fue llevada de forma semanal durante 5 semanas. Durante este tiempo se evaluó contaminación (presencia ó ausencia) y su causa sea por hongo o bacteria. Asimismo se evaluó necrosis, oxidación y tipo de callo.

Las evaluaciones de necrosis se basaron en 5 categorías:

- 1 = 1/5 (1-20%) del tejido necrótico
- 2 = 2/5 (21-40%) del tejido necrótico
- 3 = 3/5 (41-60%) del tejido necrótico
- 4 = 4/5 (61-80%) del tejido necrótico
- 5 = 5/5 (81-100%) del tejido necrótico

Para el tipo de callo se evaluaron 5 categorías:

- 0 = ausencia de callo
- 1 = leve formación de callo
- 2 = callo cubriendo más del 10% del tejido foliar
- 3 = callo cubriendo más del 25% del tejido foliar
- 4 = callo cubriendo más del 40% del tejido foliar

#### **2.4.6 Diseño estadístico:**

El experimento contó con 15 tratamientos, con 3 repeticiones y 15 tubos por tratamiento, para un total de 675 contenedores. El análisis del experimento se realizó utilizando un Diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA); se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), con un modelo lineal general (GLM) y una separación de medias de DUNCAN, utilizando el programa estadístico SAS<sup>®</sup> 2001.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

##### 3.1.1 Primera prueba preliminar: Evaluación de dos formulaciones nutritivas y dos tipos de explantes para el establecimiento *in vitro* de *Magnolia yoronconte*

Para las yemas axilares, a las tres semanas se observó una alta contaminación y oxidación en ambos medios de cultivo: 75% en WPM y 100% en MS; la contaminación observada se debió a hongos en su totalidad, al analizar estos datos se puede decir que el método de desinfección no fue el mejor.

En referencia a los explantes foliares se logró observar una mejor respuesta en cuanto a contaminación: 15% de contaminación en el medio WPM, mientras que en el medio MS el porcentaje de contaminación fue de 0%.

En esta primera prueba se observó que los explantes foliares son los que mejores resultados mostraron con respecto a las yemas axilares. Los explantes foliares que se encontraban en el medio WPM, empezaron a mostrar pequeños abultamientos callosos color crema en la superficie del explante que se encontraba en contacto con el medio, sobretodo en el área que circunda la nervadura central. Además se observó que este tipo de explante se comenzaba a encarrujar en respuesta a la leve formación callogénica.

##### 3.1.2 Segunda prueba preliminar: Siembra de yemas axilares en medio de cultivo WPM, modificando el procedimiento de desinfección

A las dos semanas de evaluación se observaron altos niveles de contaminación: en la primera semana se obtuvo una contaminación del 91% y para la segunda semana la contaminación fue del 100% de las yemas; la contaminación observada se debe a hongos en su totalidad.

En esta segunda prueba no se observó una respuesta favorable por parte de las yemas axilares, pudiendo determinarse que a través de este tipo de explante la propagación se dificulta por los altos niveles de contaminación endógena que presenta.

##### 3.1.3 Tercera prueba preliminar: Siembra apolar de explantes foliares en medio WPM conteniendo cisteína como antioxidante

Para esta tercera prueba, en la primera semana se presentó un 14% de contaminación y en la segunda semana se tuvo un 1% de contaminación. En la segunda semana se observó

además que varias plantas tienden siempre a seguir el proceso de oxidación, pero también hay algunas plantas que presentan una pequeña formación callogénica de color blanco cremoso.

Los explantes sembrados de forma polar en el primer experimento y que fueron transferidos a este nuevo medio, presentaron una formación callosa en la parte de la nervadura central que se encontraba en contacto con el medio de cultivo anterior, con el inconveniente que la misma estaba en proceso de necrosis.

En las siguientes semanas la gran parte de los explantes presentaron signos de necrosis y de una alta oxidación, debido posiblemente al alto contenido de fenoles que posee el explante y a la baja concentración de antioxidante utilizado en el medio.

