

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA

ÁREA DE POSGRADO

ORGANOGENESIS IN VITRO EN ESPECIES FORESTALES PROMISORIAS DEL TROPICO.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

por

LISSETTE VALVERDE CERDAS

CATIE
Turrialba, Costa Rica
1992

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



Magali Dufour, PhD.
Profesor Consejero

Assefaw Tewelde, PhD.
Jefe, Area de Posgrado

Ramón Lastra, PhD.
Director, Programa de Enseñanza



Lissette Valverde Cerdas
Candidato

DEDICATORIA

A todo lo que significó para mis padres,
hermanos y hermanas

Que elija una sola estrella quien quiera ser sembrador

A. Yupari

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Víctor Villalobos Ph.D. por su apoyo, confianza para la realización de este trabajo, así como por sus sugerencias en la revisión del mismo.

A Nelly Vázquez Msc. por su valiosa orientación y colaboración con el estudio histológico.

A la directora de tesis Magaly Dufour Ph.D. y Rodolfo Salazar Ph.D. por las sugerencias brindadas en la revisión de este trabajo.

A Ana Abdelnour Msc. por su apoyo y amistad.

Al personal de la Unidad de Biotecnología por su aporte y al Programa I que financió la realización de este estudio.

Al personal de la Unidad de Informática del CATIE por su anuente colaboración, y a aquellas personas que de alguna forma intervinieron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

Resumen	ix
Summary	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Cuadros	xv
Abreviaciones	xviii
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	5
2.1. Características generales de las especies en estudio	5
2.1.1. <i>Albizia guachapele</i>	5
2.1.2. <i>Cedrella odorata</i>	5
2.1.3. <i>Phitecellobium saman</i>	5
2.1.4. <i>Swietenia macrophylla</i>	6
2.2. Propagación vegetativa y las especies forestales	6
2.3. Propagación vegetativa <u>in vitro</u>	7
2.4. Propagación vegetativa <u>in vitro</u> de especies forestales	8
2.4.1. Historia del cultivo de tejidos en especies forestales	8
2.4.1.1. Angiospermas	9
2.4.2. Multiplicación <u>in vitro</u> de especies forestales	10
2.4.2.1. Regeneración a partir de brotes preexistentes	10
2.4.2.2. Organogénesis	12
2.4.2.3. Embriogénesis somática	15
3. MATERIALES Y METODOS	18
3.1. Localización	18
3.2. Material experimental	18
3.3. Desinfección	18
3.4. Inoculación	18
3.5. Inducción de la organogénesis	19
3.5.1. Organogénesis en <i>Albizia guachapele</i>	19
3.5.2. Organogénesis en <i>Cedrella odorata</i>	19
3.5.3. Organogénesis en <i>Swietenia macrophylla</i>	20
3.5.4. Organogénesis en <i>Pithecellobium saman</i>	20

3.5.4.1.	Inducción de los brotes adventicios	20
3.5.4.2.	Influencia de la edad del explante en la inducción de la organogénesis	20
3.5.4.3.	Influencia de la sección proximal, intermedia y distal del hipocotilo sobre la capacidad organogenética	20
3.5.4.4.	Influencia de la posición del explante sobre la inducción de brotes	22
3.5.4.5.	Efecto del período de exposición de los explantes a la bencil adenina (BA)	22
3.6.	Desarrollo de los brotes adventicios de <i>P. saman</i> <i>saman</i>	22
3.6.2.	Efecto de la concentración de carbón activado sobre el desarrollo de los brotes adventicios	22
3.6.3.	Efecto de la concentración de ácido giberélico (GA ₃) sobre el desarrollo de los brotes adventicios	22
3.7.	Enraizamiento de las plántulas de <i>P. saman</i> originadas a partir de organogénesis	23
3.7.1.	Medio de cultivo	23
3.7.2.	Efecto de la concentración y del período de exposición al AIB, en el desarrollo de las raíces.	23
3.8.	Crecimiento en el invernadero de las plantas provenientes de organogénesis	23
3.9.	Estudio Histológico	24
3.9.1.	Pasos involucrados en el origen y la formación de los brotes <u>de novo</u> en <i>P. saman</i> <i>saman</i>	24
3.9.2.	Formación, origen y desarrollo de la raíz en las plantas de <i>P. saman</i> originadas por organogénesis.	25
3.10.	Análisis estadístico	25
3.10.1.	Inducción de los brotes adventicios	25
3.10.2.	Desarrollo de los brotes adventicios de <i>P. saman</i>	26
3.10.3.	Enraizamiento de las plántulas de <i>P. saman</i> <i>saman</i> originadas a partir de organogénesis	27
3.10.4.	Crecimiento en el invernadero de las plantas de <i>P. saman</i> provenientes de organogénesis	27

