

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO PARA ESPECIES FORESTALES NATIVAS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN EN ECUADOR

Blanca Indacochea*, Johann Parrales*, Arturo Hernández*, Carlos Castro*,
Máximo Vera*, Azucena Zhindón*, Julio Gabriel^{1/**}

Palabras clave: Propagación; *Myroxylon balsamum*; *Tabebuia crhysantha*; *Tabebuia billbergii*; vitroplantas.

Keywords: Propagation; *Myroxylon balsamum*; *Tabebuia crhysantha*; *Tabebuia billbergii*; vitroplants.

Recibido: 31/05/17

Aceptado: 30/08/17

RESUMEN

Las especies nativas *Myroxylon balsamum* (bálsamo), *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii* (madero negro), son especies forestales endémicas del bosque seco de la costa del Ecuador y Perú. Los objetivos de la investigación fueron: i) desarrollar un protocolo para establecer, multiplicar plantas micropropagadas en condiciones in vitro para el establecimiento de cultivos de especies nativas amenazadas en la zona sur de Manabí y ii) definir los medios de cultivos y protocolos de desinfección más adecuados para la reproducción in vitro de las especies nativas amenazadas, empleando para el establecimiento diferentes concentraciones de Povidyn®, NaClO + Tween + HgCl₂ y tiempos de exposición. De acuerdo con los resultados en la fase de establecimiento in vitro de explantes de *M. balsamum*, *T. crhysantha* y *T. billbergii*, se demostró que la aplicación de Povidyn® por 20 minutos + 15% NaClO + 2 gotas Tween por 5 minutos + 0,5% HgCl₂ por 5 minutos, permitió reducir significativamente la contaminación de los explantes por microorganismos, alcanzando un 90%, 87% y 88% de explantes vivos respectivamente, libres de contaminación por hongos y

ABSTRACT

Evaluation of in vitro culture media for native forest species in danger of extinction in Ecuador. The native species *Myroxylon balsamum* (balsam), *Tabebuia crhysantha* (guayacán) and *Tabebuia billbergii* (blackwood), are endemic forest species of the dry forest of the coast of Ecuador and Peru. The objectives of the research were: i) to develop a protocol for establishing, multiplying micropropagated plants in vitro conditions for the establishment of endangered native species in southern Manabi, and ii) defining the means of cultivation and disinfection protocols suitable for in vitro reproduction of threatened native species, using different concentrations of Povidyn®, NaClO + Tween + HgCl₂ and exposure times for the establishment. According to the results in the in vitro establishment phase of explants of *M. balsamum*, *T. crhysantha* and *T. billbergii*, it was demonstrated that the application of Povidyn® for 20 minutes + 15% NaClO + 2 drops Tween for 5 minutes + 0.5% HgCl₂ for 5 minutes, significantly reduces the contamination of the explants by microorganisms, reaching 90%, 87% and 88% respectively of live explants, free from

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: j.gabriel@proinpa.org

* Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Jipijapa, Manabí, Ecuador.

** ATENEO/PROMETEO (SENECYT), Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Jipijapa, Manabí, Ecuador.

bacterias a los 30 días de evaluación. En la fase de multiplicación in vitro, el medio MS suplementado con 2 mg.l⁻¹ BAP + 1 mg.l⁻¹ ANA, permitió generar el 80%, 82% y 87 de brotes sanos de *M. balsamum*, *T. crhysantha* y *T. billbergii* respectivamente. El enraizamiento de brotes de las 3 especies en dosis combinadas de BAP/AIB y BAP/ANA, no presentó efecto alguno. La producción in vitro de material vegetal seleccionado de *M. balsamum*, *T. crhysantha* y *T. billbergii*, confirma la utilidad de la micropropagación respecto del uso de técnicas convencionales.

contamination by fungi and bacteria at 30 days of evaluation. In the in vitro multiplication phase, the MS medium supplemented with 2 mg.l⁻¹ BAP + 1 mg.l⁻¹ ANA, allowed to generate 80%, 82% and 87 of healthy shoots in *M. balsamum*, *T. crhysantha* and *T. billbergii* respectively. The rooting of outbreaks of the three species in combined doses of BAP / AIB and BAP / ANA, had no effect. In vitro production of plant material selected from *M. balsamum*, *T. crhysantha* and *T. billbergii*, confirms the usefulness of micropropagation over the use of conventional techniques.

INTRODUCCIÓN

La zona sur de Manabí, Ecuador tiene una gran variedad de especies maderables, cuenta aún con bosques primarios, zonas de reserva y a pesar de eso el hombre no ha respetado la naturaleza, ya que ha deforestado en forma indiscriminada los bosques para hacer uso de este recurso.

La especie *Tabebuia chrysantha* es un árbol originario de la zona intertropical de América. Es común en toda la geografía ecuatoriana en el rango altitudinal de 200 a 1200 msnm, crece preferiblemente en regiones cálidas. En Loja, Ecuador, cantón Zapotillo, parroquias Mangahurco, Bolaspamba y Cazaderos, está el bosque de Guayacán más vistoso, debido a que alberga 40.000 hectáreas de la especie. El Guayacán es un árbol de 12 a 15 metros de altura, de tronco fuerte, compacto, recto, cilíndrico y de aproximadamente 60 centímetros de diámetro. Es considerado una de las maderas más duras y resistentes del continente americano; su corteza es de color marrón, negruzco y escamoso; su sistema radicular es grande y profundo; y sus hojas son grandes con 5 folíolos, de flores amarillas (Ministerio de Turismo 2014).

La especie *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum) Standley conocida también como *Tecoma billbergii* Bureau & Schumann y

Tabebuia ecuadorensis Standley, de la familia Bignoniaceae y especies del género reportadas, ya que Ecuador tiene una distribución geográfica, endémica dentro del bosque seco de la costa del Ecuador y Perú, en altitudes de 0 a 50 msnm. También se encuentra en el norte de Venezuela, en zonas adyacentes en Colombia y en el sur oriente de Ecuador. En Ecuador crece en Manabí, Guayas y Loja en bosques secos pluviestacionales. Se caracteriza por ser un árbol caducifolio de 12-14 m de altura y 20-25 cm de DAP, con fuste cilíndrico. Presenta corteza pardo oscuro, marcadamente fisurada con ramas de color café-claro, pubescente y hojas compuestas, opuestas, decusadas, digitadas (palmadas), de 3-5 folíolos, ovados angostos que miden hasta 10 cm de longitud y 5 cm de ancho. El folíolo terminal es más grande que los laterales, ligeramente pubescentes en el haz, borde entero, de ápice agudo a acuminado. Tiene flores con cáliz campanulado, pubescente, corola tubular amarillo limón con estrías pardas o rojas en la garganta, de 6-8 cm de largo, dispuestas en una inflorescencia racimosa terminal de 6-8 flores. Sus frutos son una cápsula linear-oblonga de hasta 17-25 cm de longitud por 8-10 mm de ancho, con pelos diminutos dispersos, café-oscuro cuando se secan; sus semillas son delgadas y tienen alas transparentes membranosas

(Ministerio de Agricultura del Perú 2002). *T. billbergii* es una especie representativa del bosque estacionalmente seco (BES), un ecosistema muy frágil que se extiende desde la península de Santa Elena, en el Sur del Ecuador, hasta el noroeste del Perú (Brack y Mendiola 2004).