## **3.2 EXPERIMENTO PRINCIPAL**

### **3.2.1 Establecimiento *in vitro* de *Magnolia yoroconte* a partir de la siembra apolar de explantes foliares**

Dentro del experimento principal que duro cinco semanas, se logró evaluar las tres variables establecidas como son: tipo de contaminación, niveles de necrosis y tipos de callo.

Para las variables necrosis y tipo de callo se evaluó únicamente la semana numero cinco, puesto que desde el punto de vista de propagación es lo que nos interesa.

### **3.2.2 Callogénesis**

Para el análisis de esta variable se tomó únicamente los datos de la quinta semana, para conocer el efecto de las hormonas con respecto al explante utilizado al final del proceso de establecimiento *in vitro*, además nos permite observar cual fue el mejor tratamiento para la etapa de establecimiento *in vitro* de *Magnolia yoroconte*.

En las dos primeras semanas el explante no presenta, reacción alguna puesto que solo se observan pequeñas burbujas sobre la lamina foliar. En la tercera semana varios de los explantes de los tratamientos ocho, doce y quince presentan en sus bordes y en el envés de la nervadura central leves protuberancias de color blanco cremoso, en esta semana también se observa que los tratamientos con altos niveles de 2,4-D presentan una especie de quemadura del explante.

Dentro del experimento existió una gran variabilidad callogénica, teniendo colores que fueron desde totalmente blancos hasta algunos que presentaron coloraciones verde-amarillenta; además se logro observar que varios de los explantes presentaban callo, a pesar de estar necróticos y estar en un medio oxidado (Anexos 5 y 6).

Cuadro 3. Efecto de la auxina 2,4-D y las citocininas Kin y BAP, en la regeneración callogénica durante la etapa de establecimiento *in vitro* de *M.yoroconte*. Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Concentración hormonal ( $\mu$ M)			Tejido callogénico $\pi$
	2.4-D	Kin	BAP	
1	0	0	0	0.00 e <sup>1</sup>
2	0	20	0	0.51 d
3	0	30	0	0.02 e
4	0	0	20	0.95 bc
5	0	0	30	0.78 cd
6	7	0	0	0.00 e
7	7	20	0	0.00 e
8	7	30	0	1.15 bc
9	7	0	20	0.86 bcd
10	7	0	30	0.78 cd
11	14	0	0	0.02 e
12	14	20	0	2.37 a
13	14	30	0	1.15 bc
14	14	0	20	1.11 bc
15	14	0	30	1.26 b

<sup>1</sup> Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Prueba de DUNCAN.

$\pi$  Tejido callogénico: 0 = ausencia de callo  
 1 = leve formación de callo  
 2 = callo cubriendo más del 10% del tejido foliar  
 3 = callo cubriendo más del 25% del tejido foliar  
 4 = callo cubriendo más del 40% del tejido foliar

En el análisis estadístico se pudo observar que si existe diferencia estadística significativa entre los quince tratamientos evaluados en el experimento. Aquí también se obtuvo un  $R^2$  muy bajo, razón por la cual existen muchas observaciones fuera de tipo. El coeficiente de variación igualmente sigue siendo muy elevado teniendo así una alta variabilidad en cada uno de los tratamientos hormonales, esta variabilidad puede deberse a que solo se están tomando los datos de la última semana.

### 3.2.3 Necrosis

Para el análisis de esta variable se tomó únicamente los datos de la quinta semana, puesto que se necesita saber el estado del explante al final del experimento para saber si puede o no ser trasplantado a una nueva solución nutritiva.

Dentro de esta variable al momento de la toma de datos se logró apreciar que existió una relación directa entre la necrosis y la oxidación del explante (Anexos 6 y 7), porque a medida que el explante iba tomando una coloración oscura, el medio tendía a una coloración negra, lo que era efecto de la oxidación, razón por la cual solamente se evaluó la variable necrosis. Para esta variable se usaron los rangos establecidos en el apartado 2.4.4.