4.	RESULTADOS	28
4.1.	Organogénesis en <i>Albizia guachapele</i>	28
4.1.1.	Origen de los brotes adventicios	30
4.2.	Organogénesis en <i>Cedrella odorata</i>	30
4.2.1.	Origen de los brotes adventicios	32
4.3.	Organogénesis en <i>Swietenia macrophylla</i>	32
4.3.1.	Origen de los brotes adventicios	37
4.4.	Organogénesis en <i>Pithecellobium saman</i>	39
4.4.1.	Inducción de los brotes adventicios	41
4.4.2.	Influencia de la edad del explante en la inducción de la organogénesis	44
4.4.3.	Influencia de la sección proximal intermedia y distal del hipocotilo sobre la capacidad organogenética	46
4.4.4.	Influencia de la posición del explante sobre la inducción de brotes adventicios	48
4.4.5.	Efecto del periodo de exposición de los explantes a la BA	50
4.4.6.	Origen y eventos asociados con la formación de los brotes adventicios	50
4.5.	Desarrollo de los brotes adventicios de <i>P. saman</i>	54
4.5.1.	Efecto de la concentración de carbón activado sobre el desarrollo de los brotes adventicios	54
4.5.2.	Efecto de la concentración de GA ₃ sobre el desarrollo de los brotes adventicios	54
4.6.	Enraizamiento <u>in vitro</u> de las plántulas de <i>P. saman</i> originadas por organogénesis	57
4.6.1.	Efecto de la concentración y del periodo de exposición al AIB, en el desarrollo del sistema radicular.	57
4.6.2.	Origen y eventos involucrados con la formación de la raíz.	59
4.7.	Comportamiento en el invernadero de las plantas de <i>P. saman</i> provenientes de cultivo <u>in vitro</u>	61
5.	DISCUSION	66
5.1.	Inducción de la organogénesis	66
5.2.	Eventos anatómicos asociados con la formación de los brotes adventicios	69
5.3.	Organogénesis en <i>Phitecellobim saman</i>	70
5.3.1.	Influencia de la edad del explante en la inducción de la organogénesis	70
5.3.2.	Influencia de la parte proximal, intermedia y distal del explante de	

	hipocotilo de <i>P. saman</i> sobre la capacidad organógena	71
5.3.3.	Influencia de la posición del explante de <i>P. saman</i> sobre la inducción de brotes adventicios.	72
5.3.4.	Efecto del período de exposición de los explantes de <i>P. saman</i> a la BA	73
5.4.	Desarrollo de los brotes adventicios de <i>P. saman</i>	74
5.4.1.	Efecto de la concentración del carbón activado sobre el desarrollo de los brotes adventicios de <i>P. saman</i>	74
5.4.2.	Efecto de la concentración de GA ₃ sobre el desarrollo de los brotes adventicios	75
5.5.	Enraizamiento de los brotes adventicios de <i>P. saman</i>	76
5.5.1.	Efecto del período de exposición y la concentración de AIB sobre el enraizamiento de brotes adventicios	76
5.5.2.	Eventos anatómicos asociados con la formación de las raíces adventicias	77
5.6.	Crecimiento de las plantas de <i>P. saman</i> en el invernadero	77
5.7.	Etapas en la propagación <u>in vitro</u> para <i>P. saman</i> a partir de explantes de hipocotilo	78
5.8.	Perspectivas de la micropropagación en especies forestales	79
6.	CONCLUSIONES	80
7.	RECOMENDACIONES	82
8.	LITERATURA CITADA	83
9.	APENDICE	95

Valverde, C. Ma. L. 1992. Organogénesis in vitro en especies forestales promisorias del trópico. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 107p.

Palabras claves: *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata*, *Swietenia macrophylla*, *Phitecellobium saman*, organogénesis, brotes adventicios, caulogénesis, plantas somáticas, plantas de semilla botánica.

Resumen

La investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE, de setiembre de 1991 a setiembre de 1992. El objetivo general del trabajo fue establecer una metodología de propagación in vitro para *A. guachapele*, *C. odorata*, *S. macrophylla* y *P. saman*.