La especie *Myroxylon balsamum*, es un árbol originario de América Tropical, se encuentra distribuido en forma natural en América del sur; su presencia se ha registrado en Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay, Perú, Venezuela, Guyana y el noroeste de Argentina. En el Ecuador se encuentra en las provincias de Esmeraldas, sector de San Mateo a 45 msnm; Manabí (Limongi 2012). En Ecuador es una de las especies maderables nativas amenazadas ante la acelerada deforestación que se registra en la ecoregión del bosque seco del Litoral ecuatoriano.

Una de las estrategias para superar las dificultades de propagación y evitar la extinción de especies valiosas, es el cultivo in vitro de tejido vegetal (Delgado *et al.* 2008). El cultivo in vitro de tejidos vegetales es una técnica que permite la propagación clonal de especies de propagación vegetativa o de variedades que se pretenden someter a protocolos de transformación genética (Martínez 2014). La propagación in vitro incrementa de forma rápida el número de individuos, esta etapa es importante en la producción de plántulas a nivel industrial, ya que permite el establecimiento de un banco de germoplasma con fines de rescate (Uribe *et al.* 2008). Además, permite obtener plantas libres de enfermedades, en algunas ocasiones reduce el tiempo de propagación (Rebolledo *et al.* 2006). Debido a las dificultades de propagación sexual de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán), *Tabebuia billbergii* (madero negro) y a la escasa información disponible de propagación in vitro (Valverde *et al.* 1998, Collado *et al.* 2004, Pérez *et al.* 2012), es que la presente investigación tuvo como objetivos: *i*) desarrollar un protocolo para establecer y multiplicar plantas micropropagadas en condiciones in vitro para el establecimiento de cultivos de especies nativas amenazadas en

la zona sur de Manabí y *ii*) definir los medios de cultivos y protocolos de desinfección más adecuados para la reproducción in vitro de las especies nativas amenazadas que facilite el establecimiento y multiplicación de plantas de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, mediante la aplicación de técnicas de cultivo in vitro con fines de recuperación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Ecuador.

Material vegetal y preparación de los explantes

Se emplearon segmentos nodales de plantas de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii* de 3 meses, los cuales se mantuvieron en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología vegetal. Las plantas fueron fumigadas 2 veces por semana con mezcla de Agrimicin y Benlate a una concentración de 1 g.l⁻¹ (Indacochea 2013), para disminuir la contaminación de los segmentos nodales en el establecimiento in vitro (Rebolledo *et al.* 2006, Flores *et al.* 2009).

Medios de cultivo

Se empleó el medio de cultivo MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) y Uribe *et al.* (2008) y se suplementó con bacto agar (Becton, Dickinson and Company) (7 g.l⁻¹) sacarosa (30 g.l⁻¹), 20 mg.l⁻¹ de gentamicina, Macronutrientes (25 ml.l⁻¹), Micronutrientes (10 ml.l⁻¹), Cloruro de Calcio (10 ml.l⁻¹), Yoduro de Potasio (10 ml.l⁻¹), Sulfato de Hierro (10 ml.l⁻¹), Vitamina Gambort (10 ml.l⁻¹) y Cisteína (10 ml.l⁻¹); el PH ajustado a 5,7 con NaOH a una concentración 0,1 N. El medio fue químicamente esterilizado con vitrofural al 0,118 g.l⁻¹ en la cámara de flujo laminar.

Establecimiento aséptico del cultivo

Los explantes recolectados de 3 cm de longitud fueron colocados en una solución de ácido ascórbico 150 mg.l⁻¹ y lavados con agua destilada (2 a 3 veces), para luego ser sumergidos en agua destilada por 10 minutos para disminuir el contenido endógeno de fenoles. Pasado este periodo, los explantes se sumergieron en una solución de bicloruro de mercurio a concentración de 0,25% más 2 gotas de Tween 80 durante 5 minutos, utilizando la zaranda orbital Vwr, modelo: Incubating Orbital Shaker Serie: 100928002 y luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. En la cabina de flujo laminar Labconco, modelo: 3450001, serie: 1008293010, se procedió según tratamientos: (T1) 1% Povidyn® por 5 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min + 0,5% HgCl₂ por 5 min, (T2) 1% de Povidyn® por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0,5% HgCl₂ por 5 min, (T3) 10% de Povidyn® por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0,5% HgCl₂ por 5 min (T4) 10% de Povidyn® por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl₂ por 5 min, (T5) 1% Povidyn® por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl₂ por 5 min y (T6) 1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5

min +0,5% HgCl₂ por 5 min, con 3 enjuagues de agua destilada estéril. Los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo de 2,5 x15 cm con 10 ml de medio de cultivo y cultivados a 25°C ± 1°C durante 30 días.

Fase de multiplicación

Los explantes establecidos en la etapa anterior, libres de agentes contaminantes de entre 2 cm de longitud, fueron transferidos a un medio de cultivo MS de multiplicación, con bencilaminopurina (BAP) (1,5; 2,5 y 3 mg.l⁻¹) y ácido indolbutírico (AIB) (0,5 y 1 mg.l⁻¹), se siguió el método descrito por Gupta *et al.* (1980) y Carranza-Patiño *et al.* (2012). Se efectuaron 3 siembras a intervalos constantes de 30 días.

Fase de enraizamiento

Fueron seleccionados brotes de 3 cm de longitud de la fase de multiplicación, se transfirieron a medio de cultivo de enraizamiento, con AIB en concentraciones de 1; 1,5; 2 y 2,5 mg.l⁻¹. Los explantes fueron evaluados a los 30 días de su establecimiento. En el Cuadro 1, se muestran los tratamientos y las variables evaluadas en las distintas fases de la propagación in vitro de las especies de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*.

Cuadro 1. Tratamientos y variables evaluadas en las distintas fases de la propagación in vitro de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyantha* y *Tabebuia billbergii*.

Fases de la propagación in vitro	Variables analizadas por fase
Establecimiento	
T1 1% de Povidyn por 5 min+ 10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	Contaminación hongos
T2 1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0,5% HgCl2 por 5 min	Contaminación bacterias
T3 10% de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0,5% HgCl2 por 5 min	N°. de explantes quemados (necrosis)
T4 10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	Porcentaje de explantes vivos
T5 1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	N°. de brotes
T6 1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	Longitud de brotes
Multiplicación	
T1 1 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	Contaminación hongos
T2 1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AIB	Contaminación bacterias
T3 2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	Porcentaje de brotes
T4 2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AIB	N°. de brotes
T5 3 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	Longitud de brote mayor
T6 3 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AIB	
Enraizamiento	
T1 1 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	Contaminación hongos
T2 1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	Contaminación bacterias
T3 2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	Porcentaje de explantes vivos
T4 2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	Longitud de raíces

Incubación y fotoperíodo de vitroplantas

La incubación en las 3 etapas se efectuó en el área de crecimiento de cultivo con intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 16 h y temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para analizar las condiciones del ensayo en la fase de establecimiento y multiplicación,

se empleó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con arreglo factorial (2x3) (Cuadro 1) con 6 tratamientos, 4 repeticiones (Gabriel *et al.* 2017). La fase de enraizamiento se evaluó mediante un DCA con 4 tratamientos y 4 repeticiones. Se utilizaron 5 unidades experimentales en cada fase.

