

# Propagación Clonal *in vitro* de Diferentes Especies de Poró<sup>1</sup>

A. Berrios\*, J. Sandoval F.\*\* , L. E. Müller\*\*

## ABSTRACT

Small plantlets raised *in vitro* from seeds of *Erythrina poeppigiana*, *E. berteriana*, *E. costaricensis* and *E. fusca* were used as starting material. From each plantlet the vegetative apex and cotyledonary node were isolated. Murashige and Skoog (M.S.) medium was used for establishing the cultures. Different concentrations of BA (0, 1, 2, 4 mg · l<sup>-1</sup>) and BAP (0, 1, 2, 4, 8 mg · l<sup>-1</sup>) were tested, as well as all possible combinations. For the *in vitro* layering the same M.S. basal medium was used supplemented by IBA (1 mg · l<sup>-1</sup>) or BA (1 mg · l<sup>-1</sup>). The survival, oxidation, and contamination percentages, considering all cultivated explants during establishment varied with the species. The cultured apices produced some roots. The development of the cotyledonary buds took place only in *E. berteriana* and *E. costaricensis*; the best treatments were 2 or 4 mg · l<sup>-1</sup> BA for *E. berteriana*, independent of the IBA concentration, and IBA 1 mg · l<sup>-1</sup> with 8 mg · l<sup>-1</sup> of BA for *E. costaricensis*. *In vitro* layering produced an adequate number of explants to initiate the multiplication phase.

Key words: micropropagation, *Erythrina* spp.

## COMPENDIO

Se usaron plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* de *Erythrina poeppigiana*, *E. berteriana*, *E. costaricensis* y *E. fusca*. De cada plántula se aisló el ápice vegetativo y el nudo cotiledonar. En la fase de establecimiento se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (M.S.). Se probaron diferentes concentraciones de IBA (0, 1, 2 y 4 mg · l<sup>-1</sup>) y de BA (0, 1, 2, 4 y 8 mg · l<sup>-1</sup>), en todas sus posibles combinaciones. En la fase de multiplicación y cultivo horizontal (*in vitro layering*) también se usó el medio M.S. basal más IBA (1 mg · l<sup>-1</sup>). Los porcentajes de supervivencia, oxidación y contaminación obtenidos del total de explantes cultivados en la fase de establecimiento, variaron con la especie. Se notó en el cultivo de ápices vegetativos la diferenciación de raíces. El desarrollo de yemas cotiledonares sólo ocurrió en *E. berteriana* y *E. costaricensis*. Los mejores tratamientos fueron 2 mg · l<sup>-1</sup> ó 4 mg · l<sup>-1</sup> de BA para *E. berteriana*, independientemente de la concentración de IBA, y 1 mg · l<sup>-1</sup> de IBA más 8 mg · l<sup>-1</sup> de BA para *E. costaricensis*. Por medio del cultivo horizontal se obtuvo un número adecuado de explantes para proseguir con la fase de multiplicación.

Palabras clave: micropropagación, *Erythrina* spp.

## INTRODUCCION

El poró (*Erythrina* spp.) es una leguminosa arbórea usada frecuentemente como sombra en cafetales y cacaoales y, también, como cercas vivas. Es capaz de fijar nitrógeno, lo que contribuye al mejoramiento de la fertilidad del suelo. Generalmente se propaga por estacas, pero este método de propagación asexual tiene varias desventajas: pérdida de la capacidad de enraizamiento a medida que el árbol de origen es más viejo; los árboles portadores de estacas deben estar lo suficientemente maduros como para expresar sus características; no se pueden obtener

grandes cantidades de ellas a partir de una sola planta. Una opción es utilizar la metodología del cultivo de tejidos o micropropagación. Su principal ventaja reside en su gran capacidad de multiplicación vegetativa a partir de fragmentos de órganos o tejidos de una planta madre seleccionada.