Todas las especies respondieron organogenéticamente a la presencia de BA en el medio de cultivo. Cedro requirió la presencia de una auxina como ANA para expresar una respuesta morfogénica.

Los brotes adventicios se originaron del parénquima de la corteza. En cenizaro, los brotes adventicios también se pueden originar de callo.

La inducción de brotes en cenizaro fue afectada por la edad del explante, la posición del explante, la sección del hipocotilo utilizada como explante y el período de exposición a la BA. Se logró los mejores resultados con explantes de 5 y 10 días después de la germinación, en posición horizontal y expuestos por siete días a un medio de cultivo con 26.6 μ M de BA. La sección proximal e intermedia del hipocotilo mostraron la mayor respuesta organógena.

El desarrollo de los brotes fue favorecido por incrementos en la concentración de carbón activado en el medio de cultivo. Contrariamente, el GA₃ no mostró efecto sobre el desarrollo de brotes.

El porcentaje de enraizamiento de los brotes disminuyó cuando fueron expuestos por más de 24 horas al AIB. Las concentraciones de AIB estudiadas, no mostraron diferencias estadísticas significativas a un nivel de significancia del 5%. Las plantas en condiciones de invernadero mostraron un comportamiento idéntico a las de semilla botánica tanto en su parte aérea como en su sistema radical. En las plantas de origen somático la raíz adventicia se originó a partir del cambium vascular.

Valverde, C. Ma. L. 1992. In vitro organogenesis of promising tropical forest tree species. Thesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 107 p.

Key words: *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata*, *Swietenia macrophylla*, *Phitecellobium saman*, organogenesis, adventitious shoots, callus, somatic plants, botanical seed-plant

Summary

The research took place at the Tissue Culture Laboratory of the Biotechnology Unit, CATIE, from september 1991 to september 1992. The general objective of the study was to establish a methodology for in vitro propagation for *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata*, *Phitecellobium saman* y *Swietenia macrophylla*.

All tested species responded organogenetically to the presence of BA in the culture medium. *Cedrella odorata* required the presence of auxin (ANA) to respond morphogenetically.

Adventitious shoots originated from the cortex parenchyma. In *Phitecellobium saman*, adventitious shoot can also be originated from callus.

Shoot induction in *P. saman* was affected by explants age and position, section of hypocotyl used and period to BA exposure.

The best results were obtained with explants of 5 and 10 días after germination, horizontal position and 7 day-incubation period on BA. Proximal and intermedial sections of hypocotyl showed the highest organogenic response.

Shoot development was favored by increases in activated charcoal concentration in the culture medium. Contrary, GA₃ did not showed effect on shoot development. Percentaje rooting decreased when shoots were exposed more than 24 hours to AIB. Concentration of AIB tested did not show statistical differences at significanse of 5%. Somatical plant in the greenhouse behaved similar to plants obtained from botanical seeds, taking into account aereal and radical systems. The adventitious root of somatic plants originated from vascular cambium

Lista de Figuras

En el texto

	página
Figura 1. Sección de hipocotilo de <i>P. saman</i> empleado como explante en el cual se observa su extremo proximal y distal	21
Figura 2. Secciones de hipocotilo de una plántula de <i>P. saman</i> en las que se muestra el explante proximal, central y distal	21
Figura 3. Efecto de la concentración de BA sobre el porcentaje de explantes con brotes y promedio de brotes en <i>A. guachapele</i>	29
Figura 4. Efecto de la concentración de BA sobre el número de brotes adventicios y brotes desarrollados en <i>A. guachapele</i>	29
Figura 5. Parte aérea de una plántula de <i>A. guachapele</i> (A), Corte histológico mostrando el desarrollo de un primordio de brote (B) y Sección transversal de una protuberancia mostrando centros de tejido vascular (C)	31
Figura 6. Protuberancias globulares observadas en uno de los extremos de los explantes de <i>Cedrella odorata</i> (A), Parte aérea de una plántula formada <u>de novo</u> (B), Corte longitudinal de un brote adventicio en el que se observa la conexión vascular con el explante (C) y Secciones transversales de las protuberancias que muestran centros vasculares desordenados (D)	34
Figura 7. Efecto de la concentración de BA en la inducción de brotes adventicios de <i>Swietenia macrophylla</i>	36
Figura 8. Brotes múltiples formados <u>de novo</u> en <i>S. macrophylla</i> (A), Desarrollo de yemas preexistentes (B), Parte aérea de una plántula formada <u>de novo</u> (C), Corte longitudinal de un brote (D) y Corte transversal de una protuberancia (E)	38