Previo al análisis de las variables de respuesta, se realizó una prueba de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Una vez que se

comprobó la no distribución normal de los valores de las variables de respuesta en estudio, para que esos sean comparables, se ajustó los mismos con la fórmula: $\sqrt{(x+0,5)}$ (Gabriel *et al.* 2017).

Luego los datos de cada una de las variables se sometieron a un análisis de varianza y separación de medias al 95% de probabilidad; se empleó el programa estadístico MSTAT-C (Michigan State University 1989). Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se efectuó la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro* de *Myroxylon balsamum*

La contaminación por bacterias, números de brotes y longitud de brotes (tratamientos T3, T6 y T5), no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). En los explantes contaminados por hongos, quemados y vivos (%) se observaron diferencias notables ($p < 0,05$), puesto que obtuvieron los promedios más altos en los tratamientos T4, T5 y T6. Al incubar en 1% Povidyn® por 20 minutos +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 minutos +0,5% HgCl₂ por 5 minutos (T6), no se observaron diferencias significativas, ya que alcanzó un 90% de explantes vivos, libres de contaminación por hongos y bacterias a los 30 días de evaluación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Establecimiento aséptico de segmentos nodales para el cultivo in vitro de *Myroxylon balsamum* (bálsamo).

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1% de Povidyn por 5 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0,5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0,5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min
N°. de bacterias	0,30 a	0,25 a	0,40 a	0,35 a	0,19 a	0,00 a
N°. de hongos	0,30 b	0,70 a	0,25 b	0,15 bc	0,10 bc	0,00 c
N°. de explantes quemados	0,05 b	0,00 b	0,10 ab	0,05 ab	0,20 a	0,00 b
Explantes vivos (%)	35,00 bc	5,00 c	25,00 bc	35,00 bc	55,00 ab	90,00 a
N°. de brotes	0,60 a	0,05 b	0,25 ab	0,40 ab	0,55 a	0,65 a
Longitud de brotes (cm)	0,53 a	0,13 a	0,20 a	0,63 a	0,75 a	0,63 a
DE*	0,34	0,25	0,31	0,31	0,33	0,19

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas ($p>0,05$).

Los resultados en esta fase superan a los referidos para *Terminalia amazonia* al utilizar HgCl_2 0,1% con un tiempo de exposición de 5 min con un porcentaje de explantes sobrevivientes (76%). Por otro lado, en el caso de *V. allenii*, solo se observaron explantes limpios en la desinfección con HgCl_2 ; (47,5%), de los cuales solo el 10% sobrevivieron y no se observó oxidación del medio de cultivo. Sin embargo, en esta especie se observó gran pérdida de material por necrosis, de los explantes, en todos los tratamientos de desinfección y por la presencia de una bacteria persistente. De acuerdo con Smith (2000) y Alvarado (1998), es frecuente que el material vegetal tenga microorganismos endógenos. En algunos casos estos microorganismos se pueden expresar, porque la desinfección es un estrés para el vegetal o quedaron latentes y almacenados en el interior de las células espacios intercelulares o haces conductores. Por otra parte, el tratamiento con cloruro de mercurio fue efectivo para el control de contaminantes, ya que se obtuvo en promedio un 32% de los explantes contaminados y hasta 67% de explantes supervivientes en el tratamiento con 0,25% de HgCl_2 por 10 min, en el medio MS para *Terminalia amazonia* (Méndez y Abdelnour 2014). Es frecuente que el material vegetal tenga microorganismos endógenos.

Establecimiento in vitro de *Tabebuia crhysantha* (guayacán)

Las observaciones durante los 30 días de evaluación de los tratamientos de desinfección permitieron determinar diferencias significativas entre los procedimientos. Se observó que el grupo de tratamientos (T6) con 1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl_2 por 5 min (Cuadro 3) presentaron el mayor porcentaje de sobrevivencia de los explantes con

un valor promedio de 87% respectivamente, en relación con los otros grupos en ambos medios de cultivo. Los resultados obtenidos en esta fase en *Cordia alliodora*, al utilizar hipoclorito de sodio al 2,5% durante 2 minutos, mostraron una menor tasa de contaminación; pero este desinfectante provocó un aumento considerable del número de explantes perdido por fenolización y necrosis, lo que demuestra el efecto dañino que tienen estos desinfectantes sobre los tejidos vegetales (Indacochea 2013). Al respecto, varios autores reportan que el uso de hipoclorito de sodio durante 15 a 20 minutos reduce la contaminación (Romano *et al.* 2000), pero en ocasiones puede provocar la necrosis de los tejidos, que puede conducir a la muerte del explante (Sotolongo 2003), sin embargo, en otras especies ha resultado negativo, pues inhibe el crecimiento y provoca la muerte del explante (Camargo y Pascual 1999). Pérez *et al.* (2012) aplicaron hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min en explantes de caoba, lo cual logró reducir la contaminación hasta un 14%. Por otra parte, (Carranza-Patiño *et al.* 2012) al emplear 15 g de hipoclorito de calcio durante 20 minutos, alcanzaron 95% de explantes vivos, libres de contaminación por hongos y bacterias. Los problemas en el establecimiento in vitro de especies leñosas, se deben en gran medida a la contaminación microbiana de los explantes provenientes del invernadero (Carranza-Patiño *et al.* 2012), lo que parece confirmarse en los resultados de esta investigación. Los resultados obtenidos sugieren que la contaminación presente en el material vegetal, de las especies *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, puede ser impedido mediante la desinfección con 1% Povidyn® por 20 min +15% NaClO + 2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl_2 por 5 min, lo cual tuvo buenos resultados.

Cuadro 3. Establecimiento aseptico de segmentos nodales para el cultivo in vitro de *Tabebuia crhyssantha* (guayacán).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Variables	1% de Povidyn por 5 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0,5% HgCl2 por 5 min	10 % de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0,5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min
N°. de bacterias	0,32 a	0,25 a	0,40 a	0,35 a	0,19 a	0,00 a
N°. de hongos	0,32 b	0,70 a	0,25 b	0,15 bc	0,10 bc	0,00 c
N°. explantes quemados	0,05 b	0,00 b	0,10 ab	0,05 ab	0,20 a	0,00 b
Explantes vivos (%)	34,00 bc	5,00 c	3,00 bc	36,00 bc	53,00 ab	87,00 a
N°. de brotes	0,63 a	0,06 b	0,24 ab	0,39 ab	0,57 a	0,66 a
Longitud de brotes (cm)	0,54 a	0,14 a	0,21 a	0,64 a	0,73 a	0,63 a
DE*	0,33	0,26	0,32	0,31	0,32	0,19

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas ($p>0,05$).