En el análisis estadístico se pudo observar que si existe diferencia estadística significativa entre los quince tratamientos evaluados en la variable necrosis (Cuadro 4). Para esta variable también se obtuvo un  $R^2$  muy bajo, razón por la cual existen muchas observaciones fuera de tipo. El coeficiente de variación del experimento sigue siendo muy elevado teniendo así una alta variabilidad en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 4. Análisis de la necrosis durante la etapa de establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte* a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Concentración de hormonal ( $\mu$ M)			Necrosis <sup>ω</sup>
	2,4-D	Kin	BAP	
1	0	0	0	4.82 ab <sup>1</sup>
2	0	20	0	1.78 k
3	0	30	0	2.50 ij
4	0	0	20	2.74 hi
5	0	0	30	2.31 ij
6	7	0	0	4.46 bc
7	7	20	0	5.00 a
8	7	30	0	2.08 jk
9	7	0	20	3.89 de
10	7	0	30	3.61 efg
11	14	0	0	4.30 cd
12	14	20	0	3.35 fg
13	14	30	0	3.20 gh
14	14	0	20	3.84 def
15	14	0	30	3.80 def

<sup>1</sup> Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Prueba de DUNCAN.

<sup>ω</sup> Niveles de necrosis: 1 = 1/5 (1-20%) del tejido necrótico  
 2 = 2/5 (21-40%) del tejido necrótico  
 3 = 3/5 (41-60%) del tejido necrótico  
 4 = 4/5 (61-80%) del tejido necrótico  
 5 = 5/5 (81-100%) del tejido necrótico

La menor incidencia de necrosis se puede observar al utilizar 20 y 0  $\mu$  M de Kin y 2,4-D, respectivamente. Por el contrario la concentración hormonal de 7 y 20  $\mu$  M de 2,4-D y Kin respectivamente presentan el más alto promedio de necrosis. Se puede apreciar que a medida se va aumentando los niveles de 2,4-D la necrosis del explante va teniendo una mayor influencia, esto debido posiblemente a las propiedades herbicidas del 2,4-D que, a medida que aumenta la dosis, puede afectar la respuesta regenerativa del explante.

### 3.2.4 Contaminación

Tomando en cuenta que en este experimento, el total de contaminación fue provocada por hongos en las primeras semanas de establecido el cultivo, para el análisis de estos datos se hizo necesario realizar un promedio general de cada uno de los tratamientos durante las cinco semanas que fue evaluado el explante.

Analizando los resultados de la contaminación podemos apreciar que varios de los tratamientos presentan diferentes niveles de contaminación (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de contaminación durante la etapa de establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte* a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Concentración hormonal ( $\mu$ M)			Porcentaje (%)
	2.4-D	Kin	BAP	
1	0	0	0	11
2	0	20	0	9
3	0	30	0	2
4	0	0	20	4
5	0	0	30	16
6	7	0	0	0
7	7	20	0	16
8	7	30	0	0
9	7	0	20	16
10	7	0	30	7
11	14	0	0	20
12	14	20	0	0
13	14	30	0	0
14	14	0	20	4
15	14	0	30	7

#### 4. CONCLUSIONES

La mejor formulación nutritiva para la inducción callogénica de *M. yoroconte* a partir de explantes foliares en el laboratorio fue la formulación WPM.

La mejor combinación de hormonas para la inducción callogénica de *M. yoroconte* a partir de explantes foliares en el laboratorio fue la de 14 y 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y Kin, respectivamente.

El BAP utilizado a altas concentraciones 30  $\mu\text{M}$  y combinado con 14  $\mu\text{M}$  de 2,4-D también tuvo un efecto positivo en la regeneración callogénica de explantes foliares de *M. yoroconte*.

## 5. RECOMENDACIONES

Evaluar diferentes tipos y concentraciones de soluciones/mezclas antioxidantes en el medio de cultivo como lo son: carbón activado, PVP, cisteína, ácido cítrico y ácido ascórbico.

Utilizar diferentes consistencias del medio de siembra como ser: suspensiones con agitación constante, medios líquidos ó medios bifásicos.

Evaluar otros tipos de explantes de *Magnolia yoroconte* para su regeneración *in vitro*.

Utilizar concentraciones más elevadas de 2,4-D, Kin y BAP partiendo de las establecidas en el experimento.