En la actualidad se reconoce que la multiplicación clonal *in vitro* o micropropagación tiene su mayor capacidad de aplicación en plantas arbóreas (10, 20). Sin embargo, las investigaciones efectuadas en este campo con árboles tropicales, especialmente con aquellos de la familia Leguminosae, son pocas, si se comparan con las hechas en especies de clima templado (15, 16). En la mayoría de los trabajos se consiguió la propagación clonal *in vitro* con el desarrollo de yemas adventicias a partir de callos. En pocos casos se usaron árboles adultos como plantas-madre. Rao y Lee (15) afirmaron que entre más joven sea el tejido, mejor será su crecimiento al cultivarse *in vitro*. Esta parece ser la principal razón para seleccionar explantes que provengan de plantas jóvenes.

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 20 de marzo de 1990.

\* Apartado postal 1655-1000 San José C.R.

\*\* Laboratorio Cultivo de Tejidos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CAITIE) 7170-Turrialba, C.R.

Dhawan y Bhojwani (6) utilizaron nudos cotiledonares y nudos de plántulas de *Leucaena leucocephala*, y lograron el desarrollo de yemas axilares al cultivarlos en un medio M.S. suplementado con  $0.68 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de BA más  $58.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de glutamina. En el cultivo *in vitro* de ápices vegetativos de *L. leucocephala* se obtuvo (17) la diferenciación de yemas adventicias en un medio M.S. más  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de K (cinetina).

Goyal y Arya (7) informaron del desarrollo de yemas adventicias en *Prosopis cineraria* a partir del cultivo *in vitro* de hipocótilos en un medio M.S. más  $4.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de K y  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de NAA. En un cultivo *in vitro* de hipocótilos de *Albizzia* spp. se diferenciaron callos y yemas adventicias al emplearse un medio de cultivo B5 con  $2.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de BA (23).

En el presente trabajo, y de acuerdo con el conocimiento actual sobre el tema, se propusieron los siguientes objetivos:

- Establecer las mejores condiciones para el cultivo *in vitro* de ápices vegetativos y nudos cotiledonares de diferentes especies de *Erythrina*.
- Lograr, por medio de explantes secundarios, la multiplicación clonal rápida *in vitro*.

#### MATERIALES Y METODOS

Se usaron plántulas de cuatro especies de *Erythrina*: *E. poeppigiana*, *E. berteroana*, *E. costaricensis* y *E. fusca*. Estas plántulas se obtuvieron de semillas germinadas asépticamente, suministradas por el Banco Latinoamericano de Semillas Forestales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

La desinfección de las semillas se hizo en una campana de flujo laminar, sumergiéndolas en etanol al 95% por dos minutos. Se enjuagaron en agua destilada estéril por 5 min., seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio (blanqueador comercial, 5.25% de NaClO) por 20 minutos. Luego se hicieron cuatro lavados con agua destilada estéril, cada uno de cinco minutos.

Las simientes desinfectadas se colocaron en tubos de cultivo de 15 cm x 2.5 cm, que contenían alícuotas de 10 ml del medio basal semisólido (0.7% de agar) de Murashige y Skoog (13) sin sacarosa.

Dos o tres semanas después de sembrar las semillas, ya se habían formado plántulas adecuadas para efectuar la excisión de los explantes. La disección se realizó en

la campana de flujo laminar. Los explantes se colocaron en un plato de Petri estéril de 14 cm de diámetro. La operación de disección se efectuó con pinzas y escalpelos previamente esterilizados con la ayuda de un mechero de gas. De cada plántula se aisló el ápice vegetativo y el nudo cotiledonar. Para el cultivo horizontal se usaron tallitos desarrollados *in vitro* a partir de los ápices vegetativos.

Los explantes se enjuagaron en una solución antioxidante estéril de ácido ascórbico ( $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) en combinación con ácido cítrico ( $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) durante 20 minutos.