Establecimiento in vitro de *Tabebuia billbergii* (madero negro)

En *Tabebuia billbergii*, para la variable explantes libres de contaminación, no se logró determinar diferencia entre los tratamientos de desinfección aplicados. El tratamiento con % Povidyn® por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl₂ por 5 min, resultó ser el mejor, debido a que el porcentaje de explantes sobrevivientes fue alto (88%). Por su parte, T2 y T3 presentaron 95 y 97% de explantes contaminados. Además, se debe mencionar que se observó oxidación de los medios de cultivo en todos los explantes desinfectados tanto con los T1, T2 como con T3 T4 y T5. Por este motivo, se necrosó gran parte del material introducido. Se

definió el tratamiento (T6) como el más efectivo en la desinfección de segmentos nodales *Tabebuia billbergii*. Los resultados obtenidos difieren de los porcentajes de supervivencia menores que 70% encontrados en explantes de otras especies leñosas; así, Abdelnour *et al.* (2011a) encontraron un porcentaje de asepsia de 61% en semillas de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) al emplear hipoclorito al 5,5% durante 30 min; Abbasi *et al.* (2013) encontraron una supervivencia de 70% en níspero (*Eriobotrya japonica*) con este mismo desinfectante al 10%. Estos resultados evidencian que el proceso de desinfección de cualquier tipo de explante, y en particular de los provenientes de plantas leñosas, es uno de los limitantes más severos en el establecimiento in vitro de estas especies (Cuadro 4).

Cuadro 4. Establecimiento aséptico de segmentos nodales para el cultivo in vitro de *Tabebuia billbergii* (madero negro).

Variabes	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1% de Povidyn por 5 min+ 10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0,5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0,5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0,5% HgCl2 por 5 min
N° de bacterias	0,31 a	0,25 a	0,50 a	0,33 a	0,18 a	0,00 a
N° de hongos	0,32 b	0,69 a	0,26 b	0,15 bc	0,10 bc	0,00 c
N° de explantes quemados	0,06 b	0,05 b	0,10 ab	0,05 ab	0,20 a	0,00 b
Explantes vivos (%)	37,00 bc	5,00 c	3,00 bc	32,00 bc	51,00 ab	88,00 a
Número de brotes	0,60 a	0,06 b	0,24 ab	0,37 ab	0,56 a	0,67 a
Longitud de brotes (cm)	0,55 a	0,15 a	0,23 a	0,67 a	0,70 a	0,66 a
DE*	0,32	0,25	0,32	0,33	0,31	0,21

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas ($p>0,05$).

Fase de multiplicación *Myroxylon balsamum* (bálsamo)

De acuerdo con los resultados obtenidos en la regeneración in vitro a partir de los segmentos nodales de *Myroxylon balsamum* (bálsamo), en los tratamientos no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (Cuadro 5), al añadir 2 mg.l^{-1} BAP + 1 mg.l^{-1} ANA, se obtuvo el 80% de explantes con brotes y un promedio de 0,16 cm de longitud (T4). Según Kumar *et al.* (2009) en su trabajo sobre regeneración in vitro del guayabo, utilizaron segmentos nodales que establecieron en medio MS, la mayor brotación fue con 1 mg.l^{-1} de BAP y desarrollaron 2,45 brotes por explante y el tratamiento óptimo para inducir raíz fue 1 mg.l^{-1} de IBA. Ali *et al.* (2003), en su trabajo sobre micropropagación in vitro de guayaba, utilizaron segmentos nodales establecidos en medio MS, obtuvieron hasta 3,72 brotes por explantes con una longitud de hasta 3 cm con 2 mg.l^{-1} BAP, reportaron haber tenido mejores resultados en la formación de raíces al utilizar 1 mg.l^{-1} de IBA, con raíces de hasta 5,4 cm de longitud. Tagelsir *et al.* (2006) reportaron

el tratamiento de 1 mg.l^{-1} IBA como el más efectivo para el enraizamiento de *Psidium guajava* L. Muhammad *et al.* (2012), después de superar la etapa de multiplicación in vitro e inducir la formación de raíces de las plántulas, las aclimataron gradualmente al colocarlas en macetas con composta. Este resultado fue menor si se compara con los obtenidos en *Cedrela montana* (cedro blanco), que al utilizar BAP $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$, se obtuvo un número promedio de 3 brotes por explante, de 6,0 mm (Díaz 2012). De igual forma, en *Cedrela salvadorensis* se obtuvo un número promedio de 2 brotes por explante al usar concentraciones de BA 0; 0,5; 2,5 y 3,5 5 mg.l^{-1} (Soto *et al.* 2010). En *Tabebuia rosea*, una de las escasas especies del género hasta ahora con resultados publicados, al utilizar explantes obtenidos de plantas de 2 a 3 años establecidas en condiciones de invernadero, se alcanzó la mejor tasa de multiplicación in vitro en medio de cultivo con BAP $17,8 \mu\text{M}$. (Suárez *et al.* 2006). Asimismo, en *Tabebuia donnell-smithii* se alcanzaron tasas elevadas de multiplicación en medio de cultivo suplementado con AG3 $0,47 \mu\text{m}$ y KIN $6,04 \mu\text{m}$ (Ramírez *et al.* 2009).

Cuadro 5. Fase de multiplicación in vitro de segmentos nodales de *Myroxylon balsamum* (bálsamo).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Variables	1 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	3 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	3 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AIB
N° de bacterias	0,34a	0,11a	0,16a	0,04a	0,36a	0,17a
N° de hongos	0,30a	0,51a	0,14a	0,17a	0,44a	0,50a
Explantes vivos (%)	34,00a	33,00a	62,00a	80,00a	30,00a	40,00a
N° de brotes	0,35a	0,40a	0,65a	0,70a	0,40a	0,45a
Longitud de brotes (cm)	0,08a	0,09a	0,16a	0,09a	0,04a	0,17a
DE*	0,10	0,04	0,05	0,09	0,11	0,02

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas ($p>0,05$).

Fase de multiplicación *Tabebuia crhysantha*

Si bien, no se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (Cuadro 6), según Castillo (2004), durante la fase de brotamiento se espera que los explantes originen brotes axilares con varios nudos y hojas, en el trabajo que se presenta, al añadir 2 mg.l^{-1} BAP + 1 mg.l^{-1} ANA, se obtuvo el 82% de explantes con brotes con un promedio de longitud de brotes 18 cm de la especie en estudio (T4). Estos resultados son superiores a los obtenidos en *Cordia alliodora*, por (Indacocha 2013) que alcanzó una brotación de explante 63,8% y un promedio del número de brotes por explantes de aproximadamente 2,6 brotes. Este resultado fue menor si se compara con los obtenidos en *Cedrela montana* (cedro blanco), que al utilizar BAP $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$, se obtuvo un número promedio de 3 brotes por explante de 6,0 mm (Díaz 2012). Comúnmente, para especies forestales se utiliza BAP en combinación con auxinas para inducir la multiplicación. Las plantas superiores, al poseer una mejor carga hormonal endógena comparada con plantas herbáceas, según (Schmülling 2004), no requieren que se les suministre una elevada carga hormonal para establecerlas y lograr su multiplicación en

