

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO
IN VITRO DE BÁLSAMO (*Myroxylon balsamum*) EN EL
SALVADOR.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
NIDIA ESTEPHANIE NÓCHEZ PERDOMO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Ciudad Universitaria, San Salvador, Junio de 2018.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO
IN VITRO DE BÁLSAMO (*Myroxylon balsamum*) EN EL
SALVADOR.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

NIDIA ESTEPHANIE NÓCHEZ PERDOMO

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESORAS:

M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA
BIÓLOGA E INGENIERA AGRÓNOMA NELLY RUTH GUERRERO

Ciudad Universitaria, San Salvador, Junio de 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO
***IN VITRO* DE BÁLSAMO (*Myroxylon balsamum*) EN EL**
SALVADOR.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

NIDIA ESTEPHANIE NÓCHEZ PERDOMO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

TRIBUNAL CALIFICADOR:

M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA

LIC. CARLOS ALBERTO ELÍAS

M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA

BIÓLOGA E ING. AGRÓNOMA NELLY RUTH GUERRERO

Ciudad Universitaria, San Salvador, Junio de 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

LIC. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FISCAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA

DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA:

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERÓN.

Ciudad Universitaria, San Salvador, Junio de 2018

DEDICATORIA

A mis padres Paz Angélica y Reynaldo Nóchez por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su paciencia, comprensión, apoyo incondicional y por motivarme siempre.

A mis hermanas Tanya y Elbi Nóchez, por su cariño y apoyo incondicional, ya que siempre han estado para ayudarme cuando más lo he necesitado.

A mis abuelos Mamá Zoila Romero y Papá Carlos Perdomo por inspirarme en seguir esforzándome por cumplir mis metas y superándome cada día.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a mis **padres Paz Angélica y Reynaldo Nóchez, hermanas Tanya y Elbita Nóchez y mis abuelos Mamá Zoila Romero y Papá Carlos Perdomo** por haberme forjado como la persona que soy, por el apoyo incondicional que siempre me han demostrado en toda mi vida.

A mis asesoras **M.Sc. Yanira Ventura Bióloga e Ingeniera Agrónoma Nelly Guerrero**. Gracias por la orientación, tiempo, paciencia y consejos durante todo el desarrollo de mi tesis.

A los miembros del tribunal calificador **M.Sc. Zoila Virginia Guerrero y Lic. Carlos Elías** gracias por su tiempo y orientación en el desarrollo de mi trabajo.

A la Escuela Nacional de Agricultura "Roberto Quiñonez" (ENA) por permitirme realizar el trabajo en las instalaciones del laboratorio de biotecnología vegetal.

Estaré siempre agradecida con los trabajadores y tesistas del laboratorio de biotecnología vegetal de ENA: **Ing. Claudia, Yuri, Blanca, Elmer, Eduardo, Paola, Marielos y Eloisa**. Por su apoyo incondicional y compartir sus valiosas experiencias.

A la **Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad de El Salvador y a sus catedráticos** por los conocimientos adquiridos en mi carrera, los cuales me serán útiles para desempeñarme en mi carrera como bióloga.

A mis amigos porque siempre he sabido contar con su amistad, por su ayuda, ánimos, consejos, paciencia y apoyo.

ÍNDICE

Pag.

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE ANEXOS	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO DEL BÁLSAMO (<i>MYROXYLON BALSAMUN</i>).....	4
3.1.1 <i>Origen y Distribución</i>	4
3.1.2 <i>Etimología del Bálsamo</i>	4
3.1.3 <i>Clasificación taxonómica</i>	6
3.1.4 <i>Descripción botánica</i>	7
3.1.5 <i>Usos del bálsamo</i>	8
3.1.6 <i>Características Orgánica</i>	10
3.1.7 <i>Reproducción del Bálsamo</i>	10
3.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	11
3.2.1 <i>Técnicas de cultivo In Vitro</i>	12
3.2.2 <i>Etapas del cultivo In Vitro</i>	13
3.2.2.1 <i>Desinfección del material vegetal</i>	14
3.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	15
3.3.1 <i>Giberelinas</i>	15
3.3.2 <i>Auxinas</i>	15
3.3.3 <i>Citocininas</i>	16
3.3.4 <i>Ácido Abscísico (ABA)</i>	16
3.4 NECROSIS.....	16
3.5 TRABAJOS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE BÁLSAMO	16
4. HIPÓTESIS	19
4.1 <i>Hipótesis de investigación</i>	19
4.2 <i>Hipótesis nula</i>	19
4.3 <i>Hipótesis alternativa</i>	19
5. METODOLOGÍA	20
5.1 <i>Ubicación geográfica</i>	20
5.2 <i>Diagrama de procedimientos de laboratorio (Elaboración propia)</i>	21
5.3 <i>Metodología de campo</i>	22
5.4 <i>Manejo fitosanitario utilizado en el vivero de ENA 2017</i>	22
5.5 <i>Desinfección del material vegetativo</i>	22
5.5.1 <i>Preparación de medios de cultivo</i>	22
5.5.2 <i>Parámetros evaluados</i>	24
5.5.2.1 <i>Etapa de desinfección</i>	24

5.5.3. Parámetros evaluados.....	26
5.5.3.1 Etapa de establecimiento (Iniciación In Vitro):.....	26
5.6. PROCESAMIENTO DE DATOS	26
6. RESULTADOS.....	27
6.1 ETAPA DE DESINFECCIÓN	27
6.2 ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	32
6.3 PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS (COLA INFERIOR) PARA LA ETAPA DE DESINFECCIÓN.	39
6.4 PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE BÁLSAMO (<i>MYROXYLON BALSAMUM</i>) EN EL SALVADOR.	40
6.4.1 Colecta y manejo fitosanitario del material vegetal en vivero.....	40
6.4.2 Preparación de medios de cultivo.....	40
6.4.3 Pre-desinfección.....	41
6.4.4 Desinfección.....	42
6.4.5 Establecimiento.....	42
7. DISCUSIÓN.....	45
7.1 ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	45
7.2 ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.....	45
7.2.1 Necrosis.....	45
7.2.2. Contaminación.....	45
7.2.3 Brotación.....	46
8. CONCLUSIONES	47
9. RECOMENDACIONES	48
10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	49
11. ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
No. 1. Descripción Taxonómica, obtenida de Gómez (2015).....	7
No.2. Concentración stock para el desarrollo de MS basal (Murashige & Skoog 1962).....	26
No.3. Tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl).....	27
No.4. Composición de tratamiento para la etapa de establecimiento.	29
No. 5. Contaminación fúngica en la etapa de desinfección de <i>M. balsamum</i>	31
No. 6. Contaminación de bacterias presentes en la etapa de desinfección.....	33
No. 7. Yemas axilares vivas en la etapa de desinfección.....	35
No. 8. Necrosis presentes en la etapa de desinfección.....	37
No. 9. Días a brotación de la yemas axilares en la etapa de establecimiento.....	39
No. 10. Número de brotes por yemas axilares en la etapa de establecimiento.....	40
No. 11. Sobrevivencia de yemas axilares en la etapa de establecimiento de bálsamo.....	42
No. 12. Contaminación por hongos y bacterias en la etapa de establecimiento.....	44
No. 13. Yemas axilares necronizadas en la etapa de establecimiento.....	46

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Manejo Fitosanitario de la planta madre de bálsamo.....	57
Anexo 2. Materiales a utilizar en el método de desinfección.....	59
Anexo 3. Tabla de evaluación para etapa de desinfección y establecimiento.....	60
Anexo 4. Resultados de Hoyos y Amaya (2008).....	62

RESUMEN

En este estudio se elaboró el protocolo para la etapa de desinfección y establecimiento del cultivo *In Vitro* de bálsamo (*Myroxylon balsamum*) de la familia Fabaceae, como un aporte fundamental para futuros proyectos de propagación asexual de esta importante especie forestal, con los que se contribuya a la investigación de la recuperación de poblaciones disminuidas o casi inexistentes en El Salvador (Mroginski et al 2002; Díaz 2014). Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela Nacional de Agricultura "Roberto Quiñonez" (ENA). Se extrajeron segmentos nodales de ramas jóvenes de bálsamo como explantes. La desinfección del material vegetativo se realizó en diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) (0, 2, 3 y 4%) con tres gotas de Tween 20 y fueron sembrados en frascos de vidrio con medio de cultivo MS basal sin reguladores de crecimiento, el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia después de 30 días fue el tratamiento TD3 utilizando hipoclorito de sodio al 3%. La etapa de establecimiento de los segmentos nodales se realizó con la aplicación de hipoclorito de sodio al 3%. Los segmentos nodales fueron sembrados en cuatro tratamientos que consistieron en medios de cultivo MS basal suplementado con vitaminas, azúcares y diferentes concentraciones (0, 2, 5 y 10mg/L) de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), pH de 5.7 más phytigel. El mejor tratamiento fue el que se le aplicó el 5% de 6-Bencilaminopurina. Con esta investigación, se concluye que para una eficiente desinfección de las yemas axilares de *Myroxylon balsamum*, es indispensable utilizar agentes fungicidas y realizar una pre-desinfección utilizando agentes como Tween 20, detergente comercial y realizar la desinfección con hipoclorito de sodio con 3% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos. Además, en la etapa de establecimiento la concentración de 5mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) permitió obtener el mayor número de explantes de *M. balsamum* con brotación de yemas axilares.

1. INTRODUCCIÓN

El bálsamo (*Myroxylon balsamum*) es una planta nativa del bosque húmedo tropical y subtropical de Centroamérica hasta Perú. El bálsamo es considerado uno de los cultivos perennes más importantes del planeta, por ser explotado comercialmente para la producción de herramientas, artesanías, materiales de construcción, antibióticos, perfumes, jabones, barnices y óleos (Amaya 2012).

El bálsamo ha sido transcendental para la economía de El Salvador, por las propiedades conocidas de su resina, producto de gran importancia industrial, farmacéutica y medicinal (Amaya 2012). Durante años se ha adquirido la resina del bálsamo y se ha explotado la producción de este cultivo a tal grado que, en la actualidad, se encuentra en proceso de desaparición. Son diversas las causas por las cuales *Myroxylon balsamum* está amenazada en el país, el problema radica en la destrucción de su hábitat por la sobrepoblación y que los balsameros siguen utilizando el mismo método artesanal para la producción de resina, la cual degrada mucho al árbol; es por esto que existe la necesidad de realizar diversos estudios acerca de la propagación del bálsamo (MARN 2015; Rivera 2003).

En este estudio se elaboró el protocolo para la etapa de establecimiento del cultivo *In Vitro* de bálsamo (*Myroxylon balsamum*). El objetivo de este trabajo fue, la obtención de plantas de bálsamo (*M. balsamum*) mediante la técnica de cultivo *In Vitro*, a partir de yemas axilares. Así también, determinar la concentración adecuada de 6-bencilaminopurina (BAP) apropiada para el establecimiento del cultivo *In Vitro* de yemas axilares de *M. balsamum*. De esta manera se podrá contribuir a la recuperación de poblaciones disminuidas o casi inexistentes en El Salvador.

Las ramas jóvenes de bálsamo, se llevaron al laboratorio con el fin de eliminar cualquier contaminación superficial con hipoclorito de sodio (0, 2, 3 y 4%) con tres gotas de Tween 20 por 4 minutos. Después de diferentes lavados, se sembraron en los medios de cultivo.

Los resultados se obtuvieron a partir de los 30 días de la aplicación del protocolo, el tratamiento que obtuvo mayor sobrevivencia en la etapa de desinfección, se utilizó nuevamente en la etapa de establecimiento pero esta vez, en diferentes medios nutritivos que contenían concentraciones de 0, 2, 5 y 10 mg/L de 6-bencilaminopurina (6- BAP).

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un muestreo dirigido teniendo como parámetros evaluados en la etapa de desinfección la contaminación por hongos, bacterias y el promedio de sobrevivencia. En la etapa de establecimiento se evaluaron los parámetros de contaminación fúngica y bacteriana, días a brotación, número de yemas axilares por explantes y promedio de sobrevivencia y para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el planteamiento de hipótesis (cola inferior) para poder aceptar o rechazar la hipótesis alternativa y nula.

El tratamiento TD3 con 3% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos fue el más eficiente para desinfectar las yemas axilares, ya que disminuyó el porcentaje de contaminación de 83.33% obtenidos en el tratamiento TD1 a un 53.3% en el tratamiento TD3. En la etapa de establecimiento, el tratamiento TE3 con un medio de cultivo que contenía 6-Bencilaminopurina (BAP) con una concentración de 5mg/L permitió el mayor número de explantes de bálsamo con brotación de yemas axilares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Elaborar el protocolo para el establecimiento del cultivo *In Vitro* de yemas axilares del bálsamo (*Myroxylon balsamum*) en El Salvador.

1.2 Objetivosespecíficos

- Determinar el método de desinfección apropiado para la iniciación del cultivo *In Vitro* de yemas axilares de *Myroxylon balsamum*.
- Evaluar diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) para el establecimiento del cultivo *In Vitro* de yemas axilares de *Myroxylon balsamum*.
- Comprobar por medio de la campana de Gauss la aceptación o rechazo de la hipótesis nula y alternativa.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO DEL BÁLSAMO (*Myroxylon balsamun*).

3.1.1 Origen y Distribución

El bálsamo crece y se desarrolla en el bosque húmedo tropical y sub tropical, con precipitación que alcanza los 1350 a 2000mm por año, temperatura que oscila de 24°C a 32°C y altura entre los 450 a 700 msnm (Marín et al 2007; Fuentes 1980; Orwa et al 2009).

En El Salvador el bálsamo, se puede encontrar en un rango altitudinal de 300 hasta los 1000 msnm, y es abundante en los departamentos de Sonsonate y la Libertad en los municipios de Chiltiupán, Tepecoyo, Teotepeque, San Julián, Ateos y Guaymango; que en conjunto se reconocen como la cordillera del Bálsamo, ubicada entre la zona central y occidente de El Salvador, con precipitación de 2000 mm/año, temperaturas menores a 24°C, con pendientes de 50% a más. El suelo que prefiere el bálsamo es franco areno-limoso con un pH de 5-8 (CONACYT 2008).

El bálsamo es considerado, por las culturas indígenas de la región de El Salvador, como el "cura todo"; en la actualidad sus subproductos son importantes para la fabricación de cosméticos y productos farmacéuticos (Browning 1971).

3.1.2 Etimología del Bálsamo

Según el Jardín Botánico de Missouri (Trópicos 2010), existen más de 30 registros de especies para el bálsamo. Por otro lado, El Dr. Pereire de Londres, fue quién originalmente dio el nombre científico a la especie *Myrospermum of Sonsonate*, posteriormente, otros científicos le cambiaron su nombre a *Myroxylon peruvianum*, luego un científico llamado Lorenzi propuso el nombre de *Myroxylon peruiferum* y por ultimo Harms en 1908 utilizó *Myroxylon balsamum*, y es así como se encuentra registrado actualmente (Revehe 2007).

De forma común, el bálsamo se conoce como "bálsamo del Perú", siendo el nombre más conocido mundialmente y da la impresión que el producto es de Perú, aunque en realidad es de El Salvador, Algunos historiadores explican que una de las razones de este nombre es a que en la época Colonial, debido a su valor comercial, se tuvo que tomar medidas preventivas contra la posibilidad de un ataque o asalto de piratas en las costas de El Salvador, la idea principal era que los ladrones conocieran el producto que fuese de Sur América para que lo fuesen a buscar ahí (Revehe 2007).

La otra razón que se documenta es por los muchos viajes de comercio que se hacían a lo largo de la costa Pacífica de Centroamérica, bajo el control de los españoles en el puerto de Callao en Perú y el puerto de Acapulco en México. El puerto de Acajutla de El Salvador, solo era un puerto de paso, donde se recogían diferentes productos como cacao, añil y bálsamo. Muchos autores sugieren que el nombre de bálsamo de Perú tiene más que ver con el comercio, ya que estos productos pasaban primero por el puerto de Callao antes de zarpar hacia Europa (Revehe 2007).