Realizar cambios de medio cada 3 semanas para reducir la oxidación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Brown, R. 1997. Conservación y manejo sustentable de los bosques latifoliados en la costa norte de Honduras. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). XI Congreso forestal mundial. Consultado el: 1 sep. 2004. Disponible en: [http://www.fao.org/forestry/foda/wforcong/PUBLI/V8/ES/V8S\\_E6.HTM](http://www.fao.org/forestry/foda/wforcong/PUBLI/V8/ES/V8S_E6.HTM)

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Ed. Roca, W. N.; Mrogiski, L. A.. Cali, Colombia. 969 p.

ESNACIFOR (Escuela Nacional de Ciencias Forestales); OIMT (Organización internacional de las Maderas Tropicales). 1998. Especies maderables no tradicionales del bosque húmedo tropical de Honduras.

Kamenicka, A.; Lanáková, M.; Kuba, J. 2000. MICROPROPAGATION OF SELECTED MAGNOLIA spp. IN VITRO. The Grant Agency of the Slovak Academy of Sciences, project No. 51-51-1036/00-2000. Fuente original: MERKLE, S.A., WATSON-PAULEY, B.A., 1994: Ex vitro conversion of pyramid Magnolia somatic embryos. Hort Science, 29, s. 1186-1188. Consultado 7 sep. 2004. Disponible en: [http://www.bz.upjs.sk/zborniky/zb\\_dreviny/kamen.pdf](http://www.bz.upjs.sk/zborniky/zb_dreviny/kamen.pdf)

Lydiane, K. 1987. Plants from test tubes. an introduction to micropropagation. Portland, Oregon. 160p.

PROECEN. 2001. (Proyecto PD 8/92 Rev.2 Estudio de Crecimiento de Especies Nativas de Interés Comercial en Honduras). Estudio de Comportamiento de Especies Maderables Nativas con Importancia Comercial del Bosque Húmedo Tropical de Honduras. Base de datos PROECEN. Consultado 4 sep. 2004. Disponible en: [http://www.lancetilla-oimt.hn/proecen/componentes\\_investigacion/fenologia\\_semillas.html](http://www.lancetilla-oimt.hn/proecen/componentes_investigacion/fenologia_semillas.html)

## 7. ANEXOS

### Anexo 1

#### Descripción de El Redondo

##### Taxonomía

Orden: Magnoliales

Familia: Magnoliaceae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Género: *Magnolia*

Especie: *goroconte*

Nombre común: Redondo, Canelón, Yaro, Cucharón.

##### Botánica

Es un árbol que puede superar los 40 m de altura, con un diámetro promedio de 100 cm, con fuste recto y limpio. La corteza es lisa, pardusca amarillosa y áspera. Sus hojas son simples, alternas, lustrosas, elípticas y coriácea; el color del haz es verde oscuro y el envés verde. El nervio central es hundido por arriba y prominente por abajo; de 10 a 14 pares de nervios secundarios (Thirakul 1992). Sus flores son terminales de fragante aroma, bisexuales, de color blanco amarillento, su etapa de floración es entre mayo – agosto. La fructificación se da de agosto – noviembre, teniendo una producción anual la cual se inicia a partir de 10 a 15 años de edad (Benítez *et al.*1988). El fruto es dehiscente, aromático de color verde oscuro cuando esta maduro; posee un promedio de 60 semillas de color cremoso, triangulares de aproximadamente 1 cm de diámetro, su testa es color café claro, tiene textura lisa opaca de consistencia coriácea (ESNACIFOR/OIMT/ PROECEN 2003).

##### Propagación

En la actualidad varias de las especies latifoliadas presentan problemas de fructificación y regeneración cuando ocurren periodos largos de sequía, tal es el caso de las especies *Tapirira guianensis* (Piojo) que de un 80 % de la floración no alcanza a formar ningún fruto y la especie *Magnolia goroconte* (Redondo) con un 80 % de floración, formo un 15 % de frutos (PROECEN 2001); además de este problema varias especies presentan semillas recalcitrantes, razón por la cual, en la mayoría de los casos pierden viabilidad ó son consumidas por animales.