Los medios de cultivo utilizados se fundamentaron en el medio basal semisólido de Murashige y Skoog (13). Para las modificaciones de este medio basal se emplearon dos designaciones: (E) para el tipo usado en la fase de establecimiento y (M) para la fase de multiplicación y cultivo horizontal (*in vitro layering*).

En la fase E se usaron tubos de cultivo de 9.5 cm x 2 cm que contenían alícuotas de 10 ml del medio semisólido (0.7% de agar) respectivo (Cuadro 1). En esta fase se cultivó un explante por tubo; para cada uno de los medios se sembraron 25 repeticiones (25 explantes).

En la fase M se emplearon cajitas de plástico marca Magenta (tipo GA 7) que contenían alícuotas de 50 ml de medio M.S. semisólido (0.15% de Gelrite) y  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de BA (Cuadro 1). Se sembró un eje caulinar en posición horizontal por cada recipiente. El número de ejes caulinares cultivados varió con la especie de *Erythrina*, ya que dependió de la cantidad de material vegetal disponible. Las yemas desarrolladas se separaron luego del explante original y se sembraron en medio M.S. semisólido (0.15% de Gelrite) con  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de IBA (Cuadro 1) para estimular su crecimiento en longitud.

Los tubos de cultivo inoculados se colocaron en una cámara de crecimiento, con un fotoperíodo de 16 h e iluminación de 2000 lux a nivel de los estantes. La luz fue proporcionada por lámparas fluorescentes del tipo G.E. Gro y Sho. La temperatura se ajustó a  $27 \pm 2^\circ$  centígrados.

En la fase de establecimiento (E) se evaluó: a) El número de explantes supervivientes, contaminados y oxidados; b) la respuesta morfogénica de ápices vegetativos; y c) el número de yemas cotiledonares formadas por nudo cotiledonar.

Esta evaluación se hizo cuatro semanas después de sembrados los explantes en el medio correspondiente.

**Cuadro 1.** Composición de los medios de cultivo usados en la propagación clonal *in vitro* de *Erythrina* spp.

Medio	Reguladores de crecimiento (mg.l <sup>-1</sup> )	
	IBA	BA
<b>Fase de establecimiento (E)</b>		
E <sub>1</sub>	0	0
E <sub>2</sub>	1	0
E <sub>3</sub>	2	0
E <sub>4</sub>	4	0
E <sub>5</sub>	0	1
E <sub>6</sub>	1	1
E <sub>7</sub>	2	1
E <sub>8</sub>	4	1
E <sub>9</sub>	0	2
E <sub>10</sub>	2	2
E <sub>11</sub>	2	2
E <sub>12</sub>	4	2
E <sub>13</sub>	0	4
E <sub>14</sub>	1	4
E <sub>15</sub>	2	4
E <sub>16</sub>	4	4
E <sub>17</sub>	0	8
E <sub>18</sub>	1	8
E <sub>19</sub>	2	8
E <sub>20</sub>	4	8
<b>Fase de multiplicación (M)</b>		
M <sub>1</sub>	0	1
M <sub>2</sub>	1	0

**Notas:**

A todos los medios se adicionó sacarosa al 3% y 30 mg · l<sup>-1</sup> de cisteína-HCL.

En la fase de multiplicación y cultivo horizontal (M) se evaluó: a) el número de yemas axilares brotadas por cada eje caulinar; b) tiempo (en días) transcurrido para el brote de las yemas axilares del eje caulinar; y el c) tiempo (en días) transcurrido para que las yemas axilares formaran ejes caulinares con tamaño apto para su siembra horizontal.

Para cada especie de *Erythrina* investigada, se calculó la tasa de multiplicación potencial, con base en el siguiente procedimiento:

Se sumó el número total de días que tardaron los explantes para completar un ciclo de propagación. Se dividió el número de días de un año (365) entre el dato

anterior para obtener el número potencial de ciclos por año. Con estos datos se obtuvo la tasa de multiplicación potencial de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$(a)^a = \text{tasa de multiplicación potencial}$$

donde:

a = número promedio de yemas axilares producidas en el cultivo horizontal; y

b = número de ciclos de propagación por año.