condiciones in vitro, por ello, el resultado obtenido es favorable para la micropropagación de *Tabebuia crhysantha* (guayacán). Monteuis *et al.* (1998) y Mantovani *et al.* (2001) lograron con la adición de 1 mg.l^{-1} y 2 mg.l^{-1} de BAP favorecer el desarrollo de un mayor porcentaje de brotes (64% y 71%), al incrementar también el número de ejes por estaca a 2 y 3. Daquinta *et al.* (2001), al combinar el BAP (2 mg.l^{-1}) con AIA ($0,02 \text{ mg.l}^{-1}$), observaron el mayor porcentaje de brotación de 80% y la mayor producción de ejes por estaca (4,6 ejes por estaca). Además, cuando la concentración de AIA fue incrementada a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, la brotación se disminuyó a un 55%; lo mismo que el número de ejes por estacas (2 ejes), a la vez se incrementó el porcentaje de microestacas que produjeron callos en lugar de brotes de un 45%. Millán y Ballester (2007) obtuvieron brotes de las especies *Chlorophora tinctoria* L. y *Quercus humboldtii*, que alcanzaron 80% de brotes; en esta etapa se ha comprobado que la concentración ideal de BAP es la de 1 mg.l^{-1} , ya que a concentraciones mayores, se produce un aumento en la producción de brotes. De igual forma, en *Cedrela salvadorensis* se obtuvo un número promedio de 2 brotes por explante al utilizar concentraciones de BA 0; 0,5; 2,5 y $3,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (Soto *et al.* 2010).

Cuadro 6. Fase de multiplicación in vitro de segmentos nodales de *Tabebuia crhyssantha* guayacán.

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	3 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	3 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AIB
N° de bacterias	0,36a	0,13a	0,17a	0,05a	0,36a	0,18a
N° de hongos	0,33a	0,53a	0,16a	0,17a	0,44a	0,52a
Explantos vivos (%)	36,00a	34,00a	59,00a	82,00a	32,00a	43,00a
N° de brotes	0,35a	0,40a	0,65a	0,70a	0,40a	0,47a
Longitud de brotes (cm)	0,08a	0,09a	0,18a	0,09a	0,04a	0,18a
DE*	0,12	0,05	0,06	0,08	0,12	0,03

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas ($p>0,05$).

Fase de multiplicación *Tabebuia billbergii* (madero negro)

De acuerdo con los resultados obtenidos en la regeneración in vitro a partir de los segmentos nodales de *Tabebuia billbergii*, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (Cuadro 7), al añadir 2 mg.l^{-1} BAP + 1 mg.l^{-1} ANA, se obtuvo el 87% de explantes con brotes con un promedio de longitud de 17 cm de la especie en estudio (T4). Estos resultados, según

Castro *et al.* (2002), reportaron que la mayor tasa de multiplicación en *Tectona grandis* LF (teca), se obtuvo cuando los explantes consistentes de meristemos apicales, obtenidos de brotes epicórmicos, fueron cultivados en un medio MS suplementado con $2,22 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP. Al respecto, García *et al.* (2011), reportan que al parecer este es un comportamiento de determinadas familias como Meliaceae y Boraginaceae, al igual que algunas especies de leguminosas (McCown 2000, Jha y Das 2004).

Cuadro 7. Fase de multiplicación in vitro de segmentos nodales de *Tabebuia billbergii* (madero negro).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Variables	1 mg.l ⁻¹ BAP+ 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	3 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	3 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ AIB
N° de bacterias	0,36a	0,13a	0,16a	0,012a	0,30a	0,16a
N° de hongos	0,33a	0,53a	0,15a	0,18a	0,45a	0,52a
Explantos vivos (%)	37,00a	34,00a	61,00 a	87,00a	30,00a	41,00a
N° de brotes	0,35a	0,40a	0,65a	0,70a	0,40a	0,45a
Longitud de brotes (cm)	0,08a	0,09a	0,17a	0,09a	0,04a	0,17a
DE*	0,11	0,05	0,06	0,08	0,10	0,02

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (p>0,05).

En *C. alliodora*, se realizaron hasta 3 subcultivos, la tasa de multiplicación nunca aumentó y se mantuvo aproximadamente en 2,5 brotes. Aunque, por norma general en las distintas metodologías de micropropagación, se establece que una vez multiplicado el material, este debe aumentar la tasa de multiplicación en los subsiguientes subcultivos (Indacochea 2013, Sotolongo 2003, Yasodha *et al.* 2005). En otras, el comportamiento resulta ser a la manutención del número de brotes por explante (Maruyama 2006, Pérez *et al.* 2012, Rodríguez *et al.* 2003) e inclusive la pérdida de la respuesta morfo genética con los subcultivos (Ríos *et al.* 2005), las cuales son llamadas por McCrown (2000) y García *et al.* (2011) como recalitrantes al cultivo in vitro, los resultados en *C. alliodora* indican que este puede ser el caso de esta especie. El efecto inhibitorio en la emisión y elongación de los brotes por aumento en la concentración exógena de hormonas es diferente dependiendo del tipo de hormona a emplear y la reducción de los niveles, ya sea de auxina o citoquinina, al tener efectos distintos sobre el desarrollo de las plántulas in vitro (Sánchez *et al.* 2004). Para inducir la división y elongación celular, es necesario un balance apropiado entre citoquininas y auxinas en un medio nutritivo, además de las que se encuentran en forma endógena en los explantes in vitro (Cob *et al.* 2010). Los resultados sobre el número de brotes encontrados en esta investigación (0,34 a 0,75) concuerdan con lo encontrado con Carranza-Patiño *et al.* (2012). En este estudio, la combinación de BAP y AIB, en una relación 2:1 mg.l⁻¹ fue suficiente para conseguir altos porcentajes de brotación y longitud de brotes de *Tabebuia billbergii*, resultados que coincidieron con Carranza-Patiño *et al.* (2012), pues alcanzaron 2 mg.l⁻¹ de BAP en combinación con 1 mg.l⁻¹ de AIB, para llegar a un 70% de explantes de caoba.

Fase de enraizamiento de *Myroxylon balsamum* (bálsamo)

De todos los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento (Cuadro 8), ninguno permitió la formación de raíces, sin embargo, con el tratamiento T4: 2 mg.l⁻¹ BAP + 1 mg.l⁻¹ ANA se obtuvo un 64% de explantes vivos. Estos resultados fueron similares a los descritos por Bernal *et al.* (2009) en el establecimiento y aclimatización de vitroplantas de *S. macrophylla*. La baja capacidad de implantación se mostró con la auxina AIB, inhibida completamente en las diferentes concentraciones utilizadas. En *Tectona grandis* (teca) la respuesta rizogénica fue de 13,3% al utilizar 3 mg.l⁻¹ de ANA y 18% al emplear 2,5 mg.l⁻¹ de AIB enraizaron (Abdelnour y Muñoz 2005). Silva *et al.* (2010) indican que no todas las auxinas naturales o sintéticas pueden inducir primordios radicales in vitro. En algunas especies vegetales se dificulta el arraigado aun en presencia de auxinas, al ser otros factores los que influyen en la inducción de raíces (Vázquez y Torres 1995). Algunas especies de plantas no necesitan pasar por la etapa de enraizamiento y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo que ocurre en el proceso de multiplicación y enraizamiento en forma simultánea (Sánchez *et al.* 2004). En esta investigación se realizó una combinación de citoquinina BAP y las auxinas AIB y ANA, puesto que es la más utilizada en la inducción radical (Collado *et al.* 2004). Por otro lado, González *et al.* (2010), al trabajar en brotes adventicios obtenidos de vitroplantas de *Tabebuia donnell-smithii* a partir de brotes de estacas, observaron enraizamiento en medio de cultivo suplementado con AIB 20 μM (4 mg.l⁻¹). Asimismo, en *Tabebuia rosea*, al utilizar explantes obtenidos de plantas de 2 a 3 años, establecidas en condiciones de invernadero, la mayor tasa de enraizamiento ocurrió en presencia de ANA 5,37 μM (Suárez *et al.* 2006).