3.1.2.1 Historia del bálsamo en México y Centroamérica

Los orígenes de *Myroxylon* son olvidados, aunque según (Contreras 1979) existe evidencia que indica que Cuscatlán (El Salvador) fue el lugar en el que se encontró por primera vez este árbol. El documento que lo afirma es el Diccionario Histórico de El Salvador por Miguel Ángel García (1948), donde se documenta que los nativos desde tiempos inmemorables sabían de la existencia de su extracción y fue antes de la conquista de América.

Los españoles obtenían el bálsamo de los nativos por trueque, la recolección de resina se convirtió en una actividad importante en un pequeño grupo de pueblos de los alrededores de Guaymango en Izalco. Esta región costera, llegó a ser conocida como la costa del bálsamo (Browning 1975).

El Dr. Luis Alonso Hernández, en 1936, plantea la tesis en la que supone que el bálsamo era cultivado en el Jardín Real de México en los tiempos prehispánicos, y que también se tributaba a los líderes del área.

Además él cita una carta de Cortés, escrita en 1522 y dirigida al emperador Carlos V, en la cual comenta que el bálsamo fue llevado desde Cuscatlán (El Salvador), hasta la región de Coatepec, que hoy en día queda dentro del territorio Mexicano (Revehe 2007).

El uso de este árbol, fue escrito en 1576, Diego García Palacios menciona en una carta "Relación de Oidor", dirigida al Real Consejo de Indias, una descripción del proceso del bálsamo para poder sacar diferentes productos. Esto nos revela que en El Salvador se encontraba una cosecha importante de *Myroxylon*, donde se utilizaba primordialmente la madera como un recurso para la elaboración de construcciones, además menciona que el producto ya presentaba un valor monetario grande, establecido por los españoles y que el producto se exportaba en el puerto de Acajutla (Revehe 2007).

Por su importancia en la medicina y por ser una base para perfumes, la demanda del bálsamo se difundió por Europa, donde las bulas papales de 1562 y 1571 comentan que la iglesia autoriza su uso en el Crisma (Browning 1975). Actualmente hay extensiones grandes de terreno donde el cultivo principal era bálsamo, actualmente estas plantas al igual que "ceiba" (*Ceiba pentandra*), "copinol" (*Hymenaea courbaril*) "madrecacao" (*Gliricidia sepium*) y "caoba" (*Swietenia macrophylla*) han sido sustituidas por el cultivo del café, cacao y granos básicos, pero aún quedan remanentes del bosque natural, aunque son muy escasos (Díaz et al 2002).

3.1.3 Clasificación taxonómica

Tabla 1. Descripción Taxonómica, obtenida de Gómez (2015).

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Rosanae Takht.
Orden	Fabales Bromhead
Familia	Fabaceae Lindl.
Genero	<i>Myroxylon</i> L. f.
Especie	<i>balsamum</i>

3.1.4 Descripción botánica

3.1.4.1 El Tallo

El bálsamo es un árbol de lento crecimiento, de 30 a 40 metros de alto y 1 metro de diámetro, el tallo es cilíndrico, la copa es irregular con un denso follaje y la corteza de 10 mm de grosor. La coloración es gris oscura, lisa a levemente áspera en su exterior con lenticelas y pequeños puntos pardo amarillo. La corteza interna es de color cremoso amarillento con un olor fragante (Hoyos y Almanza 2008; Rojas y Córdoba 2014).

La madera es dura, compacta y pesada; posee una humedad de 30% y es muy resistente al ataque de hongos, insectos y descomposición (Alemán et al .2004). El duramen fresco es de color marrón rojizo con un ocasional tono amarillento; se vuelve rojo intenso o purpúreo tras la exposición (Rojas y Córdoba 2014).

3.1.4.2 Hojas

Las hojas son alternas, imparipinnadas con la base obtusa, compuestas por 5 a 11 folíolos de 6 a 20 cm de largo, incluyendo el peciolo, 3 a 4 cm de ancho, lanceolados de color verde amarillento en el haz y verde más oscuro en el envés.

El peciolo es de 1 a 4 cm de largo y el raquis es de 5 a 15 cm de largo, estos son pubescentes. (Rojas et al .2014; Orwa et al .2009; Fuentes 1980; Marín et al 2007). Los árboles de esta especie mantienen su follaje de forma permanente (Román et al 2012).

3.1.4.3 Flor

Posee inflorescencias en racimos axilares de 10 a 20 cm de largo, compuesta por flores pequeñas de color blanco, dispuestas en racimos sencillos, zigomórficas, hermafroditas, pubescentes, con cinco pétalos en la corona, filamentos libres, las anteras son acuminadas con 10 estambres libres uniformes, oblongas, amarillas, bilobulares (Marín et al 2007; Alemán et al 2004).

El cáliz posee cinco dientes no muy marcados, el estilo es corto, filiforme y el ovario es vellosa con uno o dos lóbulos. *Myroxylon* inicia a florear después de 5 años y ocurre en los meses de Marzo a Mayo (Rivera 2003; Marín y Flores 2007; Alemán et al 2004).

3.1.4.4 Fruto

El fruto es de color verde amarillento cuando está en el árbol y marrón amarillento cuando se seca, es una vaina plana indehiscente (sámara), aromática, alargada de 7 a 11cm de largo y 2 cm de ancho, anemócoras, envuelta en capas perispermicas. Además posee dos alas laterales de dos a tres cm de ancho, el ala inferior es más estrecha que el ala superior, se encuentran entre los meses de Junio y Julio (Rojas 2014; Fuentes 1993; Marín y Flores 2007; Alemán et al. 2004).

3.1.4.5 Semillas

La semilla generalmente es única, reniforme, comprimida de 1.5 a 1.8 cm de largo, aromática, con la testa de color amarillo claro, liso, membranoso y delgado. Se encuentra de dos capas donde se encuentra otro tipo de resina.

Los cotiledones son planos y convexos formados a partir del fruto, el tegumento es membranoso y comprimido por el pericarpio y la germinación es hipógea, sin ningún tratamiento pregerminativo, se obtiene el 70% de germinación después de 22 días de siembra. (Rojas 2014; López 2010).

3.1.5. Usos del bálsamo

En sus usos ecológicos, este es un buen árbol de sombra para diferentes cultivos como el cacao y el café. Se ha utilizado para restauración de bosques y se recomienda para recuperación de suelos degradados, además es importante ya que fija nitrógeno en el suelo y a veces se cultiva como ornamental en jardines (Orwa et al. 2009; Hoyos y Almanza 2008, Zamora 2000).

La resina del bálsamo se usa como materia prima en la industria farmacéutica e industrial para la elaboración de perfumes (fijador de lociones), cosméticos, desodorantes, cremas, jabones, repelente de insectos, confitería, gelatinas, helados, cremas y barnices (Fuentes 1980; López y Palacios 2005).

El bálsamo, según Canales (1984) y Cuellar (2011), se volvió un medicamento indispensable en condición de antídoto como curativo contra heridas, infecciones bronquiales, infecciones estomacales, enfermedades cutáneas, catarros, entre otras. Además es ideal para evitar la caída del pelo, para curar hongos de los pies, heridas recientes, enfermedades bronquiales y dolores comunes en el estómago.

En la parte alimenticia se utiliza para dar sabor como chocolate, vainilla y goma de mascar, para elaborar postres, gelatinas y artículos de panadería, saborizantes de comidas, helados, lácteos congelados, en bebidas alcohólicas y no alcohólicas (Montano 2001; López & Palacios 2005).

La madera es utilizada en la carpintería para la elaboración de muebles, vigas, jugueteras, ebanistería, chapas, puertas, tornería, ventanales, pisos, artesanías y construcciones (Andrade et al. 2012; Hoyos y Almanza 2008; Orwa et al. 2009).

El bálsamo producido en El Salvador, se comercializa tanto a nivel nacional como internacional. El balsamero, suele vender a los centros de acopio ubicados en los municipios: San Julián, Chiltiupán, Teotepeque y Santa Tecla y estos suelen pagar diversos precios: el producto con impurezas se vende entre \$2.28 a \$2.85 la libra y libre de impurezas se vende a \$5.00 o \$6.00, esto varía dependiendo de la temporada y la cantidad de Cinameína que posea la resina.

Se estima que en promedio se produce un aproximado de 7,200 a 1,250 libras de resina al año por finca, con un área de quince manzanas. Este producto se exporta a todo el mundo, principalmente a los Estados Unidos, (70% de la oferta exportable) seguido por Europa (Umaña 2008; López y Palacios 2005; Morales y Rivera 1987).

3.1.6. Características Orgánica.

Los extractos etanólicos de las raíces, hojas y corteza, demuestran una actividad inhibidora de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, esto se debe a su alto contenido de aceites esenciales como la Cinameína y el ácido Cinámico, benzoico y los taninos y flavonoides (López & Palacios, 2005). Además contiene alcaloides, glucósidos, saponina, triterpeno, sesquiterpenlactonas y aceites esenciales.

El bálsamo contiene cinameína de 25 –30% de material resinoso y 60 a 65% de aceite esencial (Cinameína). La Cinameína está formada principalmente por Benzoato de bencilo, Cinamato de Bencilo, Cinamato de cinamilo (estiracina); y la resina está compuesta de Peruresinotanol, peruviol en forma de éster, Ácido benzoico, Ácido Cinámico, Vainillina 0.05% , α Nerolidol y β Nerolidol 3-5% y trazas de Cumarinas (Montano 2001; CONACYT 2008).

3.1.7. Reproducción del Bálsamo.

3.1.7.1 Propagación sexual

Los árboles de bálsamo se reproducen por medio de semillas que se propagan mayormente en la regeneración natural. Para la recolección de semillas, la mejor época es durante los meses de noviembre y diciembre; las semillas son dispersadas por el viento, se obtiene aproximadamente 972 semillas en un kilogramo (CONACYT 2008).

El almacenamiento de la semilla en condiciones ambientales es de seis meses a un año. Para poder germinar las semillas, se debe de hacer la escarificación mecánica con tijeras de podar, aplicando un corte longitudinal en la parte inferior del fruto y luego se hace la inmersión en agua por 24 horas, la germinación se produce a los 22 días (CONACYT 2008).

3.1.7.2 Propagación asexual

El bálsamo se puede reproducir asexualmente por medio de estacas, aunque posee una baja capacidad de reproducción por su baja sobrevivencia y por cultivo *In Vitro*, esta última técnica no ha sido plenamente desarrollada por la dificultad de sobrevivencia y su alto porcentaje de contaminación (CONACYT 2008).

3.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto de técnicas que consiste en reproducir numerosos ejemplares a partir del aislamiento de pequeñas partes de tejido, de una planta madre (protoplastos, células, tejidos u órganos) para cultivarlos en un medio controlado asépticamente con un medio químico definido e incubarlos para poder obtener plántulas semejantes de la planta madre, en grandes cantidades, libres de enfermedades y patógenos, en cualquier época del año, (Hoyos y Almanza 2008; Amaya 2012; Mroginski et al. 2010).

Según Mroginski et al (2010) y Salazar (2010), esta técnica es una herramienta muy apropiada en cultivos vegetales para:

- Multiplicar rápidamente y conservar las especies que estén en peligro de extinción.
- Uniformidad del material obtenido y la producción de semillas sintéticas.
- Eliminar enfermedades y virus
- Obtención de plantas transgénicas con características especiales e individuos híbridos.
- Ejecutar estudios de anatomía y fisiología vegetal.
- Germinación de Semillas.
- Posibilita la manipulación de plántulas en grandes cantidades con superficies reducidas.

La micropropagación *In Vitro* se aplica con éxito en especies ornamentales y hortalizas, por otro lado, es poco aplicada para las especies herbáceas y leñosas debido a que son difíciles de micropropagar en cultivo *In Vitro* por su capacidad regenerativa lenta, sus ciclos vegetativos largos y sus procesos morfológicos, fisiológicos y biológicos que han sido poco estudiados (Pierik. 1990; Mroginski et al. 2010; Perea. 1990; Hoyos y Almanza 2008).

Además, los árboles leñosos poseen tejido lignificado, es decir que las distintas células y sus paredes celulares son rígidas, porque impide la penetración de diferentes enzimas destructivas, por tanto hacen resistencia a la propagación *In Vitro*,asimismo resisten a los diferentes ataques de microorganismos (Amaya. 2012).

3.2.1 Técnicas de cultivo *In Vitro*

La multiplicación *In Vitro* se puede ejecutar por tres diferentes maneras: (Aguilar et al. 2010).

1. **Organogénesis directa:** La multiplicación de vegetales por medio de ápices (yemas terminales, axilares y nudos), es el método más utilizado para la micropropagación de plantas leñosas, por su capacidad de ser multiplicada sin acudir a una fase de callo posteriormente. Además, las plantas que se regeneran, son genéticamente estables pero es limitada la cantidad de plántulas que se producen ya que esto depende del número de brotes cultivados (Amaya 2012).
2. **Organogénesis indirecta:** Comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales produciendo callos (Amaya. 2012).
3. **Embrión Somático:** Es un proceso que implica la formación de embriones a partir de células somáticas vegetales (Von Arnold et al., 2002).

3.2.2 Etapas del cultivo *In Vitro*.

Todos los protocolos de micropropagación poseen cinco etapas (Prehn et al. 1999):

1. **Desinfección:** al obtener el explante que se va a cultivar, este debe de tener un pre-tratamiento para evitar diferentes enfermedades del material inicial. Algunos agentes de desinfección son: Tween 20, hipoclorito de sodio (1 al 5%), hipoclorito de calcio (6 al 12 %), cloruro de mercurio (0,1% al 1,5%) o etanol al 70% (Mroginski et al 2010).
2. **Iniciación o establecimiento:** en esta etapa, se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *In Vitro* comience, esto implica que los explantes se convierten con el pretratamiento indicado en el material inicial, libre de contaminación fúngica y bacteriana. Además, en esta fase se estimula el explante para la formación de brotes utilizando reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas (Hernández & Amaya, 2005).

El éxito de esta etapa está determinado por la colecta de tejido vegetal que pueden ser embriones, semillas y yemas axilares. Las características idóneas que deben de tener los explantes son: Edad de la planta donante, capacidad regenerativa alta y que la planta madre éste libre de enfermedades (Hernández & Amaya, 2005).

3. **Multiplicación:** involucra el desarrollo y multiplicación de los tejidos vegetales, dentro del medio de cultivo. Cuando el tejido vegetal no se ha contaminado por hongos o bacterias y se haya adaptado al medio de cultivo a las condiciones del laboratorio, el explante se subcultiva a un nuevo medio con fitohormonas para acelerar el desarrollo de hojas y raíces (Suárez, 2011).

4. **Enraizamiento:** es la ejecución del medio de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento para incrementar la velocidad para el desarrollo de los tejidos vegetales para la formación de raíces, hojas y una planta completa. Algunos factores que ayudan al enraizamiento de los explantes son el tipo y la cantidad de auxinas que se le aplica al medio de cultivo, esto es posible porque modifica la estabilidad celular (Amaya 2012).

5. **Aclimatación:** consiste en aclimatar la planta *In Vitro* en condiciones de invernadero. La aclimatación es una etapa crítica dentro del proceso porque es aquí donde se produce una mayor pérdida de explantes, por tal razón se reduce gradualmente la humedad relativa para mejorar la formación de una cutícula y el cierre estomático y así disminuir la pérdida de agua (Amaya 2012).