La forma de propagación más utilizada para *Magnolia yoroconte* es por semilla, teniendo como principal limitante la rápida pérdida de viabilidad, razón por la cual la literatura establece que al utilizar semillas estas se deben maceradas para eliminar la pulpa carnuda dejándolas en agua por algunos días; una vez limpiadas las semillas pueden ser sembradas pero se obtienen bajos porcentajes de germinación alrededor de 20 a 30 %, el cual mejora al realizar un tratamiento pregeminativo aumentando de 40 a 65 % la germinación, este consiste en escarificación en arena húmeda en cámaras frías a 4°C. (Benítez *et al.* 1988); en otras especies de magnolias (*M. acuminata*, *M. grandiflora*, *M. liliiflora*, *M. officinalis*) se pudo mejorar la germinación cuando las semillas son estratificadas a 40°F. por 2 a 4 meses (Knox 1994). También se menciona que se pueden realizar acodos aéreos para su propagación, estando las plantas listas uno o dos años después para ser separadas de la madre.

### Hábitat

El Redondo crece en bosques muy húmedos sub-tropicales, a elevaciones que van desde los 400 a 1500 msnm, prefiere suelos profundos bien drenados de textura entre franca y franco-arenosa, con precipitaciones mayores a 2000 mm.

Se encuentra diseminada en los departamentos de Yoro, Atlántida, Santa Bárbara y Copán (Figura 1); específicamente en sitios como Los Encuentros, Toncontín, Atlántida y el Jardín Botánico Lancetilla (PROECEN 2001). En una gira realizada por parte de la clase de Ecología de Zamorano en el 2004 se encontró a *Magnolia yoroconte* en las inmediaciones del Lago de Yojoa<sup>1</sup>.



**Fuente:** Colección de Maderas Tropicales de Honduras, Ficha Técnica N.15 -Estudio de Crecimiento de Especies Nativas de Interés Comercial en Honduras (PROECEN)

**Figura 1.** Mapa de distribución de la especie *Magnolia yoroconte* Dandi en Honduras.

<sup>1</sup> Agudelo, N. 2004. Comunicación personal.

**Fuente:**

Benítez, R. F.; Montesinos, J. L. 1988. Catalogo de cien especies forestales de Honduras: Distribución, propiedades y usos. Siguetepeque, Honduras. ACDI/ESNACIFOR/COHDEFOR. 216 p.

ESNACIFOR (Escuela Nacional de Ciencias Forestales); OIMT (Organización internacional de las Maderas Tropicales); PROECEN (Proyecto PD 8/92 Rev.2 Estudio de Crecimiento de Especies Nativas de Interés Comercial en Honduras). 2003. Guías silviculturales de 23 especies forestales del bosque húmedo de Honduras. Siguetepeque, Honduras. 271 p.

Knox, G. W. 1994. Magnolias. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Consultado 2 sep. 2004. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/MG270>

PROECEN. 2001. (Proyecto PD 8/92 Rev.2 Estudio de Crecimiento de Especies Nativas de Interés Comercial en Honduras). Estudio de Comportamiento de Especies Maderables Nativas con Importancia Comercial del Bosque Húmedo Tropical de Honduras. Base de datos PROECEN. Consultado 4 sep. 2004. Disponible en: [http://www.lancetilla-oimt.hn/proecen/componentes\\_investigacion/fenologia\\_semillas.html](http://www.lancetilla-oimt.hn/proecen/componentes_investigacion/fenologia_semillas.html)

Thirakul, S. Trad. Montesinos, J.L. 1992. Manual de dendrología del bosque latifoliado. La Ceiba, Honduras. ACDI-COHDEFOR. 461 p.

**Anexo 2.****Micropropagación de Especies Leñosas**

La micropropagación es una biotecnología que se aplica a especies vegetales con el fin de obtener una población en el menor periodo de tiempo posible. Se la conoce como una biotecnología de “respuesta rápida”, puesto que se logran resultados en periodos de 3 a 6 meses, en contraposición con otras biotecnologías en las que el tiempo de investigación es mayor (SICA s.f.).