Cuadro 8. Fase de enraizamiento in vitro de yemas axilares de *Myroxylon balsamum* (bálsamo).

Variables	T1	T2	T3	T4
	1 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA
N° de bacterias	0,04a	0,21b	0,19b	0,20b
N° de hongos	0,05a	0,04a	0,11a	0,00a
Explantos vivos (%)	24,00b	51,00ab	21,00b	64,00a
N° de raíces	0,24a	0,93a	0,24a	0,60a
Longitud de raíces (cm)	0,16a	0,52a	0,11a	0,26a
DE*	0,10	0,17	0,08	0,09

*+DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, p>0,05).

Fase de enraizamiento de *Tabebuia crhysantha* guayacán

De todos los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento (Cuadro 9) ninguno permitió la formación de raíces, sin embargo, con el T4: 2 mg.l⁻¹ BAP + 1 mg.l⁻¹ ANA se obtuvo un 66% de explantes vivos. Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con Carranza-Patiño *et al.* (2012), que los mejores brotes de la fase de multiplicación se colocaron en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de ANA para facilitar su enraizamiento, ninguno de los tratamientos ensayados permitió generar

raíces a los 30 días de su evaluación, aunque el mayor porcentaje de sobrevivencia (65%) se obtuvo al combinar 2 mg.l⁻¹ BAP y 1 mg.l⁻¹ ANA para multiplicar *Swietenia macrophylla*, caoba y los informados por Rathore *et al.* (1993), quienes encontraron que la combinación BAP y AIA (2 mg.l⁻¹ y 0,02 mg.l⁻¹), respectivamente, fue la más eficiente para la multiplicación de teca. Por otra parte, Umboh (1988) señaló que la combinación BAP y ANA también resultaron eficientes para inducir la multiplicación de teca, aun cuando no informaron sobre la cantidad de ejes o nudos producidos.

Cuadro 9. Fase de enraizamiento in vitro de yemas axilares de *Tabebuia crhysantha* guayacán.

Variables	T1 1 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	T2 1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	T3 2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	T4 2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA
N° de bacterias	0,06a	0,22b	0,18b	0,20b
N° de hongos	0,05a	0,05a	0,12a	0,00a
Explantos vivos (%)	27,00b	53,00ab	20,00b	66,00a
N° de raíces	0,25a	0,90a	0,24a	0,61a
Longitud de raíces (cm)	0,15a	0,50a	0,12a	0,26a
DE*	0,10	0,16	0,08	0,08

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, p>0,05).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se demostró la necesidad de una fuente exógena de auxinas para el enraizamiento de los brotes y se encontró que en general las más usadas en esta fase son el ANA, AIB, AIA (Orellana 1998). Sotolongo *et al.* (2011) y Flores *et al.* (2009), reportan que en especies forestales, el AIB tiene mejor respuesta que los demás reguladores del crecimiento. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo 2004). El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente el trasplante a un medio de cultivo modificado. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas (Villalobos y Torpe 1993). Entre los efectos auxínicos en las plantas, se encuentra la formación de raíces (Barba 1991); numerosos estudios han demostrado que los contenidos de auxinas en el medio de cultivo inducen el crecimiento de este órgano a partir de segmentos de ñame (Mantell *et al.* 1993).

De todos los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento (Cuadro 10) ninguno permitió la formación de raíces, sin embargo, con el T4: 2 mg.l⁻¹ BAP + 1 mg.l⁻¹ ANA se obtuvo un 68% de explantes vivos. En muchas especies forestales el enraizamiento puede ocurrir al pasar las plántulas enraizadas a un medio libre de hormonas (Daquinta *et al.* 2001), lo cual puede deberse al contenido endógeno de auxinas que pueden desencadenar la rizogénesis (Bernal *et al.* 2009), además, que se reconoce que esta fase

tiene requerimientos nutricionales inferiores a la multiplicación, por lo que en muchas ocasiones disminuir la concentración del medio de cultivo en esta etapa favorece el enraizamiento (Gamboa y Abdelnour 2011, González y Vilca 1998). Para *C. alliadora* el mejor medio fue con AIB, no solo por el porcentaje de enraizamiento, sino también por la morfología de las raíces, lo cual coincide con Schuler *et al.* (2005), Núñez *et al.* (2008) y Castro y Sánchez (2010), en los que solo una auxina es usada para el enraizamiento y donde los porcentajes de este oscilan entre 80-95%. Millán *et al.* (2011) demostraron en *Cedrela odorata* L. (Cedro) que el efecto del AIB en concentración de 1 mg.l⁻¹ sobre la rizogénesis radica en el aumento del número de meristemoides que se derivan de tejidos del cambium, especialmente de las células parenquimatosas cercanas a la región más externa del floema cerca del anillo del esclerénquima, los cuales se diferencian más tarde alrededor del sexto día en el medio de cultivo. Al igual, que trabajos realizados en el CATIE (Leakey *et al.* 1990) con varias especies, tales como: *Terminalia oblonga* (Ruiz & Pav.) (0,8% de AIB), *Cordia alliadora* (Ruiz & Pav) (0,8%-1,6% de AIB) y la especie *Hyeronima alchorneoides* (1,6% de AIB); con la especie *C. iguaguana*, los mejores porcentajes de enraizamientos se obtuvieron cuando se utilizaron dosis al 0,8% (T4) y 1,6% (T5) de AIB. En esta investigación se realizó una combinación de citoquinina BAP y la auxina AIA, ya que es la más utilizada en la inducción radical (Collado *et al.* 2004). Minchala (2011) informó sobre el establecimiento de ápices caulinares, brotamiento y enraizamiento *in vitro* de ápices caulinares obtenidos de plántulas provenientes de la germinación *in vitro* de semillas.

Cuadro 10. Fase de enraizamiento in vitro de yemas axilares de *Tabebuia billbergii* (madero negro).

	T1	T2	T3	T4
Variables	1 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ AIB	1 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 0,5 mg.l ⁻¹ ANA	2 mg.l ⁻¹ BAP + 1 mg.l ⁻¹ ANA
N° de bacterias	0,06a	0,22b	0,18b	0,20b
N° de hongos	0,05a	0,05a	0,12a	0,00a
Explantos vivos (%)	27,00b	53,00ab	20,00b	68,00a
N° de raíces	0,25a	0,90a	0,24a	0,61a
Longitud de raíces (cm)	0,15a	0,50a	0,12a	0,26a
DE*	0,10	0,16	0,08	0,08

*DE=Desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, p>0,05).