3.2.2.1 Desinfección del material vegetal

Las fuentes de contaminantes en el cultivo *In Vitro* son dos: a) microorganismos presentes en la superficie o el interior del explante y b) mala desinfección antes de sembrar el explante en el MS Basal. La detección de los microorganismos ayuda a determinar la fuente de contaminación y así se planifica mejor el procedimiento a utilizar (Mroginski et al. 2010). Para que la contaminación por microorganismos en los cultivos se minimice o se evite es necesario: (Mroginski et al 2010).

- a) Conocer el material vegetal y específicamente conocer los contaminantes posibles.
- b) Preparar la planta madre para tenerla en un lugar adecuado, como un vivero y tratarla con productos químicos para eliminar cualquier tipo de microorganismos.
- c) Incubar los cultivos en cuartos cerrados e higienizados.

Los hongos, bacterias y levaduras que se encuentran en la superficie de los explantes a sembrar es importante eliminarlos antes de sembrarlos en el medio de cultivo porque estos organismos compiten con la plántula, disminuyendo los nutrientes que el explante necesita para su crecimiento y el enraizamiento de la plántula, por tal razón se desinfectan los tejidos vegetales (Amaya 2012).

3.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas. Los reguladores de crecimiento se agrupan en cuatro categorías: Giberelinas, Auxinas, Citocininas y Ácido abscísico (Perea y Navarro 1988).

3.3.1 Giberelinas

Las giberelinas son un tipo de regulador de crecimiento que afecta a una amplia variedad de fenómenos de desarrollo en las plantas, provocan el alargamiento celular, eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la inducción de la producción de la α -amilasa y eliminan la dormancia de las yemas y semillas (Perea y Navarro 1988).

3.3.2 Auxinas

Son compuestos que se sintetiza a partir del aminoácido triptófano y la principal auxina es el ácido 3- indolacético (AIA). El efecto de las auxinas está estrechamente ligado al alargamiento celular, la división celular (citocinesis), inducen la rizogénesis he intervienen en la dominancia apical de las yemas, en el desarrollo del fruto (transformación de las paredes del ovario para formar las paredes del fruto) (Brumel y May1987).

3.3.3 Citocininas

Las citocininas son derivados de la adenina y la purina. El nombre genérico de las citocininas es empleado para las sustancias que pueden estimular la división celular. Estas promueven la división celular pero generalmente inhiben el crecimiento de las raíces y la elongación del tallo, estimulan el alargamiento de las hojas y tienen un papel fundamental en la organogénesis ya que pueden ser inducidas las yemas, callos, hojas, raíces, cotiledones o piezas del tallo. Algunos ejemplos son Zeatina y 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (Schmülling 2004; Hurtado & Merino 1987).

3.3.4 Ácido Abscísico (ABA)

El ABA es un inhibidor de crecimiento y desarrollo, en el cultivo in vitro, especialmente en las plantas leñosas, inhibe la producción de fenoles evitando la oxidación (Perea y Navarro 1988). Es esencial para el desarrollo de embriones somáticos y cigóticos, al manipular sus concentraciones se puede lograr su maduración y en algunas plantas es esencial para su desarrollo (Rodríguez et al. 1995).

3.4 Necrosis.

La necrosis ocurre de manera aguda, por una lesión en una porción importante del tejido. Entre las principales causas que favorecen la necrosis en el cultivo, está la composición del medio de cultivo y cualquier condición que genere caída de ATP.

Esto crea cambios que, histológicamente, están representados por desorganización y lisis del citoplasma con dilatación del retículo endoplásmico y las mitocondrias (Elena G, 2002; Cid et al. 2016).

3.5 Trabajos de Cultivo *In Vitro* de Bálsamo

1. Hoyos N., I., Almanza R., E. 2008. Propagación vegetativa de la especie maderable: Bálsamo de Tolú mediante multiplicación *In Vitro*. Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre. Sincelejo.

Para este estudio se tomaron plantas madres silvestres de las cuales se extrajeron fragmentos nodales para obtener los explantes que fueron sometidos al proceso de desinfección donde se evaluaron diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio NaOCl (del 1 al 4%) a diferentes tiempos de exposición (10 a 20 minutos).

Para la fase de establecimiento se utilizó BAP (Bencilaminopurina) a concentraciones de 0.0, 6.0, 12.0 y 18.0 μM y en la fase de multiplicación se utilizaron las mismas concentraciones de BAP y además se adicionó IBA (Ácido indolbutírico) a concentraciones 0.0, 1.2, 2.4 y 4.8 μM para permitir un mayor crecimiento de las plántulas.

Los resultados obtenidos demostraron que el método de micropropagación más adecuado fue el que utilizó en el proceso de desinfección NaOCl al 3% durante 20 minutos, para la fase de establecimiento BAP al 12 μM y para el proceso de multiplicación las combinaciones del tratamiento de BAP 18 μM e IBA en un rango de 1.2 a 2.4 μM .

2. Indacochea B., Vera M., Parrales J., Castro C., y Ayón F. 2017. Obtención de protocolos de desinfección para la propagación *In Vitro* de tres especies forestales nativas en la zona sur de Manabí. Contribuciones de la UNESUM a la Biotecnología de plantas. Grupo de capacitación e investigación pedagógica. P.142

Se planteó una metodología para el establecimiento *In Vitro* de *Myroxylon balsamum* (bálsamo), *Tabebuia crhysantha* guayacán y *Tabebuia billbergii*, (madero negro), se empleó para el establecimiento, diferentes concentraciones de Povidyn, NaClO, Tween, HgCl₂, los tiempos de exposición fueron 10 y 15 minutos.

Los explantes sanos fueron transferidos a un medio de cultivo con distintos niveles de bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) para su multiplicación *In Vitro*, la cual fue 80%, 82% y 87% de brotes con 2 mg L⁻¹ de BAP, en combinación con 1 mg L⁻¹ de AIB. Los mejores brotes se colocaron en medio de cultivo, con diferentes concentraciones de ANA. Los mejores resultados de los segmentos nodales cultivados *In Vitro* se obtuvo en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y la combinación hormonal 2 mg L⁻¹ BAP y 1 mg L⁻¹ ANA, el mayor porcentaje de sobrevivencia fue de 64%, 66% y 68%, de las especies.

3. Tacoronte M., Vielma M., Mora A., y Valecillos C. 2004. Propagación *In Vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla king*) a partir de yemas axilares. Laboratorio de Cultivos Vegetales *In Vitro*, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Venezuela.

La caoba (*Swietenia macrophylla King*) es una especie forestal muy cotizada por su madera, en el estudio fueron cultivados segmentos nodales en medio MS complementado con diferentes relaciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6- Benciladenina (BA) establecidas por el diseño estadístico Compuesto Central Rotable (CCR), en un rango de 0-3 mg/L para ambas hormonas. La superficie de respuesta resultante muestra un óptimo de alargamiento de yemas laterales en una relación 0,38 mg/L de ANA y 1,94 mg/L de BA. La metodología aplicada permitió obtener plántulas de caoba aclimatadas.

4. Hipótesis

4.1 Hipótesis de investigación

- El porcentaje de sobrevivencia en la etapa de desinfección de yemas axilares, al ser sometidas al 3% de hipoclorito De Sodio (NaOCl) a 10 minutos de agitación es mayor o igual a 75%.
- El establecimiento In Vitro de las yemas axilares de *Myroxylon balsamum*, es mayor o igual al 75%, al ser sometidas a una concentración de 10 mg/L de 6-Bencilaminopurina (BAP).

4.2 Hipótesis nula

- El porcentaje de sobrevivencia en la etapa de desinfección de yemas axilares, al ser sometidas al 4% de hipoclorito Sodio (NaOCl) a 10 minutos de agitación no es igual a 75%.
- El establecimiento In Vitro de las yemas axilares de *Myroxylon balsamum*, no es igual al 75%, al ser sometidas a una concentración de 5 mg/l de 6-Bencilaminopurina (BAP).

4.3 Hipótesis alternativa:

- El porcentaje de sobrevivencia en la etapa de desinfección de yemas axilares, al ser sometidas al 2% de hipoclorito Sodio (NaOCl) a 10 minutos de agitación es mayor o igual a 75%.
- El establecimiento In Vitro de las yemas axilares de *Myroxylon balsamum*, es menor del 75%, al ser sometidas a una concentración de 2 mg/l de 6-Bencilaminopurina (BAP).

5. METODOLOGÍA

5.1 Ubicación geográfica.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Nacional de Agricultura "Roberto Quiñonez" ubicado en el municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad, con coordenadas geográficas 13°48'5.51" de Latitud Norte y 89°23'42.08" de longitud Oeste.

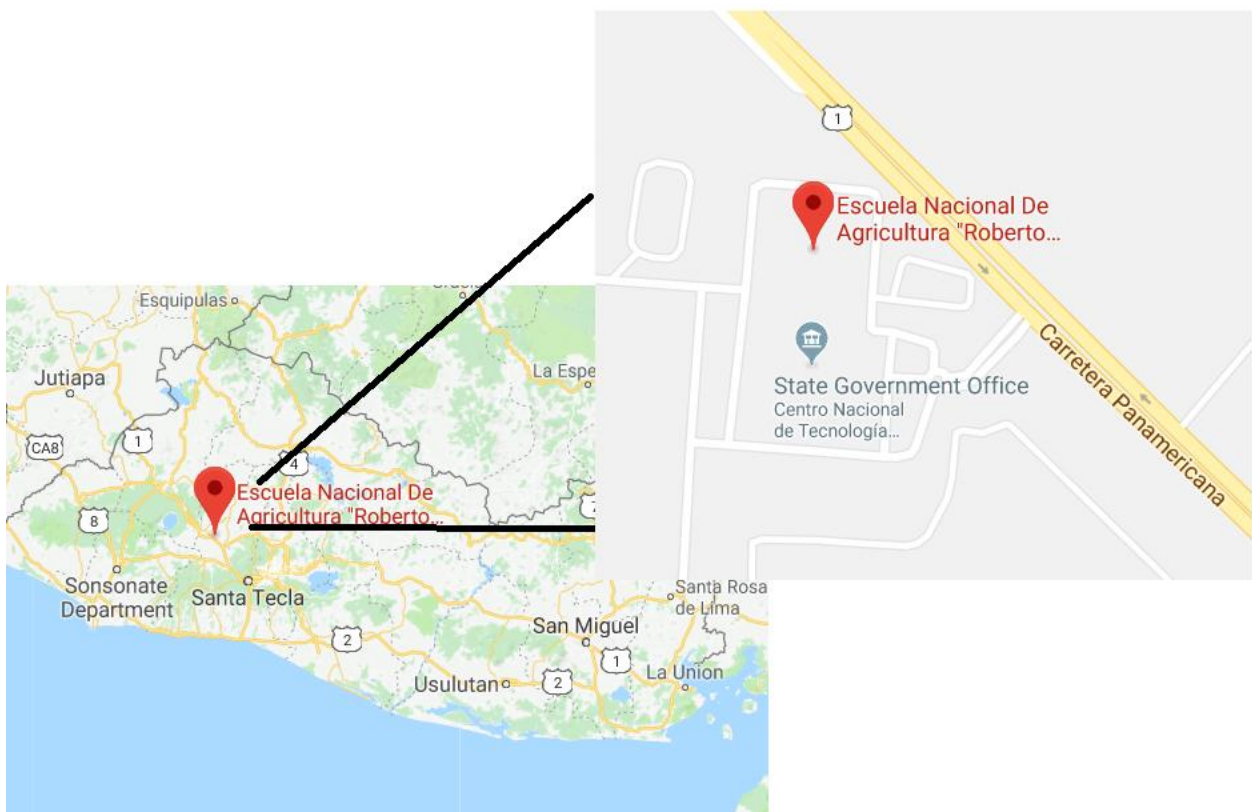
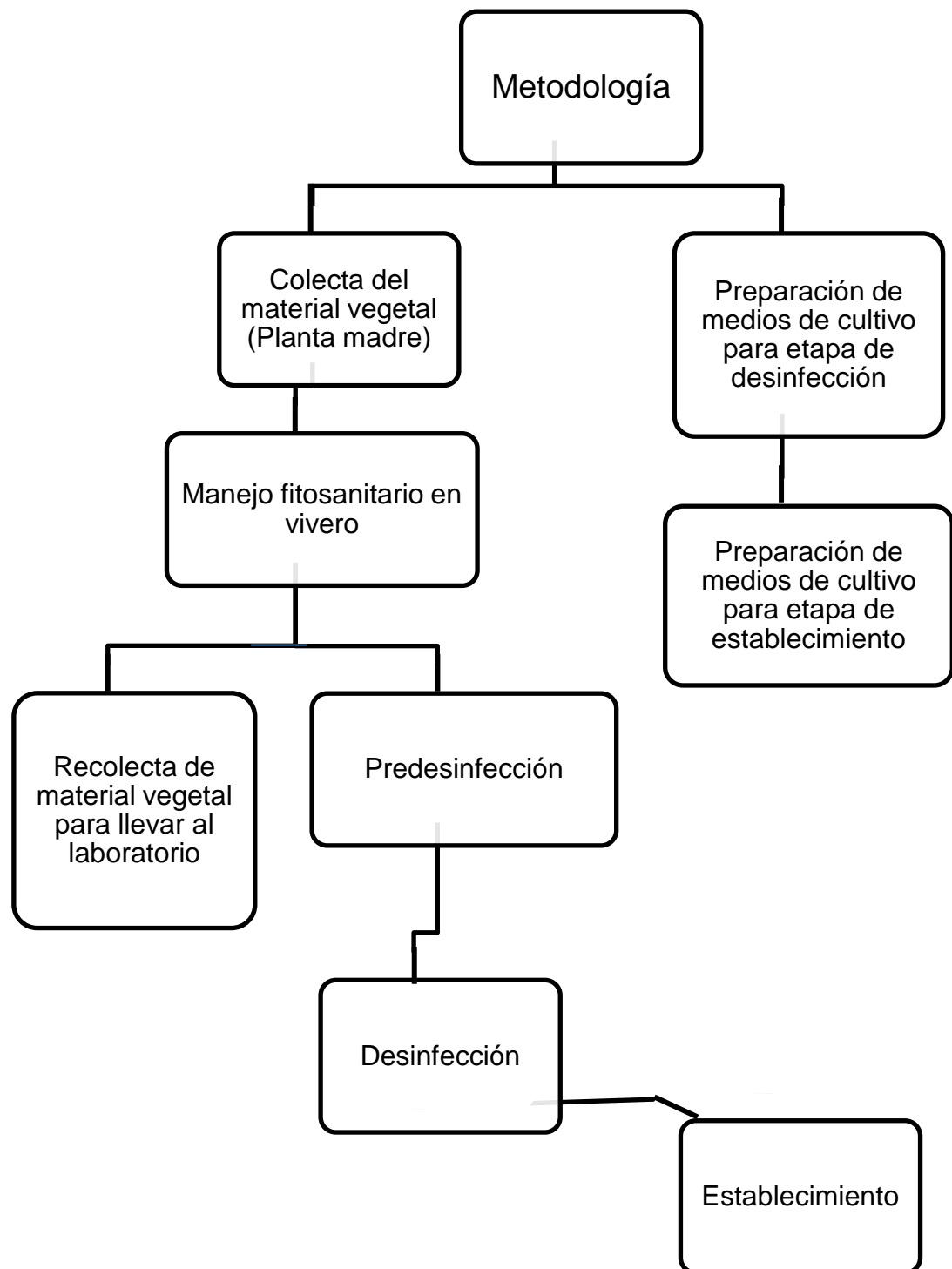


Figura 1.Ubicación del Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Nacional de Agricultura (ENA).

5.2 Diagrama de procedimientos de laboratorio (Elaboración propia)



5.3 Metodología de campo

Las plantas “madre” de bálsamo fueron adquiridas en el vivero San Andrés, ubicado en el km 34, carretera a Santa Ana, en Ciudad Arce del Departamento La Libertad, El Salvador. En total fueron 7 plantas con las siguientes características: sin tallos ni hojas deformes y visiblemente sin ninguna presencia de patógenos.