Los totales de supervivencia, contaminación y oxidación obtenidos en la fase de establecimiento se expresaron en porcentajes, al igual que la respuesta morfogénica del cultivo *in vitro* de ápices vegetativos.

Para el cultivo *in vitro* de nudos cotiledonares se utilizó un diseño completamente al azar. Se hicieron análisis de variancia y comparaciones de medias mediante la metodología establecida por la prueba de Amplitud Múltiple de Duncan.

**RESULTADOS Y DISCUSION**

Según varios autores (1, 4, 19), el establecimiento *in vitro* de especies arbóreas es difícil de lograr. La obtención de los explantes, a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente, resuelve algunos problemas, como por ejemplo la desinfección complicada del material vegetal y la poca respuesta morfogénica en tejidos de árboles adultos. Bonga (3) indicó que cuanto más joven sea la planta, más sencilla será su micropropagación.

Como se observa en el Cuadro 2, la supervivencia en esta fase, expresada en porcentaje, varió con la especie de *Erythrina*. Estos datos se basan en la observación de los cultivos que, luego de cuatro semanas de la inoculación, no se contaminaron u oxidaron.

**Cuadro 2.** Supervivencia, contaminación y oxidación (%) obtenidas del total de explantes cultivados en la fase de establecimiento de la propagación *in vitro* de *Erythrina* spp.

Especie	Supervivencia (%)	Oxidación (%)	Contaminación (%)
<i>E. poeppigiana</i>	59	37	4
<i>E. berteriana</i>	84	9	7
<i>E. costaricensis</i>	72	24	4
<i>E. fusca</i>	81	10	9

Se esperó que la contaminación fuese mínima por el origen de los explantes. Sin embargo, se encontró 4% en *E. poeppigiana* y *E. costaricensis*, 9% en *E. fusca* y 7% en *E. berteriana* (Cuadro 2). Esto se debió principalmente a la presencia de microorganismos endofíticos, en especial bacterias. Al respecto, Sweet y Bolton (21) concluyeron que estos patógenos también están presentes en semillas y, por ende, en las plántulas que de ellas surgen.

Se encontró que la oxidación fue la causa más importante de la pérdida de propágulos. Cuando éstos se cortaron, aparecieron coloraciones oscuras en las zonas dañadas, lo que concuerda con lo propuesto por Bonga (2), quien afirmó que la oxidación es un impedimento para la iniciación de un cultivo aséptico.

Este fenómeno ocurre por la acción de las enzimas de tipo polifenoxidas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas. Actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas. Estas sustancias, a su vez, pueden polimerizarse y afectar las proteínas. De esta forma se inhibe el crecimiento (2, 9).

Durante esta investigación se trató de controlar la oxidación con enjuagues de los explantes en una solución estéril de ácido ascórbico en combinación con ácido cítrico, al agregar cisteína-HCl al medio de cultivo y hacer subcultivos frecuentes. Sin embargo, para *E. poeppigiana* y *E. costaricensis* la oxidación alcanzó 37% y 24% respectivamente, lo que redujo de manera considerable la supervivencia de estas dos especies en la fase de establecimiento. Estos resultados concuerdan con lo observado por varios autores (5, 14, 17) al cultivar *in vitro* fragmentos de plántulas de *Dalbergia sissoo* y *L. leucocephala*.

En relación con la respuesta morfogénica del cultivo de ápices vegetativos se observó una tendencia uniforme en la diferenciación de raíces en los tratamientos que carecieron de BA. Cuando no se añadió ningún regulador de crecimiento al medio de cultivo, se formaron raíces en los explantes de *E. berteriana* (44%), *E. costaricensis* (80%) y *E. fusca* (63%). Esto significa que el nivel endógeno de auxinas para este género es alto, lo que concuerda con los resultados de otros autores (18), quienes constataron que tejidos jóvenes presentan frecuentemente contenidos auxínicos elevados que promueven, en el cultivo *in vitro*, la iniciación de raíces.