Figura 9.	Fotografía de microscopio electrónico mostrando el desarrollo de brotes adventicios de <i>P. saman</i> en un extremo del explante (A), Formación de brotes adventicios (B) y Parte aérea de una plántula o brote desarrollado (C)	40
Figura 10.	Efecto de la concentración del medio MS sobre el número de brotes adventicios (A), El promedio de brotes por explante (B) y el Número de brotes desarrollados (C) en explantes de <i>P. saman</i>	42
Figura 11.	Número de brotes adventicios de <i>P. saman</i> con un MS al 25% (A), 50% (B), 75% (C) y 100% (D).	43
Figura 12.	Efecto de la edad del explante de <i>P. saman</i> sobre el porcentaje de explantes con brotes y promedio de brotes por explante	45
Figura 13.	Efecto de la edad del explante de <i>P. saman</i> sobre el número de brotes adventicios, brotes desarrollados y vitrificados	45
Figura 14.	Efecto de la sección de hipocotilo sobre el porcentaje de explantes con brotes y el promedio de brotes en <i>P. saman</i>	47
Figura 15.	Efecto de la sección de hipocotilo sobre el número de brotes adventicios y brotes desarrollados en <i>P. saman</i>	47
Figura 16.	Efecto de la posición del explante sobre el porcentaje de brotes por explante y el promedio de brotes en <i>P. saman</i>	49
Figura 17.	Efecto de la posición del explante sobre el número de brotes adventicios y de brotes desarrollados en <i>P. saman</i>	49
Figura 18.	Efecto del período de exposición de los explantes a la BA sobre el porcentaje de explantes con brotes y promedio de brotes en <i>P. saman</i>	51

Figura 19.	Efecto del período de exposición a la BA sobre el número de brotes adventicios y brotes desarrollados en <i>P. saman</i>	51
Figura 20.	Corte longitudinal de explante de hipocotilo de <i>P. saman</i> (A), Estructura polarizada en la que se observa células en actividad meristemática y centros vasculares en formación (B), y Brote bien diferenciado donde se observa claramente sus primordios foliares (C)	53
Figura 21.	Crecimiento de brotes adveticios de <i>P. saman</i> en presencia de carbón activado (A) y En ausencia de éste (B)	55
Figura 22.	Efecto de la concentración de carbón activado sobre el número de hojas formadas en brotes adventicios de <i>P. saman</i>	56
Figura 23.	Desarrollo de brotes adventicios de <i>P. saman</i> en presencia de GA ₃	58
Figura 24.	Efecto del período de exposición al AIB sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes adventicios de <i>P. saman</i>	60
1		
Figura 25.	Porcentaje de enraizamiento de brotes adventicios de <i>P. saman</i> en diferentes concentraciones y período de exposición a AIB	60
Figura 26.	Brotes de <i>P. saman</i> enraizados con AIB (A) Sección transversal de tallo de una plántula (B), Primordios radicales (C), Raiz bien formada la cual presenta su propio tejido vascular (D)	62
Figura 27.	Crecimiento en altura y diámetro del tallo en plantas de cultivo de tejidos (CT) y de semilla botánica (SB) de <i>P. saman</i> en condiciones de invernadero a los tres meses de edad	64
Figura 28.	Número de hojas promedio en plantas de cultivo de tejidos (CT) y de semilla botánica de <i>P. saman</i> en condiciones de invernadero a los 3 meses de edad	64

Figura 29. Plantas de *P. saman* provenientes de cultivo in vitro a los 3 meses (A) y 4 meses de edad (B) y Plantas de semilla botánica a los 3 meses de edad (C), Ambas plantas con nódulos en sus raíces (D)65

Lista de Cuadros

En el texto

	página
Cuadro 1. Efecto de la concentración de BA y ANA en la organogénesis de <i>C. odorata</i>	33
Cuadro 2. Efecto de la concentración de BA y ANA en la inducción de brotes adventicios de <i>Cedrella odorata</i>	33
En el apéndice	95
Cuadro 1A. Composición del medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) más suplementos empleados para inducir organogénesis en explantes de especies arbóreas	96
Cuadro 2A. Técnica de deshidratación empleada para el estudio histológico de los brotes adventicios y la raíz	97
Cuadro 3A. Análisis de varianza para la inducción de brotes adventicios en <i>A. guachapele</i>	98
Cuadro 4A. Análisis de varianza para la inducción de brotes adventicios en <i>S. macrophylla</i>	98
Cuadro 5A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración del medio y la concentración de BA sobre la inducción de brotes adventicios en <i>P. saman</i>	99