La serie de procesos para la propagación in vitro de plantas de ñame se ajusta a la secuencia de eventos asociados a la multiplicación de la mayoría de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, destacadas por Murashige (1974 y 1977), citadas por Krikorian (1993); Pelacho *et al.* (2003) de la siguiente manera: etapa 0, etapa inicial que comprende la selección de la planta madre y de una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte; etapa I, etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial o primario; etapa II, etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente; etapa III, corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante y etapa IV, transferencia final a la etapa de medio ambiente. Frecuentemente las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas a cada una de las etapas mencionadas y, cuando sea posible, conviene organizar una estrategia de multiplicación basada en la interpretación de dichas condiciones (Krikorian 1993).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Estatal del Sur de Manabí y a la Dirección de investigación por el financiamiento de la investigación.

LITERATURA CITADA

- Abbasi, NA; Pervaiz, T; Hafiz, IA; Yaseen, M; Hussain, A. 2013. Assessing the response of indigenous loquat cultivar Mardan to phytohormones for in vitro shoot proliferation and rooting. *Journal of Zhejiang University Science* 14(9):774-784.
- Abdelnour, A; Aguilar, ME; Valverde, L. 2011a. Micropropagación de Pílon (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense* 35(2):1-9.
- Abdelnour, A; Muñoz, A. 2005. Micropropagación de teca (*Tectonagrandis* L.f). *Revista Forestal* 2(5):1-11.
- Ali, R; Mulwa, M; Norton, A. Skirvin, M. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) Pakistán. *Journal of Horticultural Science and biotechnology* 78(5):739-741.
- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de Plantas, Cuba. p. 81-104.
- Barba, A. 1991. Reguladores del crecimiento vegetal (Capítulo 4). En *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Trillas. p. 48-66.
- Bernal, JA; Rojas, R; Hine, A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliaceae). *Tecnología en Marcha* 22(3):34-41.
- Brack, A; Mendiola, C. 2004. *Ecología del Perú*. PNUD. Lima, Perú, Asociación Editorial Bruño, 495 p.
- Camargo, JT; Pasqual, M. 1999. Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese in vitro *Revista Brasileira de Agrociência* 5:81-83.
- Carranza-Patiño, H; Reyes-Morán, W; Mora-Silva, W; Cevallos-Falquez, O; Escobar-Troya, E; Cadme-Arévalo, M; Nieto-Rodríguez, J; Morante-Carriel, J. 2012. Propagación clonal in vitro de *Swietenia macrophylla* King (CAOBA). *Ciencia y Tecnología* 6 (2):1-8.
- Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. 8 p. (en línea). Consultado 15 abr. 2017 Disponible en http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382
- Castro, D; Díaz, J; Linero, J. 2002. Propagación in vitro de árboles élite de teca (*Tectona grandis* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 1:49-53.
- Castro, RD; Sánchez, RGA. 2010. Propagación Clonal in vitro de *Eucalyptus pellita* F. Muell a partir de árboles plus. *Temas Agrarios* 15(1):34-43.
- Cob, J; Sabja, A; Ríos, D; Lara, A; Donoso, P; Arias, L; Escobar, B. 2010. Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación in vitro de *Persea lingue* en la zona Centro-Sur de Chile. *Bosque* 31(3):202-208.
- Collado, R; Barbón, D; Agramonte, F; Jimenez, M; Pérez, G; Odalys, D; Ramírez, D. 2004. Establecimiento in vitro de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. *Biotecnología Vegetal* 4(3):143-146.
- Daquinta, M; Ramos, L; Capote, I; Lescano, Y; Rodriguez, R; Trina, D; Escalona, M. 2001. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.). *Revista Forestal Centroamericana* 35:23-28.
- Delgado, MF; Cuba, M; Hechenleitner, P; Thiers, O. 2008. Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Bosque (Valdivia)* 29(2):120-126.
- Díaz G. 2012. Procesos morfogénicos in vitro de cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma. Tesis Lic. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. 124 p.

- Flores, CM; Cabañas, A; Peñalosa, I; Quintanar, R; Vázquez, J; Urzúa, M. 2009. Auxinas endógenas, AIA-Oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiata* L. Wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista Fitotecnia* 32(1):61-66.
- Flores, M; Jiménez, V; Chacon, R. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas. *Revista Forestal Agronomía Mesoamericana* 20(2):319-325.
- Gabriel, J; Castro, C; Valverde, A; Indacococha, B. 2017. Diseños experimentales: Teoría y práctica para experimentos agropecuarios. Jipijapa, Ecuador, Grupo COMPAS, Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM). 146 p.
- Gamboa, JP; Abdelnour, A. 2011. Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). *Revista Agronomía Costarricense* 23:69-76.
- García, GR; Delgado, M; González, Y, González, A; Garriga, M; Caligari, PD; Quiroz, K. 2011. In vitro propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(3):376-382.
- González, C; Vilca, J. 1998. Micropropagación vegetativa "in vitro" de aliso (*Alnus acuminata*). Cajamarca, Perú Red Andina de Semillas Forestales (RADEFORCOSUDE). 41 p.
- González, J; Ramírez, F; Roberts, M; O'Connor, A; Peña, Y. 2010. Adventitious shoot induction from adult tissues of the tropical timber tree yellow Ipé primavera (*Tabebuia donnellsmithii* Rose [Bignoniaceae]). *In Vitro Cell. Dev. Bio. - Plant* 46(5):411-421.
- Gupta, P; Nadgir, A; Mascarenhas, A; Fagannathan, V. 1980. Tissue culture of foresta trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science Letters* 17:259-268.
- Indacococha, B. 2013. Conservación y propagación de árboles superiores de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav). Oken, en la Microrregión Sur de Manabí. Tesis Ph. D. Cuba. Universidad de Pinar del Río. 76 p.
- Jha, S; Das, S. 2004. Tissue culture of cashewnut. *In Plant biotechnology and molecular markers*. Srivastava, P; Srivastava, P; Narula, A; Srivastava, S. Publishers. New Delhi, India, Anamaya. p. 244-260.
- Krikorian, AD. 1993. Propagación clonal in vitro. *In Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT. p. 95-125.
- Kumar, M; Shanker, V; Jaiswal, U. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of in vitro raised plantlets. *India. J. Fruit Orn. Plant Res.* 17(1):29-38.
- Leakey, RRB; Mesén, F; Tehoundjeu, Z; Longman, KA; Dick, JMcP; McP J. Newton, A; Matin, A; Grace, J; Munro, RC; Mutoka, PN. 1990. Low-technology techniques for the vegetative propagation. *Commonw. For. Rev.* 69(3):247-256.
- Limongi, R. 2012. Catálogo del banco de germoplasma de bálsamo. Programa Nacional de Forestería. Estación Experimental Litoral Sur, Ecuador. INIAP. p. 8.
- Mantell, SH; Mague, SQ; Chandler FL. 1993. Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el fiame. *In Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT. p. 481-494.
- Mantovani, NC; Henz, ET; Vestena, FS. 2001. In vitro regeneration of Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *Forestal Science* 11:93-101.
- Martínez, E. 2014. Cultivo in vitro mediante mediante embriogénesis somática y transformación genética del maíz con genes biosíntesis de trehalosa. Chapingo, Texcoco, México. 136 p.
- Maruyama, E. 2006. Tissue culture of *Swieteniamacrophylla* King (Big-Leaf Mahogany) *In Suzuki, K., Ishii, K; Sakurai, S; Sasaki, S. (eds.). Plantation technology in tropical forest science*. Tokio, Japan. Springer-Verlag. p. 131-136.
- McCown, BH. 2000. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminedism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 36(3):149-154.
- Méndez, D; Abdelnour, A. 2014. Establecimiento in vitro de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 11(27):7-21.
- Michigan State University. 1989. MSTAT-C. A software program for the design, management, and analysis of agronomic research experiments. Russell, D.F. (Director MSTAT). Michigan State University, Department of Crop and Soil Sciences and Department of Agricultural Economic, East Lansing, Michigan, USA.
- Millán, L; Ballester, A. 2007. Micropropagación de *Chlorofora tictoria* L., Gaudichaud y *Quercus Humboldth* Bonpl. *Revista Real Academia Gallega de Ciencias* 17-28.
- Millán, L; Corredoira, E; San José, ME. 2011. In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. *International Journal of Tropical Biology* 59(1):447-453.
- Minchala J. 2011. Informe Proyecto "producción in vitro de Plántulads forestales para la Reforestación: Convenio Universidad Nacional de Loja_Ministerio de Industrias y Productividad: Laboratorio de Micropropagación Vegetal. Loja-Ecuador. sp.
- Ministerio de Agricultura del Perú. 2002. Manual divulgativo de las especies forestales de la reserva de biosfera del noroeste peruano (en línea). INRENA. Tumbes, Perú. 37 p. Consultado 15 abr. 2017. Disponible en https://coin.fao.org/coinstatic/cms/media/21/14042335632720/especies_forestales_bosques_secos_del_ecuador.pdf