Teóricamente concentraciones iguales de auxina y citocinina estimulan la formación de callo. Sin embargo, en esta investigación, la presencia de esta masa indiferenciada de células, especialmente en la base de los ejes caulinares, fue una respuesta generalizada en

todas las especies de *Erythrina* para los niveles y combinaciones de reguladores de crecimiento estudiados. Thomas y Mehta (22) informaron acerca de un comportamiento semejante en *Ceratonia siliqua*. Se cree que esto pueda deberse al contacto directo de esta parte del explante con el medio y, por lo tanto, a una concentración mayor de las hormonas. De esta forma las células de esta zona de tejido responden más intensamente a la acción de los reguladores de crecimiento contenidos en el medio nutritivo.

Una alternativa posible para producir plántulas hubiera sido la transferencia de los callos formados a un medio favorable para la diferenciación de yemas. Pero este procedimiento se descartó por el riesgo que significa para la estabilidad genética del material. Como lo indicó Kester (10), se debe evitar el uso del callo por la posible obtención de variantes (somaclonal).

El principal objetivo del cultivo aséptico de ápices vegetativos fue el de probar su utilidad para la multiplicación rápida *in vitro*. A pesar del gran número de tratamientos probados, no se logró el crecimiento y desarrollo de yemas axilares latentes o adventicias. Únicamente se regeneró un tallo a partir de un ápice vegetativo, es decir no se cumplió con el principal objetivo de esta metodología: obtener un número adecuado de propágulos a partir de un solo explante. Dhawhan y Bhojwani (6) informaron sobre una situación similar en cultivos de *L. leucocephala*.

Al emplear los nudos cotiledonares de las plantas se pretendió conseguir la brotación de las yemas cotiledonares. Sin embargo, esto ocurrió únicamente en los cultivos de *E. berteriana* y *E. costaricensis*.

Puesto que se evaluaron muchas combinaciones de IBA más BA, se descartó la posibilidad de que no se incluyeran niveles adecuados de estos reguladores de crecimiento para permitir la diferenciación de estas yemas en *E. poeppigiana* y *E. fusca*. En éstas solamente se consiguió la formación de callo en la mayoría de los tratamientos probados.

De los análisis de variancia efectuados para los datos obtenidos en *E. berteriana* y *E. costaricensis* se deduce que el efecto del BA fue más significativo que el del IBA, en relación con el número de yemas cotiledonares diferenciadas. Se informó de un caso similar en *L. leucocephala* cultivada *in vitro* (8).

En el caso de *E. berteriana*, al considerar en el análisis estadístico sólo el IBA (Cuadro 3), se alcanzó el mayor número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas cuando no se añadió esta auxina al medio de cultivo. Este número se redujo conforme aumentó

**Cuadro 3.** Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo *in vitro* de nudos cotiledonares de *E. berteriana* al considerar sólo las concentraciones de IBA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Concentración de IBA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Promedio de yemas (*) (núm.)
0	1.0323 (a)
1	0.9180 (a)
2	0.8750 (a)
4	0.6923 (a)

**Nota:**

\* Diferencias entre promedios seguidos por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la Prueba de Amplitud Múltiple de Duncan al 5% de probabilidad.

el nivel del IBA. Aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas entre medias al obtenerse un coeficiente de variación muy alto, debido posiblemente a que los nudos cotiledonares usados provenían de grupos aleatorizados de simientes, es interesante destacar la tendencia establecida, pues se sabe que las auxinas normalmente no estimulan la diferenciación de yemas (18).

En el Cuadro 4 aparecen los promedios de yemas cotiledonares desarrolladas en *E. berteriana*, cuando en el análisis estadístico se consideraron únicamente las dosis de BA. En estas circunstancias las cifras más altas se obtuvieron con  $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA.