5.4 Manejo fitosanitario utilizado en el vivero de ENA 2017.

Las plantas madre fueron sometidas a un control fitosanitario previo, en el que se identificó la presencia de hongos *Fusarium sp.* y *Mycogone sp.* (saprofítico), los cuales fueron tratados con Carbendazimen dosis 6ml por galón y Clorotalonil en dosis de dosis 6ml por galón, realizando aspersiones dirigidas cada 8 días y de forma alternas (Anexo 1).

Además se realizaron aspersiones en toda la planta con Agry-Gent Plus WP (bactericida) cada 3 días y Vidate 24 SL (insecticida) dos veces por semana. Este tratamiento se realizó para que las plantas de donde se obtuvieron las yemas axilares no presenten problemas fúngicos al ser sembradas en los medios de cultivos *In Vitro*.

5.5 Desinfección del material vegetativo

5.5.1 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron sales de MS en polvo de Murashige & Skoog (1962), se pesó en una balanza analítica, luego se colocó en un Beaker 200 ml de agua destilada y se agitó sin calor en un agitador magnético para poder disolver las sales.

Después se agregó Azúcar comercial blanca no refinada, Tiamina-HCL, Acido Nicotínico, Piridoxina, Glicina y Myo-inositol y el regulador de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP) (solo para la etapa de establecimiento) en concentraciones de 2, 5 y 10 mg/L (Tabla 2) y se continuó agitando hasta mezclar completamente todos los componentes.

Luego se aforó a la cantidad requerida, se ajustó el pH a 5.7, se agregó Phytigel como agente gelificante y se calentó hasta punto de ebullición; posteriormente se distribuyeron 30 mL de la solución en cada frasco de vidrio tipo Gerber cerrándolo con una tapadera plástica. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave por 20 minutos a 15psi a 121°C.

Tabla 2. Concentración stock de vitaminas para el desarrollo de MS basal (Murashige & Skoog 1962) para el cultivo *In Vitro* de tejidos vegetales (mg/litro) ENA 2017.

Componentes	MS (mg/L)
Glicina	2.00
Tiamina-HCL	0.10
Piridoxina-HCL	0.50
Ácido nicotínico	0.50
Myo-inositol	100.00

5.5.2 Pre-desinfección

Los segmentos nodales colectados de 1cm cada uno se colocaron en un colador sobre un Beaker, bajo chorro directo de agua destilada durante un minuto. Luego se les realizaron 3 enjuagues con agua destilada. Una vez realizado ese enjuague, los segmentos nodales se sumergieron en un litro de solución que contenía 2 ml de detergente comercial, con agitación constante, durante 5 minutos; todo esto con el fin de eliminar cualquier residuo superficial que pudieran tener las muestras de bálsamo. Después de esos 5 minutos, se lavaron con abundante agua destilada esterilizada (Hoyos y Almanza 2008).

5.5.3 Desinfección

Luego de la desinfección previa, se procedió a llevar las yemas axilares a la cámara de flujo laminar, sumergido en alcohol 70% y se mantuvieron en agitación constante durante 3 minutos, luego se sumergieron en agua destilada esterilizada y se mantuvieron en agitación constante durante 1 minuto.

Finalmente, dichos segmentos fueron distribuidos en los diferentes tratamientos de desinfección a evaluar (tabla 3) (Anexo 2) (Hoyos y Almanza 2008).

Tabla3. Tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) en yemas axilares de *M. balsamum*. Escuela Nacional de Agricultura 2017.

Tratamiento de desinfección	Concentración de NaOCl (%)	Tiempo (min)
TD1	0	0
TD2	2	10
TD3	3	10
TD4	4	10

Por cada tratamiento, se tomaron 30 yemas axilares y se sumergieron en las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio con 3 gotas de Tween 20, durante 10 minutos, luego se enjuagaron 4 veces durante 4 minutos cada uno con agua destilada esterilizada, para su posterior siembra en frascos que contenían medio de cultivo MS basal-1962, donde se mantuvieron durante 30 días en el área de incubación y los datos fueron descritos en las tablas de parámetros (Anexo 3).

5.5.2. Parámetros evaluados

5.5.2.1 Etapa de desinfección:

Para evaluar la respuesta de las yemas axilares en los diferentes tratamientos, se realizó la toma de datos a las 24, 48, 72 y 98 horas, considerando los siguientes parámetros:

- Contaminación por hongos: hifas de color blanco o gris, estructura algodonosa, que invade superficialmente en el medio de cultivo.
- Contaminación por bacterias: medio de cultivo con sustancia Liquida/lechosa o turbia de color blanco.
- Porcentaje de sobrevivencia: explante de color verde.

5.5.5 Establecimiento (Iniciación *In Vitro*)

Para cada uno de los tratamientos evaluados, tuvieron en común un medio nutritivo que contenía sales de MS basal, como se describe en apartado 6.4.1. Preparación de medios de cultivo. La Tabla 4 muestra los 4 diferentes tratamientos evaluados del fitoregulador citocinina 6- Bencilaminopurina (6-BAP) adicionado a cada medio nutritivo.

Tabla 4. Composición de tratamiento para la etapa de establecimiento en cultivo *In Vitro* de yemas axilares de bálsamo en la Escuela Nacional de Agricultura 2017.

Tratamiento de establecimiento	Composición
TE1	MS basal + 0.0 mg/L de 6- BAP
TE2	MS basal + 2.0 mg/L de 6- BAP
TE3	MS basal + 5 mg/L de 6- BAP
TE4	MS basal + 10 mg/L de 6- BAP

Para desinfectar las yema axilares para esta etapa se utilizó el TD3 que resultó con menor contaminación estos fueron desinfectados con 3% de hipoclorito de sodio con 10 minutos de agitación. Dentro de la cámara de flujo laminar, las yemas axilares se diseccionaron 30 segmentos nodales de 1 cm de longitud, y se sembraron un segmento nodal en un frasco tipo Gerber con 30mL de medio de cultivo de cada tratamiento. Los frascos fueron colocados en estantes metálicos (cuarto de crecimiento).

Durante 7 días, se mantuvieron en estantes con oscuridad total, luego otros 7 días en luz difusa. A los 15 días de estar en esa área, se situaron en otros estantes metálicos con luz directa; en las siguientes condiciones físicas controladas: 16 horas luz, con 2200 luxes, ocho horas oscuridad, con una temperatura constante de 24°C y una humedad relativa de 80%, estas condiciones físicas se mantuvieron durante 60 días.

5.5.3. Parámetros evaluados

5.5.3.1 Etapa de establecimiento (Iniciación *In Vitro*):

Se tomaron 30 unidades experimentales (frascos con segmentos nodales) por cada tratamiento, haciendo toma de datos cada 24, 48, 72 y 98 horas, los parámetros evaluados fueron:

- Contaminación: presencia de características fúngicas y bacterianas.
- Días a brotación: Germinación de yemas axilares
- Número de yemas axilares por explantes
- Sobrevivencia: explantes vivos.

5.6. Procesamiento de datos

Los resultados que se obtuvieron, se presenta en tablas y gráficos con su respectiva redacción, intercalando los cuadros correspondientes que fundamentan lo que se planteó, ya que esto facilitará una comprensión más rápida por parte del lector. Se analizaron los datos obtenidos con el planteamiento de hipótesis (cola inferior), para poder comparar la hipótesis nula y alternativa.

6. RESULTADOS

6.1 Etapa de Desinfección

6.1.1. Contaminación por hongos.

En la contaminación fúngica (tabla 5), el tratamiento que presentó menor porcentaje de contaminación por hongos es el TD3 con 12 (40%) explantes contaminados, seguido por TD4 con 16 (53.33%) de explantes con hongos y las yemas axilares que presentaron mayor contaminación fueron el TD2 y TD1 con el 21(70%) y 25(83.33%) de yemas axilares contaminadas por hongos (figura 2 y 3).

Tabla 5. Contaminación fúngica en la etapa de desinfección de *M. balsamum*.

Tratamiento de desinfección	Concentración de hipoclorito de sodio	Número de yemas con Hongos	Proporción de yemas contaminados por hongo
TD1	0	25	83.33%
TD2	2	21	70%
TD3	3	12	40%
TD4	4	16	53.33%

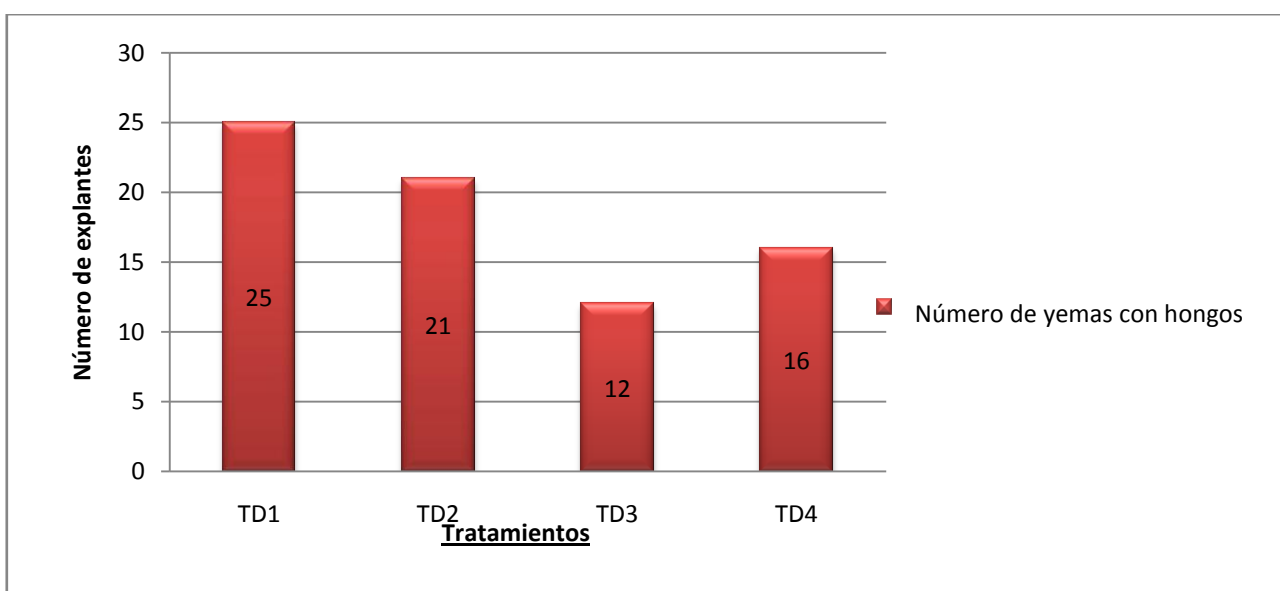


Figura 2. Número de yemas contaminadas ENA.2017.

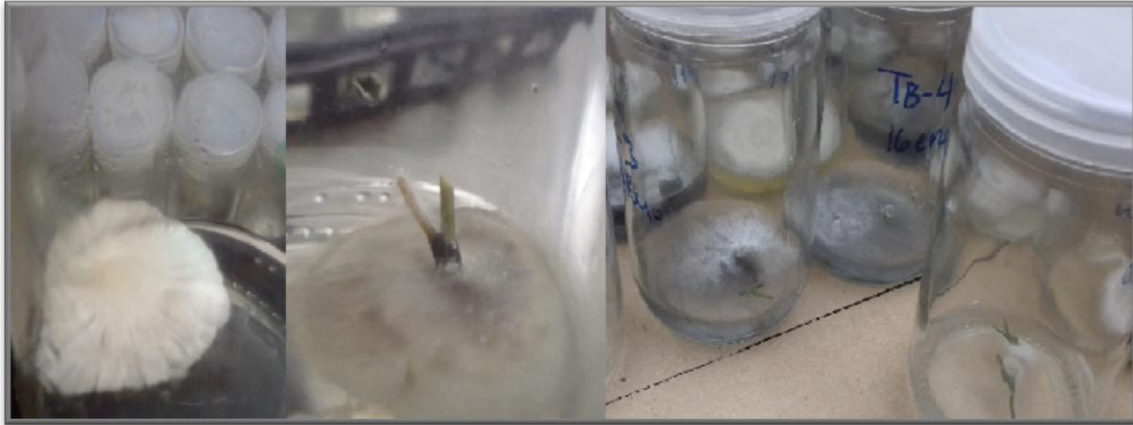


Figura 3. Contaminación fúngica en las yemas axilares de *M. balsamum* ENA. 2017.

6.1.2 Contaminación por bacterias en la etapa de desinfección.

En la tabla 6, se muestra la contaminación de bacterias, en el cual se observa que el tratamiento con menos contaminación fue TD3 con 7(23.3%) de yemas axilares contaminadas, seguido por TD4 con 9(30%) de yemas axilares con bacteria, los tratamientos con mayor contaminación fueron TD2 y TD1 con 16 (53.3%) y 20 (66.6%) de yemas axilares con bacterias (figura 4 y 5) respectivamente.

Tabla 6. Contaminación de bacterias presentes en la etapa de desinfección de *M. balsamum*.

Tratamiento de desinfección.	Concentración de hipoclorito de sodio	Número de yemas con Bacterias	Proporción de yemas contaminados por bacterias
TD1	0	20	66.6%
TD2	2	16	53.3%
TD3	3	9	30%
TD4	4	7	23.3%

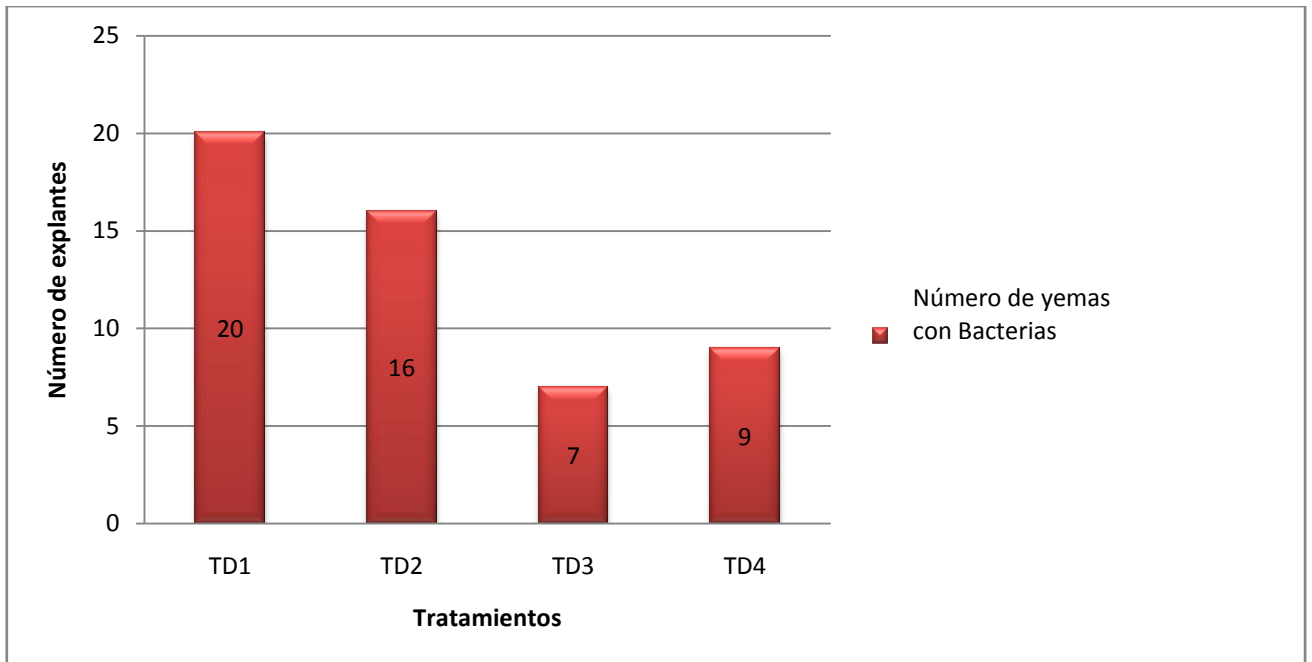


Figura 4. Contaminación de bacterias presentes en la etapa de desinfección ENA 2017.