- Ministerio de Turismo. 2014. El Guayacán, el árbol que despierta a la vida 2014 (en línea). Quito, Ecuador. Consultado 15 abr. 2017. Disponible en <http://www.turismo.gob.ec/el-guayacan-el-arbol-que-despierta-a-la-vida/>
- Monteuuis, O; Bon, MC; Goh, DKS. 1998. Teak propagation by in vitro culture. Bois et Forests des Tropiques 256:1-11.
- Muhammad, U; Madiha, B; Bilques, F. 2012. Enhanced in vitro multiple shoot induction in elite Pakistani guava cultivars for efficient clonal plant multiplication. Africa. African Journal of Biotechnology 11(44):10182-19187.
- Murashige, TF; Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays of tobacco cultures. Physiological Plantarum 15:473-497.
- Núñez, SN; Mora, SA; Santacruz, RF. 2008. Aplicación de técnicas de micropropagación en las especies *Cordia elaeagnoides* A. DC (Borraginaceae). Avances de la Investigación científica en Cuba. Semana Nacional de la Investigación. Guadalajara Nogales. Zapopan, Jalisco, México. p. 63-70.
- Orellana, M. 1998. Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla*. King). Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 85 p.
- Pelacho, AA; Glosas, LM; Cueva, RB; Sanfelio, JL; Badia, JS; Alins GV. 2003. Aplicaciones del cultivo in vitro (en línea). Consultado. 15 abr. 2017. Diponible en <http://etsea2.udl.es/invitro>
- Pérez, J; Mesén, F; Aguilar, M; Hilje, L. 2012. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. optimización de la fase de multiplicación Revista Forestal Centroamericana 38:67-71.
- Ramírez, F; Jerónimo, J; González, J; Peña, Y. 2009. Propagación in vitro de primavera (Tabebuia donnell-smithii Rose [Bignoniaceae]). XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de producción de Alcoholes y Levaduras. México.
- Rathore, IS; Singh, RP; Skekhawat, NS. 1993. Clonal propagation of desert teak (*Tectona undulata*) through tissue culture. Plant Science Lirnerich 79:217-222.
- Rebolledo, V; Aparicio, R; Cruz, A. 2006. Estudio preliminar para la propagación in vitro de dos especies de pinos. Foresta Veracruzana 8(2):27-32.
- Ríos, D; Avilés, FM; Sánchez-Olate, R; Escobar, R; Pereira, G. 2005. Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño *Castanea sativa* Mill. Agricultura Técnica 65(3):258-264.
- Rodríguez González, H; Hechevarría Sosa, I; Rodríguez Ferradá, CA; Rivera Amitas, MM. 2003. Propagación in vitro de *Artemisia absinthium* L. (en línea). Rev. Cubana Plant. Med. 8(1). Consultado 15 abr. 2017. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100003&lng=es&nrm=iso
- Romano, A; Barros, S; Martins, MA. 2000. Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratoniasiligua*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68:35-41.
- Sánchez, M; Ríos, D; Pedraza, M; Pereira, G; Castellanos, H; Escobar, R. 2004. Propagación in vitro de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst) a partir de embriones aislados. Bosque 25(1):123-128.
- Schmülling, T. 2004. CYTOKININ. In Schmülling T., Encyclopedia of Biological Chemistry. Berlin: (eds.). Lennarz, W., Lane, MD. Academic Press/Elsevier Science. p. 1-7.
- Schuler, I; Baquero, S; Gaona, D; Vega, E; Ramirez, R; Nieto, V; Hodson, E. 2005. Propagación in vitro del material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Oken (Nogal cafetero). Revista Colombiana de Biotecnología 7(1):39-50.
- Silva, L; de Tarso, P; de Souza, S; de Queiroz, C; Brandão, H. 2010. Efeito de diferentes reguladores de crecimiento na regeneração in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaedora* Ducke). Acta Amaz. 40(2):275-279.
- Smith, R. 2000. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. 2ª Edición. San Diego, USA. Academic Press. 231 p.
- Soto, B; Valverde, L; Rojas, A; Hine, A. 2010. Establecimiento in vitro de *Cedrela salvadorensis* Standl. Tecnología en Marcha 23(4):66-73.
- Sotolongo, SR; Geada, LG; Cobas, LM. 2011. Félix Varela (ed.). La Habana, Cuba. Fomento Forestal. 287 p.
- Sotolongo, SR. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae) Revista del Jardín Botánico Nacional 24(1-2):245-250.
- Suárez I., Jarma AJ, Ávila M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Temas Agrarios 11(2):52-62.
- Tagelsir, I; El-Fatih, M; Abdelghaffar, E. 2006. Enhancement or growth and control of browning of tissue cultures of guava (*Psidium guajava* L.). Sudan. Journal Science Technology 7(1):1-10.
- Umboh, MIJ. 1988. The application of tissue culture techniques in economically important tropical trees. Biotrop Spec. Publ. 35:77-86.
- Uribe, M; Delaveau, C; Garcés, R; Escobar, E. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque 29(1):58-64.

- Valverde, L; Dufour, M; Villalobos, V. 1998. In vitro organogénesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabácea, meliácea). Revista Tropical 46(2):225-228.
- Vázquez, E., Torres, S. 1995. Fisiología Vegetal. 2ª edición. Ciudad de la Habana, Cuba, Editorial Pueblo y Educación. s. p.
- Villalobos, VM; Torpe, TA. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In Roca, M; Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. p. 127-141.
- Yasodha, R; Sumathi, R; Gurumurthi, K. 2005. Improved micropropagation methods for teak. Journal of Tropical Forest Science 17:63-75.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