Este mismo comportamiento se presentó y fue más evidente en *E. costaricensis* (Cuadros 5 y 6). Nótese

**Cuadro 4.** Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo *in vitro* de nudos cotiledonares de *E. berteriana* al considerar sólo las concentraciones de BA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Concentración de BA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Promedio de yemas (*) (núm.)
4	1.1333 (a)
2	1.0244 (a)
8	0.8723 (ab)
0	0.8043 (ab)
1	0.6136 (b)

**Nota:**

\* Diferencias entre promedios seguidos por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la Prueba de Amplitud Múltiple de Duncan al 5% de probabilidad.

que para el IBA los promedios mayores ocurrieron con los niveles de  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , mientras que para el BA se dieron con los niveles de  $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Todos los trabajos consultados concuerdan con los resultados anteriores. En cultivos de nudos de *Tamarindus indica* se logró la diferenciación de yemas múltiples al usar  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de cinctina más  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA (11).

**Cuadro 5.** Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo *in vitro* de nudos cotiledonares de *E. costaricensis* al considerar sólo las concentraciones de IBA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Concentración de IBA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Promedio de yemas (*) (núm.)
1	0.7458 (a)
0	0.6610 (a)
4	0.4211 (b)
2	0.4074 (b)

**Nota:**

\* Diferencias entre promedios seguidos por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la Prueba de Amplitud Múltiple de Duncan al 5% de probabilidad.

**Cuadro 6.** Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo *in vitro* de nudos cotiledonares de *E. costaricensis* al considerar sólo las concentraciones de BA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Concentración de BA ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Promedio de yemas (*) (núm.)
8	0.9333 (a)
4	0.8913 (a)
2	0.4255 (b)
1	0.3261 (b)
0	0.2444 (b)

**Nota:**

\* Diferencias entre promedios seguidos por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la Prueba de Amplitud Múltiple de Duncan al 5% de probabilidad.

Para *E. berteriana* no se presentó una interacción estadísticamente significativa entre el IBA y el BA. Esto indica que, para estas condiciones, los factores considerados (auxina-citocinina) actuaron independientemente. Conclusiones similares permitieron un ensayo de propagación *in vitro* de *L. leucocephala*, en el cual se utilizaron NAA y BA (8).

Para *E. costaricensis* se presentó una interacción altamente significativa entre el IBA y el BA. Puede concluirse que el efecto del BA fue diferente para cada concentración de IBA empleada. El nivel óptimo del BA dependió, en este caso, del nivel de IBA utilizado.

El mayor número promedio de yemas cotiledonares diferenciadas de *E. berteroa* se logró con concentraciones de BA que oscilaron entre 2 y 4 mg · l<sup>-1</sup>, sin que dependiera del IBA, ya que se obtuvo el mismo resultado en ausencia o en presencia de este regulador.

Para *E. costaricensis*, el mejor tratamiento para el desarrollo de yemas cotiledonares fue el que contenía 1 mg · l<sup>-1</sup> de IBA más 8 mg · l<sup>-1</sup> de BA. Upadhyaya y Chandra (24) obtuvieron la mayor cantidad de yemas adventicias en *A. lebeck* al usar 1 mg · l<sup>-1</sup> de IAA más 5 mg · l<sup>-1</sup> de cinetina en el medio de cultivo.

Sin embargo, al emplear el cultivo horizontal, con el propósito de estimular el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares y adventicias, se pudo obtener un número adecuado de explantes para comenzar la fase de multiplicación (M). Los ejes caulinares usados para este propósito se obtuvieron de la fase E, formados a partir de un ápice vegetativo o de un nudo cotiledonar.

En el Cuadro 7 se presenta el número promedio de yemas axilares desarrolladas en el cultivo horizontal, cuando se añadió 1 mg · l<sup>-1</sup> de BA al medio de cultivo.