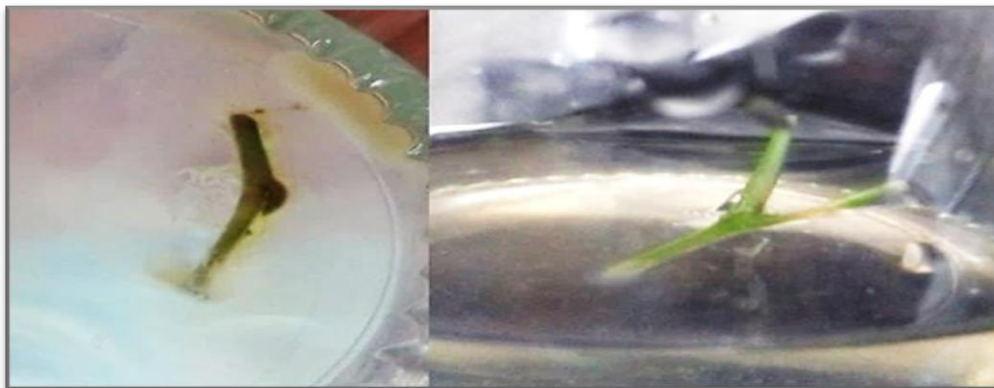


Figura 5. Yemas axilares contaminadas de bacterias ENA 2017.

6.1.3 Explantes Vivos en la etapa de desinfección.

En la tabla 7, Para el caso de los explantes vivos en la etapa de desinfección, se puede observar que en el TD3 y TD4 23 (76.60%) y 19 (63.33%) de yemas axilares sin ninguna contaminación seguido por los tratamientos TD2 y TD1 con 12 (40%) y 0 (0%) de yemas axilares sin hongos y bacterias (figura 6 y 7).

Tabla 7. Yemas axilares "vivas" en la etapa de desinfección.

Tratamiento de desinfección	Concentración de hipoclorito de sodio	Número de yemas sobrevivientes	Proporción de yemas sobrevivientes.
TD1	0	0	0%
TD2	2	12	40%
TD3	3	23	76.60%
TD4	4	19	63.33%

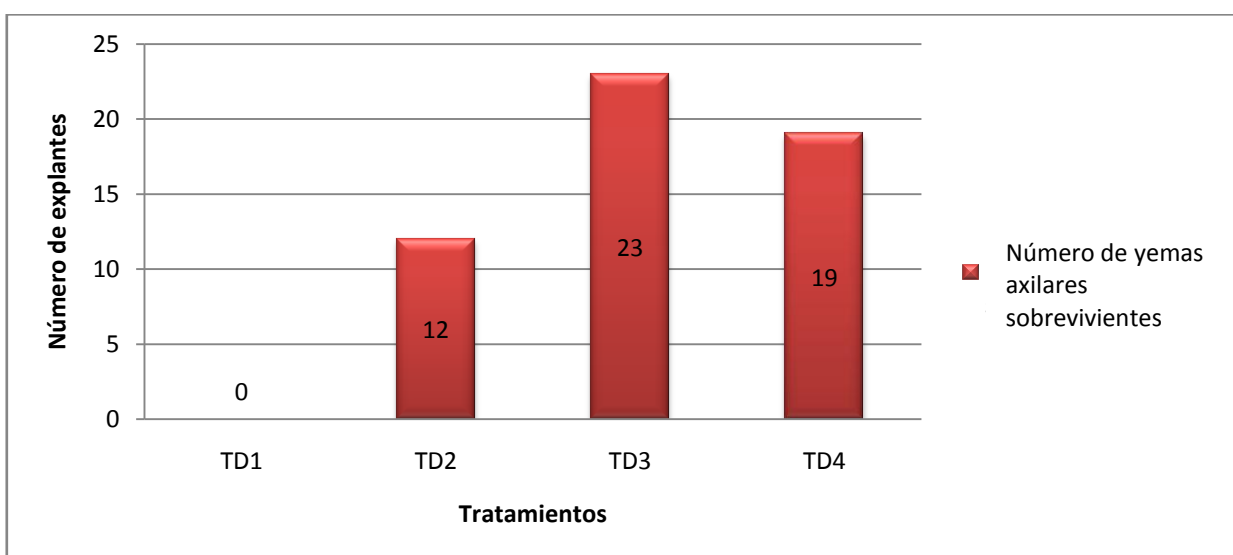


Figura 6. Explantes sobrevivientes de *M. balsamum* ENA.2017.



Figura 7.

Yemas axilares de *M. balsamum* sobrevivientes en la etapa de desinfección ENA 2017.

6.1.4 Necrosis.

En la tabla 8, se observa los tratamientos con mayor cantidad de yemas con necrosis, estos fueron los TD4 y TD3 con 26 (86.6%) y 21 (70%) y el tratamiento con menor cantidad de yemas con necrosis fue TD2 con 14(46%) y en el TD1 no hubo presencia de necrosis 0 (0%) (Figura 8 y 9).

Tabla 8. Necrosis presentes en la etapa de desinfección.

Tratamiento de desinfección	Concentración de hipoclorito de sodio	Número de yemas con necrosis	Proporción de yemas con necrosis.
TD1	0	0	0%
TD2	2	14	46%
TD3	3	21	70%
TD4	4	26	86.6%

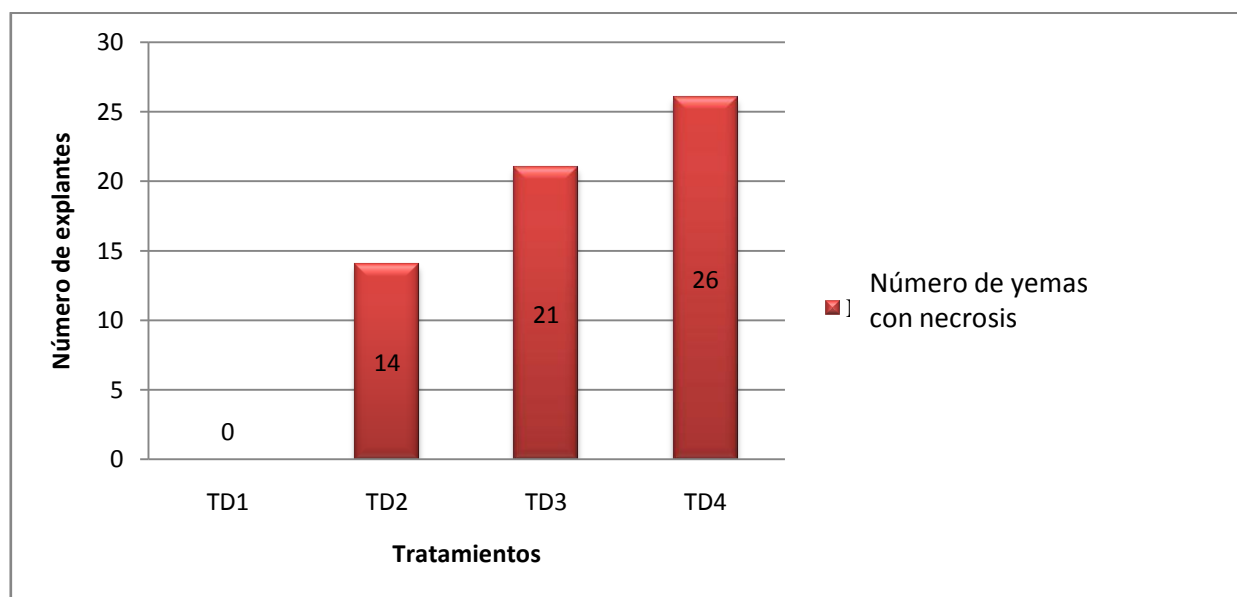


Figura 8. Yemas axilares con necrosis en la etapa de desinfección de *M. balsamum* ENA 2017.

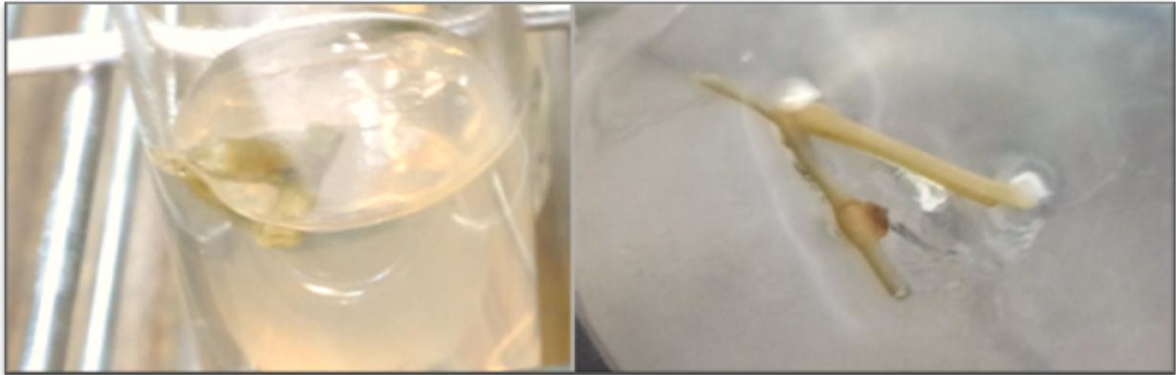


Figura 9. Yemas axilares de *M. balsamum* con necrosis después de 30 días ENA2017.

6.2 Etapa De Establecimiento

6.2.1 Días a brotación

En la tabla 9, se presentan las respuestas de 30 explantes de yemas axilares de bálsamo por cada uno de los tratamientos evaluados, en el TE3 los explantes iniciaron su brotación a los 14, 17, 22 y 30 días; mientras que en el TE4 se obtuvieron dos explantes que iniciaron su brotación a los 17 y 20 días, siguiendo con el TE2 con un explante que brotó a los 17 días. Los resultados mostrados se observan mejor en la figura 10.

Tabla 9. Días a brotación de las yemas axilares en la etapa de establecimiento.

Tratamiento de establecimiento	Número de días de germinación por yema axilar.			
TE1	0	0	0	0
TE2	Yema 1 de TE2 broto a los 17 días	0	0	0
TE3	Yema 1 de TE3. Broto a los 14 días	Yema 2 de TE3. Broto a los 17 días	Yema 3 de TE3. Broto a los 22 días	Yema 4 de TE3. Broto a los 30 días
TE4	Yema 1 de TE4 broto a los 17 días	Yema 2 de TE4 broto a los 20 días	0	0



Figura 10. Brotes de *M. balsamum* en la etapa de establecimiento en el medio de cultivo MS basal + 5mg/L de 6-BAP ENA 2017.

6.2.2. Número de brotes por yemas axilares

En la tabla 10, la cantidad de brotes por yemas axilares se muestra en la figura 11 y 12, muestran que el tratamiento con mayor número de yemas axilares TE3 con cuatro yemas axilares que brotaron; mientras en el TE4 y TE2 se obtuvieron dos y una yema axilar que brotó respectivamente.

Tabla 10. Número de brotes por yemas axilares en la etapa de establecimiento.

Tratamiento en etapa de establecimiento	Cantidad de brotes por yemas axilares			
	TE1	0	0	0
TE2	1	0	0	0
TE3	1	2	1	5
TE4	1	1	0	0

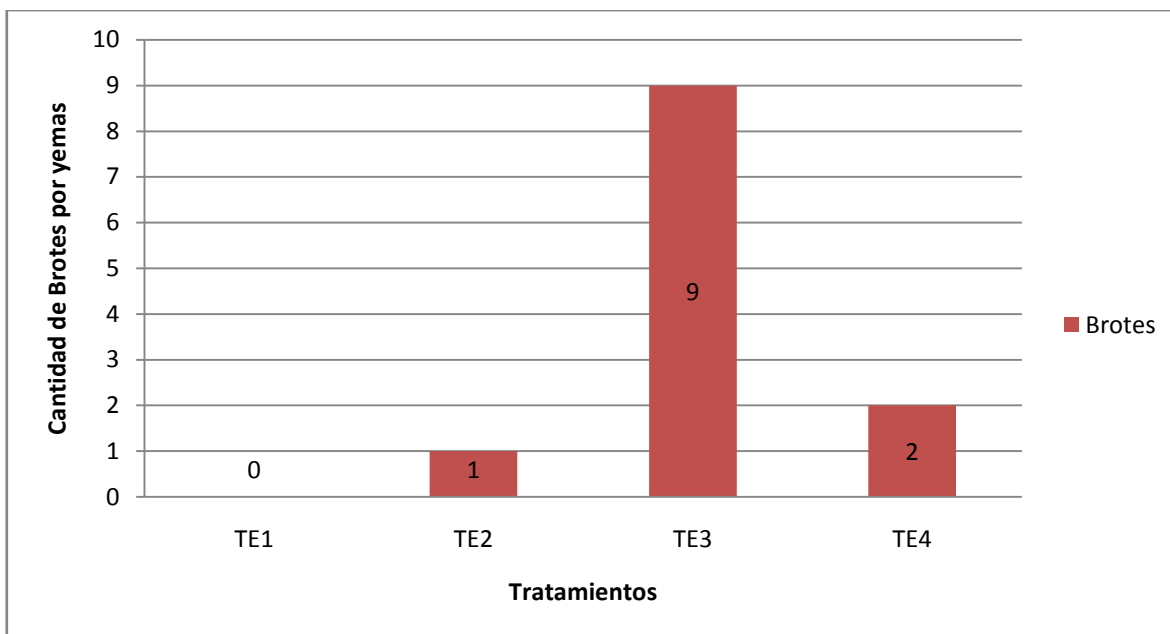


Figura 11. Número de brotes por explantes en la etapa de establecimiento de *M.balsamum* ENA 2017.



Figura12. Primordios foliares de explantes de *M. balsamum* ENA 2017.

6.2.3 Explantes vivos en la etapa de establecimiento.

En la tabla 11, muestra la respuesta de los 30 explantes de segmentos nodales de bálsamo por cada uno de los tratamientos evaluados, se dio mayor cantidad de explantes vivos en los tratamientos TE4 y TE3 con 19 (76.66%) y 23 (76.66%); mientras que en los tratamientos TE1 y TE2 se dio menor sobrevivencia 5 (16.6%) y 12 (40%). Los resultados se describen mejor en las figuras 13 y 14.

Tabla 11. Supervivencia de yemas axilares en la etapa de establecimiento de *M. balsamum*.