Los problemas más serios encontrados en la propagación de especies arbóreas *in vitro* son la variación genética en respuesta a la regeneración y el proceso de maduración. Otro de los problemas esta la formación de órganos y plantas aberrantes, la dificultad para erradicar las infecciones internas y la secreción de sustancias tóxicas como fenoles y sustancias volátiles (CIAT 1993).

Un factor que resulta extremadamente importante en el desarrollo *in vitro* de las especies maderables es la edad del explante; ha sido demostrado que la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes o maduros. Sin embargo, aunque se logre determinar la edad del



material, el mejor explante se lo debe determinar experimentalmente para cada una de las especies leñosas (CIAT 1993).

Dentro de las especies leñosas más extensivamente estudiadas en los últimos años están las forestales, dentro de ellas las coníferas, es así que los explantes comúnmente utilizados en estas especies han sido los embriones, partes de plántulas, los cotiledones y los hipocotilos provenientes de semillas germinadas *in vitro* (CIAT 1993). En un estudio de micropropagación realizado en Europa con magnolias se utilizó tres especies (*Magnolia liliiflora*, *Magnolia salicifolia* y *Magnolia xsoulangiana*), usando segmentos nodales de plantas adultas. Al evaluar el crecimiento y la proliferación de las tres en un ambiente similar, se determinó que de *M. liliiflora* era la que tenía mayores problemas de regeneración usando este explante (Kamenicka *et al.* 2000). Merkle, citado por Kamenicka *et al.* (2000), hace mención que la micropropagación por medio de brotes axilares en magnolias es muy difícil, puesto que existe un alto contenido de sustancias fenólicas; al contrario utilizando la propagación vía embriogénesis somática observo que obtenía mejores resultados.

**Fuente:**

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Ed. Roca, W. N.; Mrogiski, L. A.. Cali, Colombia. 969 p.

Kamenicka, A.; Lanáková, M.; Kuba, J. 2000. MICROPROPAGATION OF SELECTED MAGNOLIA spp. IN VITRO. The Grant Agency of the Slovak Academy of Sciences, project No. 51-51-1036/00-2000. Fuente original: MERKLE, S.A., WATSON-PAULEY, B.A., 1994: Ex vitro conversion of pyramid Magnolia somatic embryos. Hort Science, 29, s. 1186-1188. Consultado 7 sep. 2004. Disponible en: [http://www.bz.upjs.sk/zborniky/zb\\_dreviny/kamen.pdf](http://www.bz.upjs.sk/zborniky/zb_dreviny/kamen.pdf)