**Cuadro 7. Número promedio de yemas desarrolladas en el cultivo horizontal de ejes caulinares de *Erythrina* spp.**

Especie	Promedio de yemas (núm.)
<i>E. poeppigiana</i>	10.0
<i>E. berteroa</i>	7.3
<i>E. costaricensis</i>	5.9
<i>E. fusca</i>	5.7

Para estimar el número aproximado de ciclos de propagación por año se determinó el tiempo (en días) que tardó en desarrollarse una yema axilar. También se contó el lapso (en días) que tardó una yema axilar en crecer hasta formar un eje caulinar, con la altura adecuada para repetir el procedimiento del cultivo horizontal (Cuadro 8). De la información presentada en el Cuadro 8 se deduce que un ciclo de propagación puede completarse en un tiempo máximo de dos meses.

**Cuadro 8. Tiempo total (d) para completar un ciclo propagación clonal (subcultivo) *in vitro* de *Erythrina* spp.**

Especie	Tiempo promedio (d) para la diferenciación de yemas	Tiempo promedio (d) para el crecimiento de yemas hasta formar ejes caulinares adecuados	Tiempo total promedio (d)
<i>E. poeppigiana</i>	31	37	67
<i>E. berteroa</i>	16	30	46
<i>E. costaricensis</i>	23	30	46
<i>E. fusca</i>	13	30	43

**Cuadro 9. Número aproximado de ciclos de propagación por año y tasa de multiplicación potencial para *Erythrina* spp.**

Especie	Ciclos por año (núm.)	Tasa de multiplicación potencial (explantes por año) (núm.)
<i>E. poeppigiana</i>	5.4	2.5 · 10 <sup>5</sup>
<i>E. berteroa</i>	7.9	6.3 · 10 <sup>6</sup>
<i>E. costaricensis</i>	7.9	1.3 · 10 <sup>6</sup>
<i>E. fusca</i>	8.5	2.7 · 10 <sup>6</sup>

En el Cuadro 9 se anotan el número aproximado de ciclos de propagación por año y las tasas de multiplicación potencial alcanzadas para cada especie de *Erythrina*.

Para que la propagación clonal *in vitro* sea ventajosa debe obtenerse un número adecuado de propágulos originados por un solo explante. La tasa de multiplicación potencial permite evaluar la eficiencia de este tipo de reproducción asexual. De acuerdo con los resultados, este valor varió con la especie de *Erythrina* (Cuadro 9).

De lo anterior se deduce que, en relación con las demás especies investigadas, *E. poeppigiana* tuvo una respuesta diferente. Sin embargo, si se compara las tasas de multiplicación alcanzadas con otras en géneros taxonómicamente afines a *Erythrina*, se nota que representan una cifra elevada. Existen estimaciones (11) sobre la posibilidad de regenerar 10 000 plantas de *T.*

*indica* por año. Trabajos hechos en *D. latifolia* permitieron concluir que es posible obtener 100 000 explantes por año (12). Se debe enfatizar que las tasas calculadas representan números teóricos que no toman en cuenta algunos factores que pueden afectar el éxito del cultivo *in vitro*.

#### CONCLUSIONES

A pesar de la diversidad encontrada en las respuestas de las diferentes especies de *Erythrina*, se puede concluir que la micropropagación rápida es factible en este género. Al intentar utilizar árboles maduros del campo como materia prima para los explantes, es de esperar que la fase de establecimiento sea bastante problemática debido a las altas tasas de oxidación y contaminación. Una vez obtenidos los cultivos asépticos, sea a partir de semilla o de partes vegetativas de plantas ya establecidas, el método de cultivo horizontal es el más adecuado para la obtención de un número grande de plantas.