Tratamiento de establecimiento	Número de yemas sobrevivientes.	Proporción de yemas axilares sobrevivientes
TE1	5	16.6%
TE2	12	40%
TE3	23	76.66%
TE4	19	63.3%

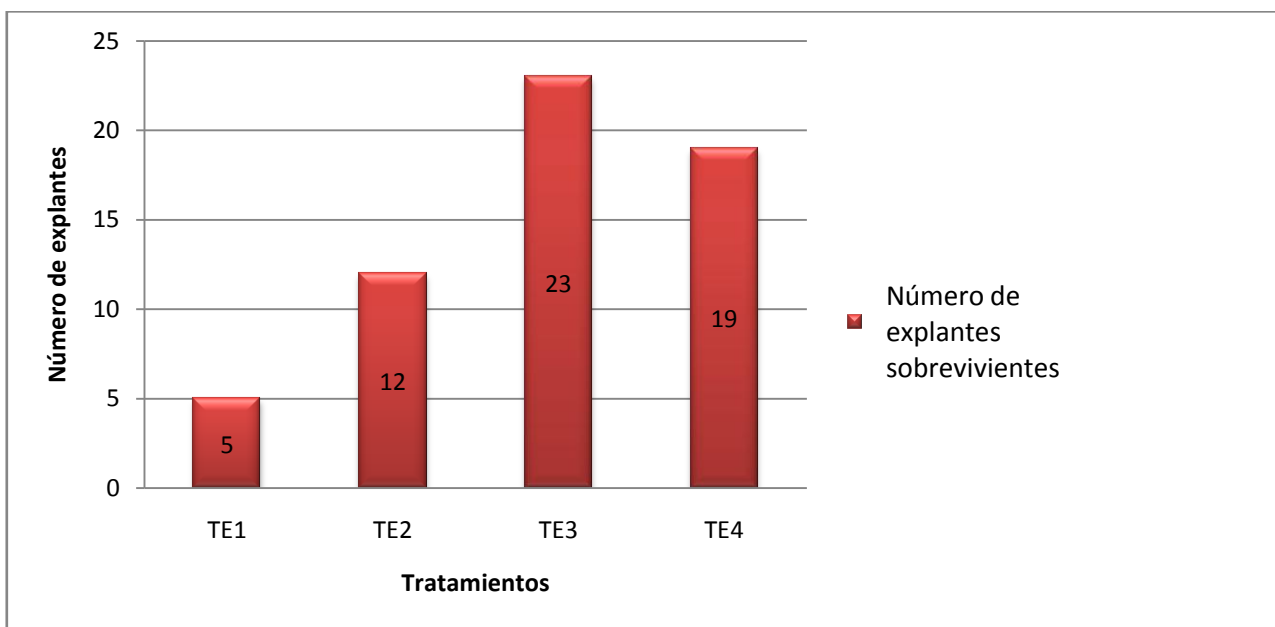


Figura 13. Supervivencia en la etapa de establecimiento de *M. balsamum*ENA 2017.

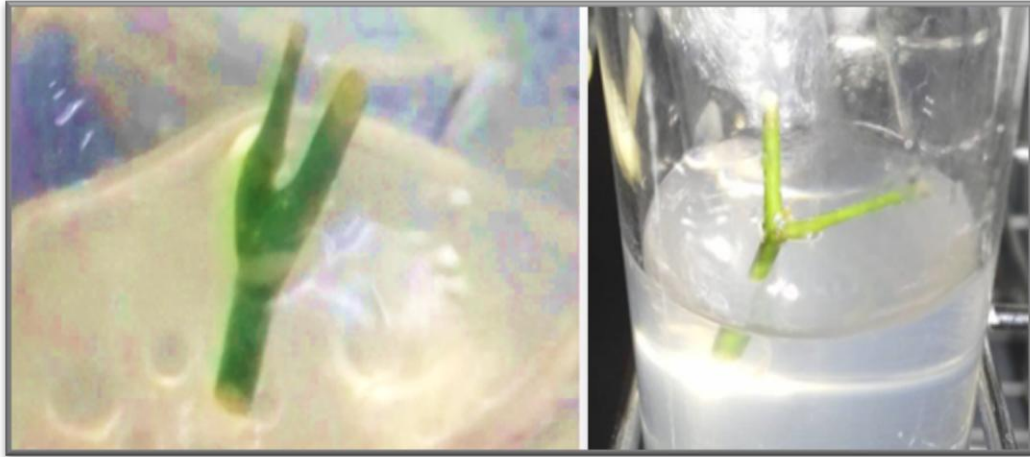


Figura 14. Yemas axilares de *M. balsamum* sobrevivientes ENA 2017

6.2.4 Contaminación por hongos y bacterias en la etapa de establecimiento.

En la tabla 12, muestra la respuesta de los 30 explantes de segmentos nodales de bálsamo por cada uno de los tratamientos evaluados, se dio mayor contaminación en los tratamientos TE4 y TE2, con 23 (76.6%) y 21 (70%) explantes contaminados; mientras que, en TE1 y TE3 se dio una menor contaminación, con 17 (56.6%) y 19 (63.3%) explantes con hongos y bacterias después de 30 días (figuras 15 y 16).

Tabla 12. Contaminación por hongos y bacterias en la etapa de establecimiento de *M. balsamum*.

Tratamiento de establecimiento	Número de yemas contaminadas	Promedio de yemas contaminadas
TE1	17	56.6%
TE2	21	70%
TE3	19	63.3%
TE4	23	76.6%

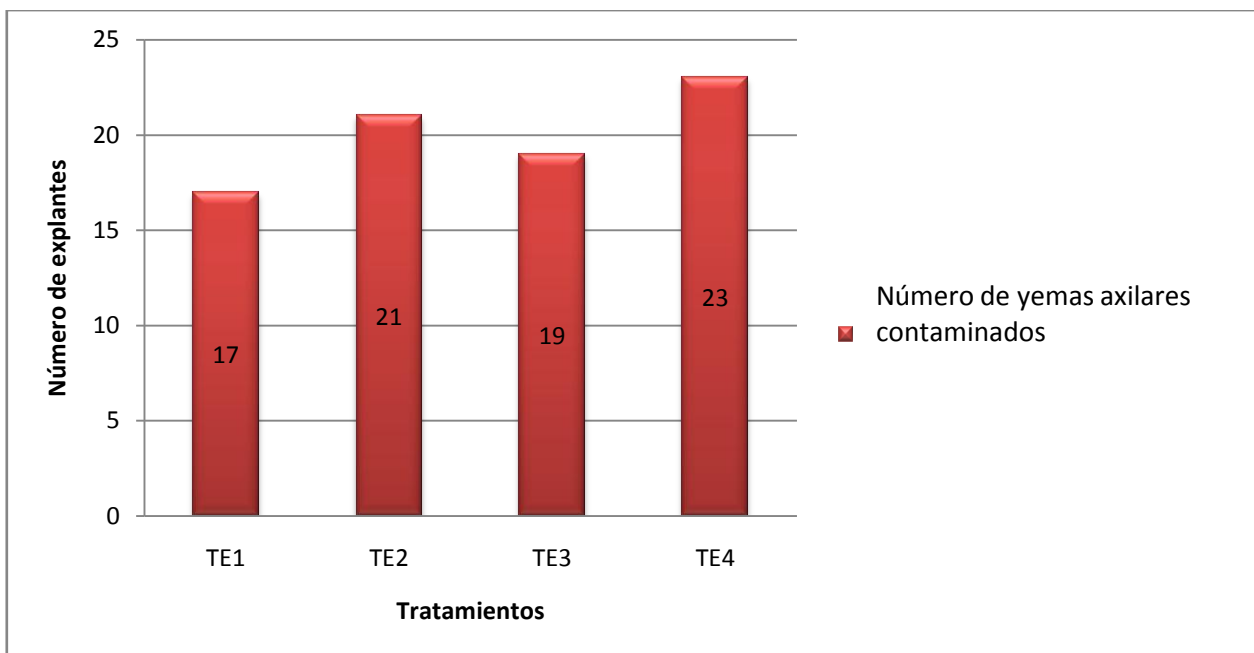


Figura 15. Contaminación en la etapa de establecimiento de balsamo ENA 2017.

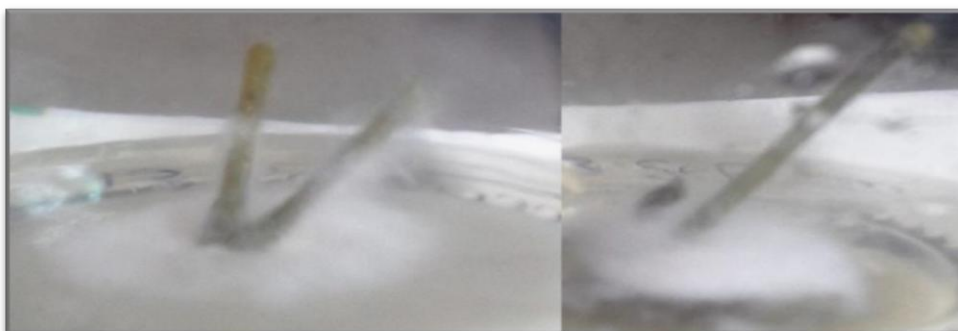


Figura 16. Contaminación de *M. balsamum* ENA 2017.

6.2.5 Necrosis

En la tabla 13 se observa la cantidad de necrosis obtenida por cada tratamiento, se produjo mayor necrosis en los tratamientos TE3 y TE2, con 15 (50%) y 13 (43.3%); mientras que, en TE1 y TE2 se obtuvo menor necrosis, con 11 (36.6%) y 12 (40%) explantes con necrosis (figura 17 y 18).

Tabla 13. Yemas axilares necronizadas en la etapa de establecimiento

Tratamiento de establecimiento	Número de yemas necronizadas	Proporción de yemas con necrosis
TE1	11	36.6
TE2	13	43.3
TE3	15	50
TE4	12	40

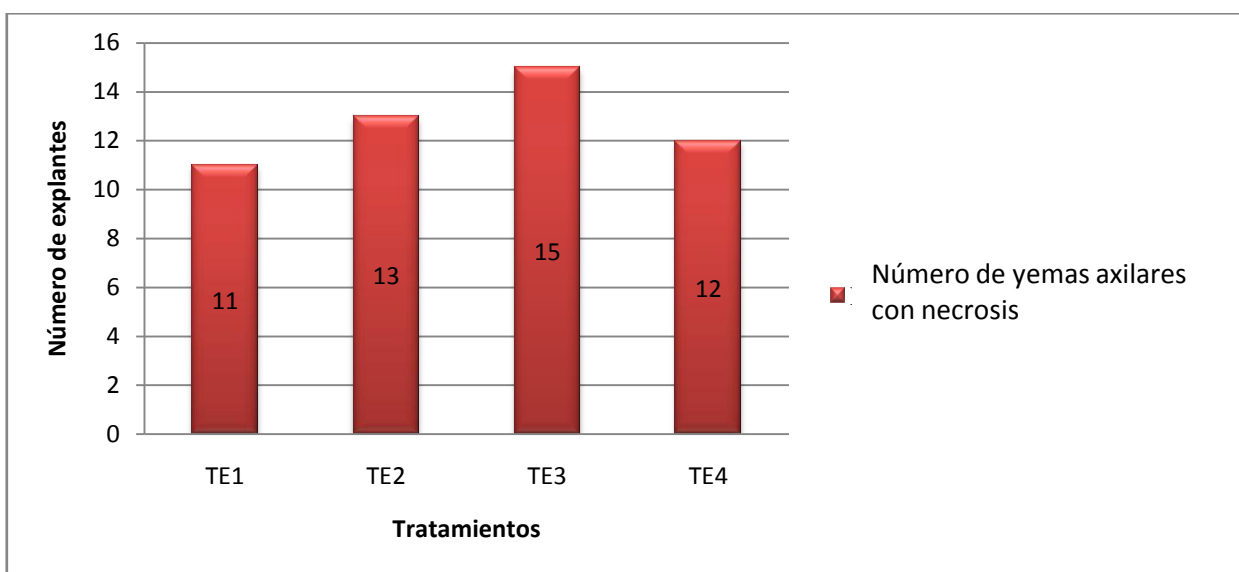


Figura 17. Yemas axilares con necrosis en la etapa de establecimiento. ENA 2017.

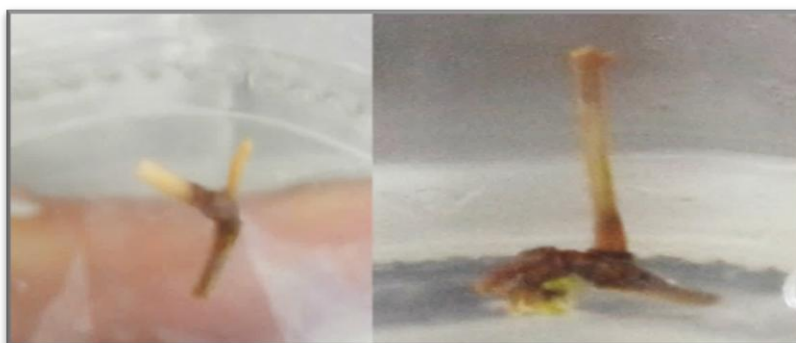


Figura 18. Yemas de *Myroxylon balsamum* con necrosis. ENA 2017

6.3 Planteamiento de hipótesis (cola inferior) para la etapa de desinfección.

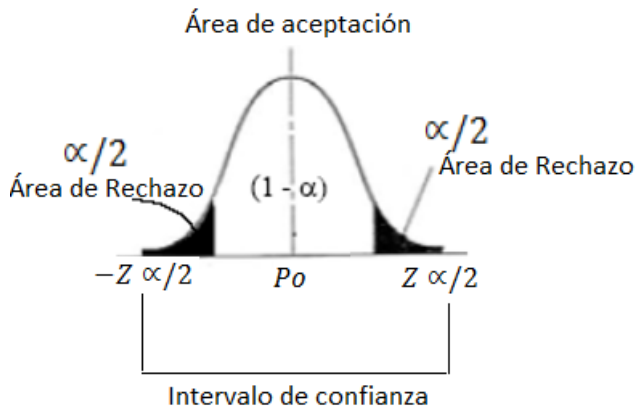
$$H_0: P \geq P_0 \implies H_0: P \geq 75\% \quad H_1: P < P_0 \implies H_1: P < 75\%$$

Regla de Rechazo

Rechazar H_0 si: Valor $P \leq \alpha$

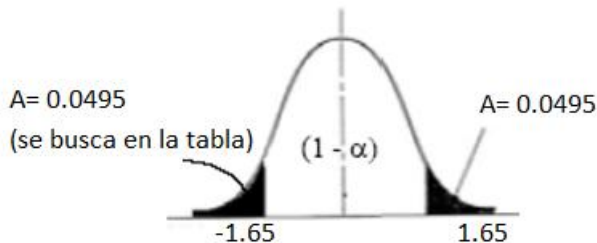
α : Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ o $\alpha = 5\%$, es el tamaño de la región de rechazo o error. Probabilidad de cometer el error tipo 1: Rechazar H_0 siendo verdadera.

1- α : Nivel de Confianza, es el tamaño de la región de aceptación.



Estimación

$$\begin{aligned} Z &= \frac{-P_0}{\sqrt{\frac{P_0(1-P_0)}{n}}} \\ &= \frac{0.63 - 0.75}{\sqrt{\frac{(0.63)(1-0.75)}{30}}} \\ &= -1.65 \end{aligned}$$



Valor $-P < \alpha$

$$0.0495 < 0.05$$

De acuerdo con los resultados de la prueba de hipótesis, tenemos como resultado que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Esto se comprueba que el valor 0.0495 queda afuera del área de aceptación dentro de la campana.