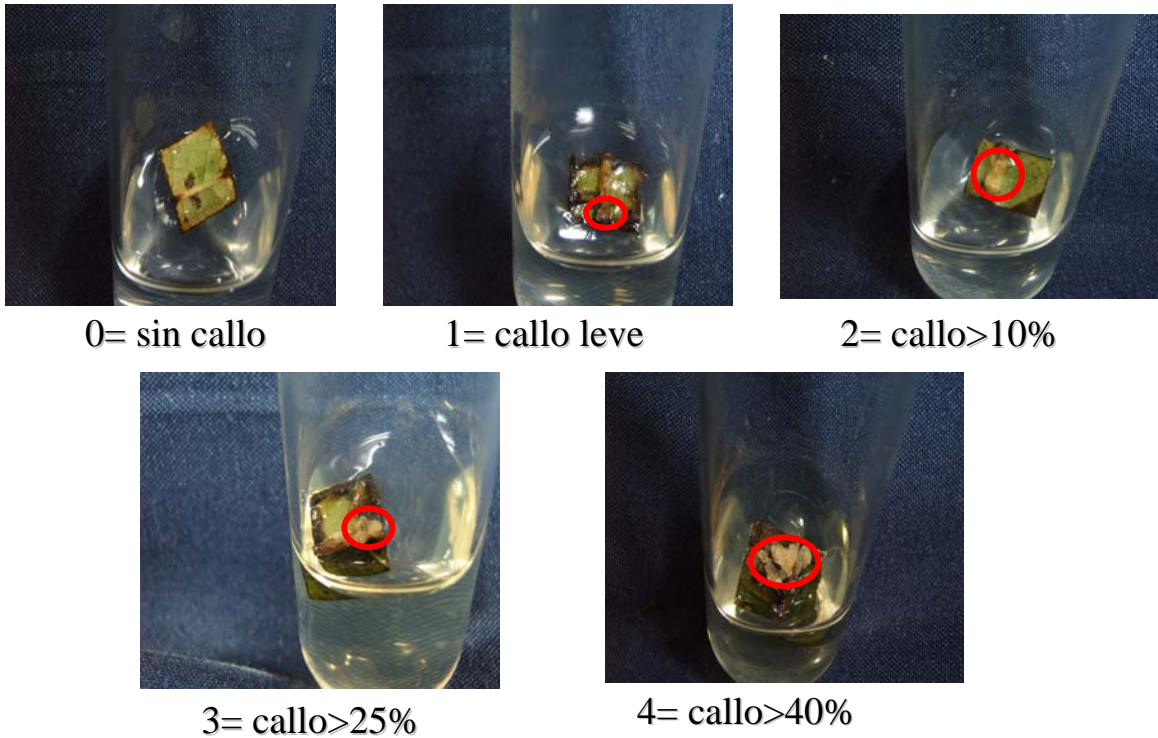
La micropropagación como herramienta para la producción vegetal. s.f. Base de datos SICA. Consultado 1 sep. 2004. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/fibras/microprop.htm>



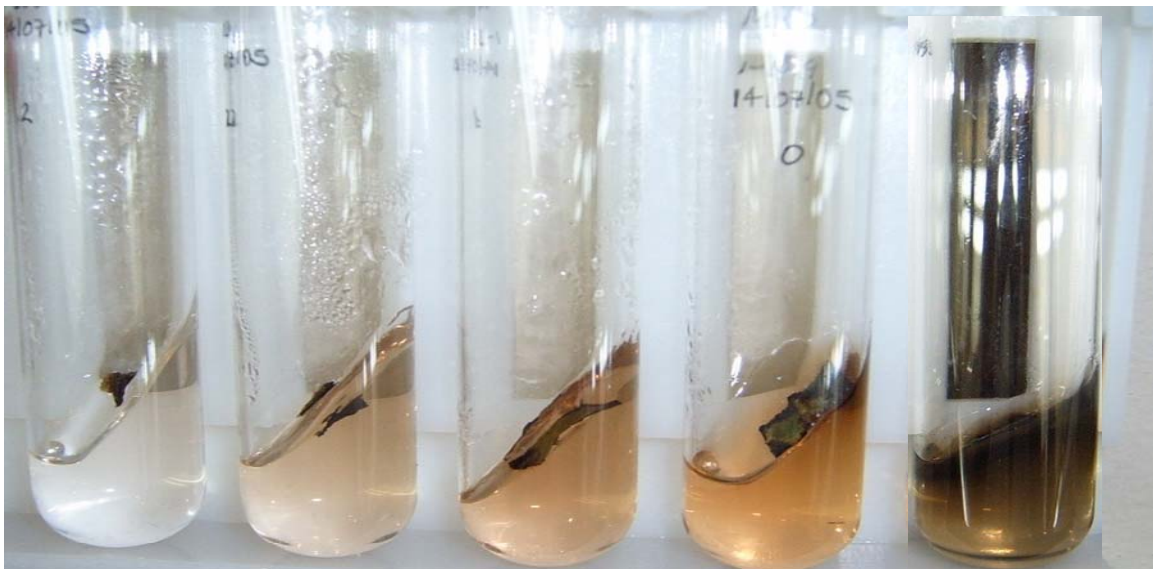
**Anexo 3.** Planta de *M. yoroconte* adquirida en el Jardín Botánico Lancetilla, que tiene un año de edad. Zamorano, Honduras, 2005.

**Anexo 4.** Estudio de propagación clonal de la especie *Magnolia grandiflora*, realizado por el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Querétaro.