#### LITERATURA CITADA

- BIONDI, S.; THORPE, T.A. 1982. Clonal propagation of forest tree species. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings A.N. Rao (Ed.) Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 197-204.
- BONGA, J.M. 1982. Tissue culture techniques. In Tissue culture in forestry. J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds.). La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 4-35.
- BONGA, J.M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In Tissue culture in forestry. J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds.). La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 387-412.
- BROWN, C.L.; SOMMER, H.E. 1982. Vegetative propagation of dicotyledonous trees. In Tissue culture in forestry. J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds.). La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 109-149.
- DATTA, S.K.; DATTA, K.; PRAMANIK, T. 1983. *In vitro* clonal multiplication of mature trees of *Dalbergia sissoo* Roxb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2(1):15-20.
- DHAWAN, V.; BHOJWANI, S.S. 1985. *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Plant Cell Reports 4:315-318.
- GOYAL, Y.; ARYA, H.C. 1981. Differentiation in cultures of *Prosopis cineraria* Linn. Current Science 50(10):468-469.
- GOYAL, Y.; BINGHAN, R.L.; FELKER, P. 1985. Propagation of the tropical tree *Leucaena leucocephala* K67, by *in vitro* bud culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 4(1):3-10.
- HARMS, C.T.; BAKTIR, I.; OERILI, J.J. 1983. Clonal multiplication *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris*) by adventitious shoot formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2(2):93-102.
- KESTER, D.E. 1982. The clone in horticulture. Hort-Science 18(6):831-837.
- MASCARENHAS, A.F.; GUPTA, P.K.; KULKARNI, V.M.; MEHTA, U.; IYER, R.S.; KHUSPE, S.S.; JAGANNATHAN, V. 1982. Propagation of trees by tissue culture. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings A.N. Rao (Ed.). Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 175-179.
- MASCARENHAS, A.F.; HAZARA, S.; POTDAR, U.; KULKARNI, D.K.; GUPTA, P.K. 1982. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings A.N. Rao (Ed.). Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 719-720.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3):473-497.
- PEASLEY, E.L.; COLLINS, G.B. 1980. Development of an *in vitro* culture system for *Leucaena*. Leucaena Newsletter (Taiwan) 1:54.
- RAO, A.N.; LEE, S.K. 1982. Importance of tissue culture in tree propagation. In International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture (5., 1982, Tokyo) Proceedings. A. Fujiwara (Ed.). Tokyo, Japanese Association for Plant Tissue Culture. p. 715-718.
- RAO, A.N.; LEE, S.K. 1986. *In vitro* studies on trees of humid tropics. In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6., 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 14.
- RAVISHANKAR, G.A.; AMRITA WALI; GREWAL, S. 1983. Plantlet formation through tissue cultures of *Leucaena leucocephala*. Leucaena Research Reports (Taiwan) 4:37.
- REGULATING GROWTH and development: The plant hormones. 1976. In Raven, P.H., Evert, R.F., Curtis, H. (Eds.). Biology of Plants 2 ed. New York, Worth. p. 483-496.
- SKIRVIN, R.M. 1981. Fruit crops. In Cloning Agricultural Plants via *in vitro* Techniques. B.V. Conger (Ed.). Boca Raton, Florida, CRC. p. 51-139.
- SONDHAL, M.R.; SHARP, W.R.; EVANS, D.A. 1984. Applications for agriculture: The potential for the Third World. ATAS Bulletin (EE.UU.) 1:14-20.

21. SWEET, H.C.; BOLTON, W.E. 1979. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. *American Journal of Botany* 66(6):692-698.
22. THOMAS, V.; MEHTA, A.R. 1983. Effect of phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree cultures grown *in vitro*. In Symposium on Plant Cell Culture in Crop Improvement (1981, Calcuta, India). Proceedings. S.K. Sen, K.L. Giles (Eds.). New York, Plenum. p. 451-457.
23. TOMAR, U.K.; GUPTA, S.C. 1986. Organogenesis and somatic embryogenesis in leguminous trees (*Albizia* spp.). In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6., 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 41.
24. UPADHYAYA, S.; CHANDRA, N. 1983. Shoot and plantlet formation in organ and callus cultures of *Albizia lebbek* Benth. *Annals of Botany* 52(3):421-424.