6.4 Protocolo para el establecimiento del cultivo *In Vitro* de Bálsamo (*Myroxylon balsamum*) en El Salvador.

6.4.1 Colecta y manejo fitosanitario del material vegetal en vivero

1. Se adquiere una planta madre de *M. balsamum* joven y sana de aproximadamente dos años (preferiblemente de vivero).
2. Manejo fitosanitario en vivero de la planta madre.
 - a. Realizar aspersiones dirigidas al cuello y raíz con los fungicidas: Carbendazim 50SC en dosis 200 cc/200 litros de agua y Clorotalonil 50SC en dosis de 125cc/100 litros de agua cada 8 días.
 - b. Realizar aspersiones de Agry-Gent Plus (bactericida de amplio espectro), en toda la planta, cada 3 días.
 - c. Realizar aspersiones de Vidate 24 SL (insecticida), en toda la planta, dos veces por semana.
3. Recolectar ramas jóvenes y verdes con 3 segmentos nodales.
4. Envolver las ramas jóvenes en papel húmedo esterilizado.
5. Colocar en un Beaker las ramas envueltas.
6. Guardar en una bolsa plástica el Beaker.
7. Llevar las muestras al laboratorio y empezar con la etapa de pre-desinfección. (Ver apartado 7.3.4)

6.4.2 Preparación de medios de cultivo

6.4.2.1 Medios de cultivo para la etapa de desinfección:

1. Pesar, en una balanza analítica, 1.32 g de sales MS en polvo de Murashige & Skoog (1962).
2. Colocar en un Beaker y agregar aproximadamente 200 mL de agua destilada

3. Disolver las sales, utilizando un agitador magnético.
4. Pesar 9.0 g de Azúcar y agregar a la mezcla, mientras continúa la agitación.
5. Adicionar a la mezcla 30 µL de Tiamina HCl, 150 µL de Acido nicotínico, 150 µL de Piridoxina HCl y 600 µL de Glicina. Y se sigue agitando.
6. Pesar en balanza analítica 30 mg de Myo-inositol y agregar a la mezcla.
7. Se sigue agitando la mezcla, hasta disolver completamente.
8. Pasar la mezcla a una probeta(puede ser una de 500mL) y aforar a 300 mL.
9. Ajustar con soluciónHCl1N o KOH 1N a pH de 5.7.
10. Pesar en balanza analítica 0.6 g de Phytigel, agregar a la mezcla, agitar y calentar en hotplate hasta disolver.
11. Calentar la solución a punto de ebullición, hasta que la solución sea incolora.
12. Distribuir 30 mL del medio en cada frasco de vidrio tipo Gerber y cubrirlo con tapadera de plástico.
13. Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 psi a 121°C.

6.4.3Pre-desinfección

1. Colocar los segmentos nodales obtenidos del vivero en un colador sobre un Beaker, bajo chorro directode agua destilada durante 1 min.
2. Realizar 3 enjuagues con agua destilada.
3. Preparar una solución que contenga 2 mL de detergente comercial y 1 Litro de agua.
3. Sumergir los segmentos nodales en la solución durante 5 minutos en agitación constante.

4. Enjuagar con abundante agua destilada esterilizada hasta eliminar cualquier residuo superficial que pudieran estar presentes en los segmentos nodales.

6.4.4 Desinfección

1. Llevar las yemas axilares obtenidas de la pre-desinfección se llevan a la cámara de flujo laminar.

2. Sumergir las yemas axilares en alcohol 70% durante 3 min en constante agitación.

3. Enjuagar 3 veces con agua destilada esterilizadas con agitación constante durante 1 min por cada enjuague.

4. Sumergir las yemas axilares en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) a una concentración del 3% con 3 gotas de Tween 20 durante 10 min.

5. Enjuagar 4 veces en 4 minutos de agitación cada yema axilar con agua destilada esterilizada.

6. Sembrar en el medio nutritivo Murashige & Skoog (1962).

7. Mantener en área de incubación durante 30 días con una temperatura de 24C°, humedad relativa del 80%.

8. Los primeros 7 días se mantiene en oscuridad total.

9. Los siguientes 7 días se les coloca luz difusa.

10. A partir del día 15 pasarlos frascos con las yemas axilares de bálsamo a una luz directa alternando 16 horas luz a 2200 luxes y 8 horas oscuridad.

6.4.5 Establecimiento.

1. Preparación de medios de cultivo para la etapa de establecimiento.

a. Pesar en una balanza analítica 1.32 g de sales MS en polvo de Murashige & Skoog (1962).

- b. Colocar en un Beaker y agregar aproximadamente 200 mL de agua destilada.
 - c. Disolver las sales, utilizando un agitador magnético.
 - d. Pesar 9.0 g de Azúcar comercial blanca y agregar a la mezcla, mientras continua la agitación.
 - e. Adicionar a la mezcla 30 μ L de Tiamina, 150 μ L de Acido nicotínico, 150 μ L de Piridoxina y 600 μ L de Glicina. Y se sigue agitando.
 - f. Pesar en balanza analítica 30 mg de Myo-inositol y agregar a la mezcla.
 - g. Agregar el regulador de crecimiento de 5mg/L de 6-Bencilaminopurina (6-BAP)
 - h. Se sigue agitando hasta disolver completamente.
 - i. Pasar la mezcla a una probeta (puede ser una de 500mL) y aforar a 300 mL.
 - j. Ajustar con solución HCl 1N o KOH 1N a pH de 5.7.
 - k. Pesar en balanza analítica 0.6 g de Phytigel, agregar a la mezcla, agitar y calentar en hotplate hasta disolver.
 - l. Calentar la solución a punto de ebullición, hasta que la solución sea incolora.
 - m. Distribuir 30 mL del medio en cada frasco de vidrio tipo Gerber, tapar con tapadera de plástico.
 - n. Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 psi a 121°C.
2. Sembrar en el medio nutritivo Murashige & Skoog (1962) con 5mg/L de 6-BAP.
 3. Llevar los frascos con las yemas axilares de bálsamo al área de incubación.

4. Mantener en área de incubación durante 30 días con una temperatura de 24 grados centígrados, una humedad relativa del 80%, luz directa alternando 16 horas luz a 2200 luxes y 8 horas oscuridad.
5. Durante los primeros siete días, se observa y se realiza la toma de datos de las yemas axilares cada 24 horas.
6. Después del día 8 se observa y se toman datos cada 48 horas.
7. A partir del día 15 se observa y se toman datos cada 72 horas.

7.DISCUSIÓN.

7.1 Etapa de desinfección.

La mayor contaminación se observó en los tratamientos TD1 (0% NaOCl)y TD2 (2% NaOCl),en los cuales se obtuvo 83.33% y 70.0% de crecimiento de hongos y un 66.6% y 53.3% de crecimiento bacteriano respectivamente, mientras que en los tratamientos TD3 (3% NaOCl) y TD4 (4% NaOCl) se obtuvo un 40.0% y 53.33%de crecimiento de hongos y un 30% y 23.3%de crecimiento bacteriano respectivamente, posiblemente esto se debió a que a mayor porcentaje de hipoclorito de sodio la contaminación disminuye.

Así también, el tiempo durante el cual se mantuvieron sumergidos los segmentos nodales en la solución de Hipoclorito de sodio, influyó en la efectividad de desinfección, lo que coincide con los resultados de Hoyos y Amaya (2008) (anexo 4), en donde se desinfectó utilizando una baja concentración de hipoclorito de sodio (0% y 2%) y como resultado obtuvieron una mayor contaminación con las de concentraciones mayores.

7.2 Etapa de establecimiento

7.2.1 Necrosis

En relación con la necrosis se obtuvo que, a mayor concentración de hipoclorito de sodio, hay una mayor proporción de yemas axilares con necrosis; lo que concuerda con Indacochea et al (2017), Sotolongo (2003) y Romano et al. (2000) en el uso de hipoclorito de sodio en una alta concentración durante 10 a 20 minutos provoca la necrosis de los tejidos que puede conducir a la muerte del explante.

7.2.2. Contaminación

Con respecto a la contaminación se obtuvo que a mayor concentración de hipoclorito de sodio, hubo menor contaminación de los explantes. Lo que concuerda con Indacochea et al. (2017); Sotolongo (2003) y Romano et al. (2000) en que el uso de hipoclorito de sodio en una alta concentración (5%) durante 10 a 20 minutos reduce la contaminación.

Además, la alta concentración de hipoclorito, inhibe el crecimiento y provoca la muerte del explante como lo reportó Camargo y Pasqual (1999) en su trabajo con explantes del porta-injerto de manzano. En cuanto a los resultados obtenidos y mostrados en la tabla 10, específicamente en el parámetro de número de brotes por yema axilar de bálsamo, las yemas presentaron coloración verde claro, sin ninguna contaminación, por lo que se presume que estaban vivas pero mostraron inhibición en la brotación por la alta concentración de hipoclorito de sodio presente en los tratamientos TE3 y TE4, obteniendo en dichos tratamientos seis explantes con brotación.

7.2.3 Brotación.

En esta investigación se obtuvo mayor cantidad de brotación en el tratamiento TE3 (5 mg/L de BAP) con un promedio de 0.13%, luego el tratamiento TE4 (10mg/L de BAP) con un promedio de 0.10%, seguido por TE2 (2 mg/L de BAP) obteniendo un explante germinado siendo el promedio de 0.03%, los resultados de la germinación por los segmentos nodales fueron muy similares. Una posible causa es que en los estudios de Indacochea et al. (2017) y Schmülling (2004) no se mencionan condiciones ambientales que pueden influir o alterar los resultados obtenidos, mientras tanto en el estudio de Hoyos (et al 2008) posee condiciones de temperatura similar a la de esta investigación siendo de 24°C.

Por otra parte, Hoyos et al. (2008) obtuvo resultados diferentes a los de Indacochea et al (2007) al experimentar con yemas axilares de bálsamo a diferentes concentraciones: nulos (0mg/l); bajas (6mg/L) y altos (6, 12 y 18mg/L) de BAP. La cantidad de brotes fue similar por explantes y establece que la inducción de brotes puede no depender exclusivamente de la presencia de BAP en el medio, sino que puede ser afectado también por la diferencia de condiciones ambientales en las que se mantiene el medio de cultivo.

Al igual que Indacochea et al (2017), a los 30 días de iniciada esta investigación en la sala de incubación, se encontró con un porcentaje de mortalidad considerablemente alto, las yemas axilares de *M. balsamum*, comenzaron poco a poco a ir perdiendo su vigor hasta secarse en su totalidad y morir.

8. CONCLUSIONES

- Se concluye que para una eficiente desinfección de las yemas axilares de *Myroxylon balsamum*, es indispensable utilizar agentes fungicidas y realizar una pre-desinfección utilizando agentes como Tween 20, detergente comercial y realizar la desinfección con hipoclorito de sodio con 3% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos.
- El tratamiento de desinfección (TD3), con 3% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos fue más eficiente para poder desinfectar las yemas axilares, ya que disminuyó el porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en el cultivo *In Vitro*.
- Las concentraciones de 10% y 5% de hipoclorito de sodio disminuyeron considerablemente la contaminación por hongos y bacterias en el medio de cultivo pero aumentaron el porcentaje de necrosis en los explantes del cultivo *In Vitro*.
- En la etapa de establecimiento, la concentración de 5mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) permitió obtener el mayor número de explantes de *M. balsamum* con brotación de yemas axilares.
- Después de los 30 días de haber sido puestas las yemas axilares *In Vitro* en el cuarto de incubación, presentaron un alto porcentaje de mortalidad, perdiendo su vigor lentamente hasta alcanzar la muerte de todo el explante.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar la desinfección de yemas axilares de *Myroxylon balsamum* con otros agentes desinfectantes como cloruro de magnesio y hipoclorito de calcio.
- Evaluar diferentes combinaciones de auxinas y citocininas para la etapa de establecimiento del cultivo *In Vitro* de yemas axilares de *M. balsamum*.
- Estandarizar una metodología para realizar la etapa de multiplicación y aclimatación de plántulas de *M. balsamum* y de esta manera completar el cultivo *In Vitro* de esta especie forestal.
- Se debe realizar más investigaciones con *M. balsamum* ya que el porcentaje de mortalidad en la propagación asexual *In Vitro* utilizando yemas axilares es considerablemente alto, por tanto no se logra obtener vitroplantas para las etapas de multiplicación y aclimatación *Ex Vitro*.

10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, M., Villalobos, V., Salgado, R. 2010. Cultivo *In Vitro* de *Paulownia tomentosa*. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Campo experimental Uruapan, México.
- Alemán J. A., Flores B. A., Lainez J. D. 2004. Hacer una preparación farmacéutica (crema) a partir de oleorresina extraída del árbol de bálsamo de El Salvador al cual se le determinaron los componentes de mayor acción por lectura de cromatografía líquida de alta presión. Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado. El Salvador, San Salvador.
- Alexander, P., Bahret, M., Chaves, J., Courts, G., y D'Alessio, N. 2000. Biología. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. Needham, Massachusetts. USA.
- Amaya J. 2012. Avances de la micropropagación *In Vitro* de plantas leñosas. Especialización en biotecnología agraria universidad nacional abierta y a distancia (UNAD). Bogotá, Colombia.
- Andrade R, Freire G, Rodríguez E. 2012. Bálsamo *Myroxylon spp* Especie de uso múltiple del bosque seco del ecuador. Programa Nacional de Forestaría. Estación Experimental Portoviejo. Ecuador.
- Barba, A. 2001. Micropropagación de plantas. Editorial Trillas. México
- Browning D. 1971. El Salvador, la tierra y el hombre. San Salvador, El Salvador. Dirección de Publicaciones. Ministerio de Educación.
- Brumel. D., May. j. 1987. Rapid cellular responses to auxin and the regulation of the growth. Plant cell and environment. N° 10. P 528-542.

- Camargo JT y Pasqual M. 1999. Efecto de la oscuridad y del seccionamiento de los internos del porta-injerto de manzano, cv. Marubakaido, en la calogénesis *In Vitro* Revista Brasileira de Agrociencia 5: 81-83.
- Canales H. G. 1984. Bálsamo de El Salvador. Ministerio de Educación, Dirección de publicaciones. San Salvador, El Salvador.
- Castillo, A. 2009. Multiplicación *In Vitro* de especies vegetales. Unidad de Biotecnología. Universidad ORT. Uruguay.
- Cid M., Pina D., Capote I., Escolona M., Daquinta M. 2016. Strategies to reduce the apical necrosis *In Vitro* multiplication and rooting of Pistachio. Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Rev. Colomb Biotecnol. Vol. XVIII No. 2 Pg. 97-105. Cuba.
- Contreras Castaneda A. 1979. Estudio económico y social de la producción y comercialización del bálsamo de El Salvador. Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. San Salvador, El Salvador.
- Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT). 2008. Calidad del bálsamo de El Salvador (*Myroxylon balsamum* var. *Pereirae* Royle Harms). Especificaciones. Norma Salvadoreña. Diario Oficial. NSR 71.52.01.07. San Salvador, El Salvador, Centroamérica.
- Cuéllar N. 2011. Extracción de un colorante natural a partir de los desechos de la corteza de *Myroxylon balsamum*. Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Díaz R., Quijano H., Ventura H. 2002. Estudio socioeconómico y agroforestal del bálsamo (*Myroxylon balsamum*) en la cooperativa Chiquileca, Santa Isabel Ishuatán, Sonsonate. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Díaz I., R., Contreras O., A., Medrano M., A., Romero E., M., 2014. Germinación y desarrollo de plántulas de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms en el Departamento de Sucre. Grupo de Investigación Botánica Neotropical. Universidad de Sucre. Revista Colombia Forestal Vol. 17(2) 193-201. Sincelejo, Colombia.

- Elena G, A. 2002. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario. Rev. Arg. Anest, 60,6:391-401
- García M. 1948. Diccionario histórico-enciclopédico de la República de el Salvador. Volume 9. Front Cover. Miguel Ángel García. Tipografía "La Luz,". El Salvador.
- Gómez Domínguez, H., M. Á. Pérez-Farrera, J. A. Espinoza Jiménez & M. I. Marquez Reynoso. 2015. Listado florístico del Parque Nacional Palenque, Chiapas, México.
- Espín, E., Medina, M., Jadán, M., Proaño, K. 2010. Utilización de hongos micorrízicos arbusculares en plántulas de limón (*Citrus aurantifolia*) cultivadas *In Vitro*: Efectos durante la fase de aclimatación. Revista Ciencia. Volumen 13, 1, 87-93.
- Fuentes R. E. 1980. El bálsamo en El Salvador: una especie con potencial económico. Revista forestal Centroamericana.
- García-González, R; Quiroz, K; Carrasco, B; Caligari, P. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. Cien. Inv
- Harms, Anaya L. 2005. Propagación *In Vitro* de *Guadua angustifolia* a partir de microestacas. Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre.
- Hernández, Y., González, M. 2010. Efectos de la contaminación bacteriana y oxidación fenólica en el establecimiento *In Vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales. Volumen 31, N°4. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana. Cuba.
- Hoyos N., I. y Almanza R., E. 2008. Propagación vegetativa de la especie maderable: Bálsamo de Tolú mediante multiplicación *In Vitro*. Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre. Sincelejo.
- Hurtado M., Merino M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México.
- Indacochea B., Gabriel J., Parrales J. 2017. Contribuciones en la UNESUM a la biotecnología vegetal. Grupo COMPAS. Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Jipijapa. Ecuador.