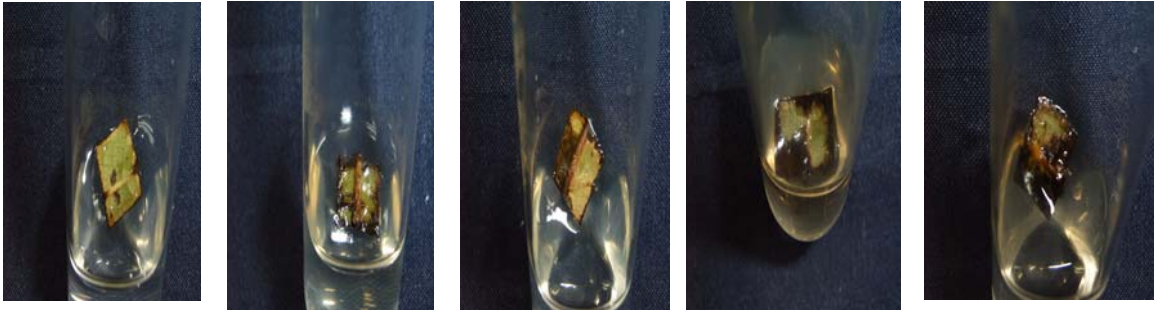
Etapa	No. De Experimentos	Técnicas Exitosa	Resultado
Desinfestación	4	Alcohol al 70% por 2 min. clorex al 20 % + 1.0 %de chanpú Menen tiempo: 15 min con 3 enjuagues agua DE.	10 % de contaminación
Inducción	16	Siembra de yemas axilares MS + BA(1.5) + ANA(0.6) + 2-4 D (0.5)	90 % de éxito
Prolifereción	4	Resiembra de Yemas MS +BA(1.6) + ANA(0.2)	x2 cada 6 semanas Potencial: 1400/yema/año
Enraizamiento	2	Siembra de plantulas MS/3+IBA(0.2)+ 2-4D(0.2)	100 % (Expontaneo) duración: 6 semanas
Adaptación	0	Sustrato: Peat- Moss	-
Crecimiento	0	-	-



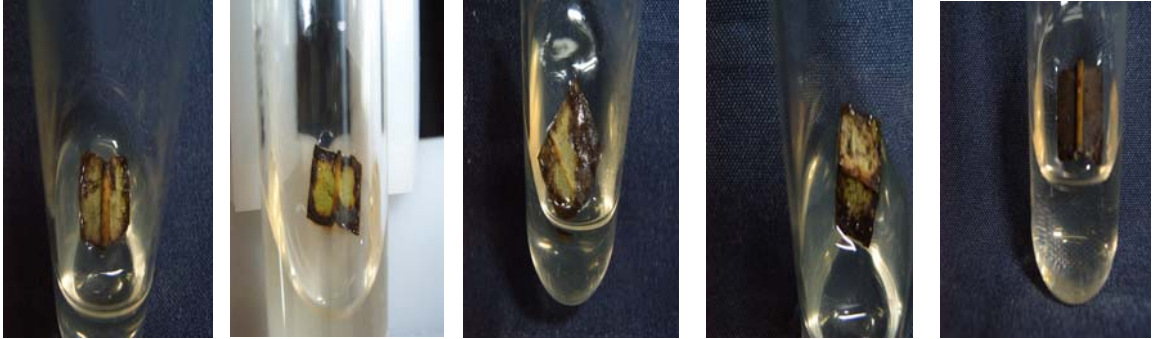
**Anexo 5.** Parámetros de categorización de formación callogénica que se observó en el experimento de establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte* a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.



**Anexo 6.** Tipos de oxidación que se presentaron en la etapa de establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte* a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.



1= (1-20%) 2= (21- 40%) 3= (41- 60%) 4= (61- 80%) 5= (81- 100%)



**Anexo 7.** Niveles de necrosis que se presentaron en la etapa de establecimiento *in vitro* de *M. yoroconte* a partir de explantes foliares. Zamorano, Honduras, 2005.