- López J. M. 2010. Guía de plántulas y árboles identificados en La Estación Tropical La Gamba, Sendero Fila. Universidad de Viena. Australia.
- López K. y Palacios J. 2005. Extracción y cuantificación de cinameína en la resina del bálsamo (*Myroxylon balsamun*) producida en seis municipios de la cordillera del bálsamo. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Marin W. A., Flores E. 2007. *Myroxylon balsamum* (L.)Harms. Escuela de biología, Universidad de Costa Rica y Academia Nacional de Ciencias de Costa Rica. Costa Rica.
- MARN. 2015. Acuerdo N° 74 Listado Oficial de especies amenazadas o en peligro de extinción en El Salvador. El Salvador.
- Mathias L., Vierira C., Braz-Filho R., Rodrigues E. 2000. A new pentacyclic Triterpene Isolated from *Myroxylum balsamum*. Setor de Quimica de Productos Naturais LCQUI CCT. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Revista Scielo Vol. 11 No. 2. Brazil.
- Milton S. J., Arnold J., C. 2003. Probabilidad estadística con aplicaciones para ingeniería y ciencias computacionales. Cuarta edición, editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
- Molina J. X., Cabrera J. J. 2013. Evaluación de dos métodos de micropropagación en piña variedad Golden. Departamento de fitotecnia, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Montano M. 2001. Diseño de un proceso de extracción de Cinameína a partir del Bálsamo de El Salvador. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Centro Americana José Simeón Cañas. San Salvador, El Salvador.
- Morales G. y Rivera C. 1987. Diseño de una organización productiva modelo para la exportación del bálsamo de El Salvador. Universidad DR. José Matías Delgado. El Salvador, San Salvador.

- Moreno K. M. 2003. Micropropagación *In Vitro* de loroco a partir de meristemos apicales del brote. Escuela de biología, Facultad de ciencias naturales y matemática, Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador
- Mroginski L., Sansberro P., y Flaschland E. 2010. Establecimiento de cultivos. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio. Argentina.
- Mroginski, E., Rey H., y Mroginski L. 2002. Establecimiento *In Vitro* de Explantes y Regeneración de plantas de *Toonaciliata*.
- Murashige, T. and Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:475-497.
- Orwa C, A Mutua, KindtR ,Jamnadass R, S Anthony. 2009. *Myroxylon balsamum*. AgroforestryDatabase:a tree reference and selection guide.
- Osorio, J. 2005. Estudio para el establecimiento y multiplicación *In Vitro* de *Neoregelia sp.*, de la familia *Bromeliaceae*. Bogotá. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia.
- Perea, M. Y. y Navarro, W. 1988. Técnicas *In Vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. Universidad Nacional, CONICIT. Bogotá, Colombia.
- Perea D. 1990. Biotecnología agrícola mediante la utilización de los sistemas *In Vitro*. Agricultura de las Américas. Bogotá.
- Pérez, J., y Ramos, M. 2012. Establecimiento *In Vitro* de *Abiesguatemalensis* (Pinabete) a partir de embriones cigóticos. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano. Honduras.
- Pierik R. 1990. *In Vitro*. Culture of higher plants. Holland. Kluwer Academic Publisher.
- Prehn, D., Serrano C., Arce- Jhonson, P. 1999. Propagación vegetativa en especies forestales (segunda parte): La vía genética. Chile forestal. Año 24 No. 272
- Rache, Y., y Pacheco, C. 2010. Propagación *In Vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionales* (*Ericaceae*). Acta Botánica Brasilica, volumen 24, No. 4. Universidad

Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de bioplasma, Tunja, Boyacá, Colombia.

- Revehe Z. 2007. Los balsameros de Atiluya, Sonsonate El Salvador. Revista El Salvador Investiga No.5. San Salvador, El Salvador.
- Ríos L. 2013. Enraizamiento de estaquillas de estoraque (*Myroxylon balsamum*) a través de la hormona AIB en cara de sub irrigación en el IIAP- San Martin. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de San Martin-Tarapoto. San Martin, Perú.
- Rivera J. R. 2003. Evaluación de procesos de purificación de resina del Bálsamo del Perú *Myroxylon balsamum* por medio de métodos físicos. Ingeniería Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana. Tegucigalpa, Honduras.
- Rodríguez, D. 2012. Capacidad de enraizamiento en estacas de setos provenientes de tres poblaciones de *Pinus patula*. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. México.
- Rodríguez. C., Perz. J., y Fucks, A. 1995. Mejora de plantas. La Habana, Cuba: P 456.
- Rojas F. y Córdoba G. 2014. *Myroxylon balsamum*. Revista Forestal Mesoamericana Kuru. Volumen 11 No. 27 ISSN: 2215-2504. Costa Rica.
- Román F., Liones R., Sautu A., Deago J., Hall J. 2012. Guía para la propagación de 120 especies de árboles nativos de Panamá y el neotrópico. Environmental Leadership and Training Initiative. Yale School of Forestry & Environmental Studies. ISBN: 978-9962-05-347-7. Estados Unidos de América.
- Romano A, Barros S, Martins M. 2000. Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonias iliquia*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68:35-41.
- Salazar, R. 2010. Historia del cultivo de tejidos vegetales. Cultivo de tejidos vegetales Robinson Salazar Díaz.
- Schmülling T. 2004. CYTOKININ. En Schmülling T., In Encyclopedia of Biological Chemistry. Berlin: Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.


- Somarriba, E., Astorga C., Vásquez N., Cerda R., Orozco L., Quesada F. 2010. Injertos y otras técnicas de propagación del cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- Sotolongo S. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). Revista del Jardín Botánico Nacional 24(1-2).
- Suárez, F. 2011. Micropropagación *In Vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Tacoronte M., Vielma M., Mora A., y Valecillos C. 2004. Propagación *In Vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla king*) a partir de yemas axilares. Laboratorio de Cultivos Vegetales *In Vitro*, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Venezuela.
- Tomaselli I, Cuellar N. 2007. Informe Nacional El Salvador. FAO. El Salvador.
- Tropicos. 2010. *Miroxylon peruiferum*. Missouri botánicoal garden. Estados Unidos.
- Umaña G. 2008. Estudio de mercado. Industria del Bálsamo de El Salvador. Programa de competitividad de PYMES a través de la normalización técnica en Centroamérica, Panamá y República Dominicana. San Salvador, El Salvador
- Vargas, O. (2007) Guía metodológica para la restauración ecológica del bosque altoandino. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Villamizar, E. 2005. Estandarización del protocolo *In Vitro* para el establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y de Rodamonte (*Escalloniomyrtilloides*) en el laboratorio de cultivos de tejidos del Jardín Botánico José Celestino Mutis de Bogotá. Universidad Francisco de Paula Santander. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Cúcuta. Norte de Santander.

Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.

Zamora, V. 2000. *Arboles de la Mosquitia Hondurena*. Serie técnica No. 43. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

11. ANEXOS.

Anexo 1. Manejo Fitosanitario de la planta madre de bálsamo. CENTA 2017.


"Enrique Álvarez Córdova"
LABORATORIO DE PARASITOLOGIA VEGETAL
TEL: 23 97-22 00 EXT. 272

San Andrés, 6 de Febrero de 2017. No. Registro. 0086 F.

IDENTIFICACIÓN:		
Nombre de la propiedad:	Casero:	Cantón: San Andrés.
Municipio: Ciudad Arce.	Dpto.: La Libertad.	Área: 10 plantas.
Cultivo: Bálsamo.	Variedad:	Edad:
Propietario: ESCUELA NACIONAL DE AGRICULTURA "Roberto Quiñones"		
Solicitante: Elmer Antonio Alvarenga.		
Fecha de consulta: 17 - 01 - 17.		
Fecha de envío de recomendación: 06 - 02 - 17.		

TIPO DE ANALISIS: ENTOMOLOGIA FITOPATOLOGIA NEMATOLOGIA

DIAGNOSTICO: En la muestra de bálsamo que presenta síntomas de plantas con la raíz podrida y las hojas con los bordes necróticos, se identificó. Presencia de los hongos: <ul style="list-style-type: none">✓ <i>Fusarium</i> sp.✓ <i>Mycogone</i> sp. (Saprofítico)

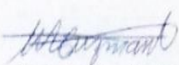
RECOMENDACIONES Y OBSERVACIONES:

- ❖ Realizar inspecciones periódicas, para determinar los problemas de plagas y enfermedades a tiempo.
- ❖ Si las plantas enfermas no son muchas, se recomienda arrancarlas, colocarlas dentro de una bolsa plástica inmediatamente para no contaminar a las demás (enterrarlas o quemarlas).
- ❖ Efectuar una buena fertilización, efectuando un análisis de suelo desde el inicio del cultivo, ya que una planta bien nutrida resiste mejor el ataque de plagas y enfermedades.
- ❖ Tratar de no herir las plantas cuando se realicen labores de limpieza.
- ❖ Desinfectar las herramientas utilizadas sumergiéndolas en lejía, (una parte de lejía en 9 partes de agua), para evitar infecciones posteriores.
- ❖ Es necesario mantener un drenaje adecuado, ya que el agua es un mecanismo de transmisión de enfermedades.
- ❖ Evitar que el agua moje o se acumule en el cuello de las plantas.
- ❖ **1ª Opción** para el control del hongo: *Fusarium sp.*, realizar aspersiones con cualquiera de los siguientes fungicidas:
 - **TIOFANATO METÍLICO 70 WP**, en dosis de 0.35 a 0.7 Kg / Mz.
 - **CARBENDAZIM 50 SC**, en dosis de 200 cc / 200 litros de agua.
 - **SULFATO DE COBRE 24 SC**, en dosis de 125 – 200 cc / 100 litros de agua.
 - **AZOXYSTROBIN 50 WG**, 100 gramos / 200 litros de agua.
- ❖ Alternar con cualquiera de los siguientes fungicidas de contacto:
 - **METIRAM 80 WG**, en dosis de 2 kg / Mz.
 - **CLOROTALONIL 50 SC**, en dosis de 2 Litros / Mz.
 - **IPRODIONE 50 WP**, en dosis de 2 – 3 gramos / litro.
- ❖ Efectuar aspersiones dirigidas al cuello y raíz de la planta, cada 8 días hasta que desaparezcan los síntomas.
- ❖ **Alternar al menos dos de los productos anteriores para evitar la resistencia del patógeno.**
- ❖ **Segunda opción**, para el control del hongo: *Fusarium sp.*, realizar aspersiones con: **CARBENDAZIM 500 más PROPAMOCARB N** en dosis de 1 copa BAYER de cada uno por bomba de 4 galones o bien aplicar los mismos productos en las siguientes presentaciones y dosis: **PROPAMOCARB 72 SL** en dosis de 1.5 cc / litro de agua más **CARBENDAZIM 50 SC** en dosis de 1.00 cc / litro de agua
- ❖ Realizar las aplicaciones dirigidas al cuello y raíz de la planta, cada 8 días hasta que desaparezcan los síntomas.
- ❖ Otras de las opciones para el control del hongo: *Fusarium sp.*, es la aplicación de los siguientes productos:
 - **EXTRACTO DE MIMOSA TENUIFLORA 80 % C** (Por ejemplo: **MIMOTEN**) en dosis de 3.0 cc / 1 litro realizar las aplicaciones dirigidas a la base del tallo sobre mojado 5 cada días.
 - **FUNGICIDA Y BACTERICIDA ORGÁNICO A BASE DE EXTRACTOS VEGETALES** (Por ejemplo: **BELA PLUS**) en dosis de 1.5 litros / 100 litros de agua a razón de 10 a 15 ml a la base del tallo sobre mojado (después del riego) y repetir a los 15 o 20 días después.

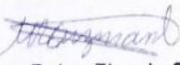
- ❖ Efectuar la aplicación de los productos en horas de la tarde para evitar matar a los insectos polinizadores.
- ❖ Realice rotación de cultivo, es decir, trate de sembrar, en el mismo terreno otro cultivo diferente a solanáceas (Papa, Tomate, Berenjena, Mora, Chile).
- ❖ Mantener posteriormente un plan fitosanitario en el cultivo.

Utilizar equipo protector para la aplicación de productos químicos.

NOTA: ESTE INFORME DE ANALISIS SE BASA EN UNA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, EL PROCESO DE MUESTREO HA SIDO RESPONSABILIDAD DEL INTERESADO Y EL LABORATORIO SE COMPROMETE A ENTREGAR EL RESULTADO EN UN PERIODO MÁXIMO DE UNA SEMANA.


Inga. Reina Flor de Serrano
Jefa Lab. Parasitología Vegetal




Inga. Olga Estela Sandoval
Técnicos Responsables.

Equipo Técnico

Inga. Reina Flor Guzmán de Serrano
Inga. Olga Estela Sandoval
Inga. Alejandra Guadalupe Menjivar
Ing. Carlos Armando Borja
Aux. Andrea Morán

Anexo 2. Materiales utilizados en el método de desinfección del cultivo *In Vitro*.



Los materiales a utilizar fueron: Alcohol 70%, agua destilada y el hipoclorito de sodio correspondiente a cada tratamiento.

Anexo 3. Tabla de evaluación para etapa de desinfección.

Nombre de experimento: PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO DE BÁLSAMO (*Myroxylon balsamum*) EN EL SALVADOR.

Tratamiento: _____

No. De tabla a evaluar. 1 **Fecha:** _____ **Temperatura en °C:** 24 **Hora:** _____ **Humedad relativa:** 30%

Tabla #14. Tratamiento de la fase de desinfección.

Repetición	% de explantes con Hongos	% de explantes con Bacterias	% de explantes con Necrosis	% de explantes sobrevivientes
T1R1				
T1R2				
T1R3				
T1R4				
T1R5				
T1R6				
T1R7				
T1R8				
T1R9				
T1R10				
T1R11				
T1R12				
T1R13				
T1R14				
T1R15				
T1R16				
T1R17				
T1R18				
T1R19				
T1R20				

**T: Tratamiento *R: Repetición*

Nombre de experimento: PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO DE BÁLSAMO (*Myroxylon balsamum*) EN EL SALVADOR.

Tratamiento: _____

No. De tabla a evaluar. Fecha: _____ **Temperatura en °C:** 24 **Hora:**

 Humedad relativa: 30% **Fotoperiodo:** 16 horas luz, ocho horas oscuridad

Tabla #17. Tratamiento de la fase de establecimiento.

Repetición	Fecha a brotación	Numero de primordios	Necrosis	Fecha de contaminación
T1R1				
T1R2				
T1R3				
T1R4				
T1R5				
T1R6				
T1R7				
T1R8				
T1R9				
T1R10				
T1R11				
T1R12				
T1R13				
T1R14				
T1R15				
T1R16				
T1R17				
T1R18				
T1R19				
T1R20				

**T: Tratamiento *R: Repetición*

Anexo 4.Resultados en la etapa de desinfección de Hoyos et al. (2008).

Tratamientos	[]%NaOCl	Tiempo min	% Cont. Hongos	% Cont. Bacteria	% Expl. Necrozados
M0	0	0	84.6	15.4	0
M1	1	10	65.2	34.8	0
M2	1	20	70.4	29.6	0
M3	2	10	54.7	22.6	22.7
M4	2	20	44.6	11.4	44.0
M5	3	10	50.1	0	49.9
M6	3	20	47.5	0	0
M7	4	10	35.2	0	42.4
M8	4	20	12.3	18.5	69.2