Cuadro 6A.	Medias y coeficientes de variación para el efecto de la concentración del medio MS sobre la inducción de brotes adventicios en <i>P. saman</i>	99
Cuadro 7A.	Medias y error estándar para el número de brotes adventicios en la interacción concentración de BA*concentración del medio en explantes de hipocotilo de <i>P. saman</i>	100
Cuadro 8A.	Análisis de varianza para el efecto de la edad del explante de <i>P. saman</i> sobre la inducción de brotes adventicios	101
Cuadro 9A.	Valores y coeficientes de variación para el efecto de la edad del explante de <i>P. saman</i> sobre la inducción de brotes adventicios	101
Cuadro 10A.	Análisis de varianza para el efecto de la sección de hipocotilo empleada como explante sobre la inducción de brotes adventicios en <i>P. saman</i>	102
Cuadro 11A.	Valores y coeficiente de variación para el efecto de la sección del explante sobre la inducción de brotes adventicios en <i>P. saman</i>	102
Cuadro 12A.	Análisis de varianza para el efecto de la posición de los explantes sobre la inducción de brotes adventicios en <i>P. saman</i>	103
Cuadro 13A.	Valores y coeficientes de variación para el efecto de la posición del explante sobre la inducción de brotes adventicios en <i>P. saman</i>	103
Cuadro 14A.	Análisis de varianza para el efecto del período de exposición de los explantes de hipocotilo de <i>P. saman</i> a la BA ...	104
Cuadro 15A.	Valores y coeficientes de variación para el efecto del período de exposición de los explantes de <i>P. saman</i> a la BA ...	104

Cuadro 16A.	Análisis de varianza para el efecto de la concentración de carbón activado sobre el desarrollo de brote adventicios de <i>P. saman</i>	105
Cuadro 17A.	Medias del número de hojas y coeficientes de variación para el efecto de la concentración de carbón activado sobre el desarrollo de brotes adventicios de <i>P. saman</i>	105
Cuadro 18A.	Análisis de varianza para el efecto de la concentración y el periodo de exposición al AIB sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes adventicios de <i>P. saman</i>	106
Cuadro 19A.	Porcentajes de enraizamiento en las diferentes concentraciones de AIB y diferentes periodos de exposición a éste en brotes adventicios de <i>P. saman</i> ...	106
Cuadro 20A.	Análisis de varianza para el crecimiento de las plantas provenientes de cultivo <u>in vitro</u> y de semilla botánica de <i>P. saman</i> en condiciones de invernadero a los tres meses de edad	107
Cuadro 21A.	Medias y coeficientes de variación para altura, diámetro del tallo y número de hojas en plantas de cultivo <u>in vitro</u> y de semilla botánica de <i>P. saman</i> en condiciones de invernadero a los tres meses de edad	107

Abreviaciones

AIB: ácido 3-indol-butírico

BA: 6-bencil-aminopurina

GA₃: ácido giberélico

ABA: ácido abscísico

ANA: ácido naftalen-acético

mm: milímetros

cm: centímetros

1. INTRODUCCION

El bosque tropical constituye aproximadamente un tercio de las áreas boscosas del mundo y contiene 80% del total de la vegetación de la tierra (Flores, 1985). Cerca de un tercio de esos bosques se localizan en América Latina donde el 40% de los bosques primarios se han perdido por actividades del hombre (Webb y Villalobos, 1978). La mayor parte de la deforestación en América Central está dirigida hacia las tierras con bosque tropical lluvioso; por ejemplo, se calcula que las tasas de deforestación en las zonas bajas de Nicaragua, Honduras y Costa Rica alcanza valores entre 3.6% y 3.9% anual, lo que representa pérdidas de hasta 1000 km² por año (CCAD, 1991).

En los bosques latifoliados la explotación se concentra en pocas especies (alrededor de 20 en cada país); con predominio de unas pocas maderas de color, de alto valor en el mercado internacional (*S. macrophylla*, *C. odorata*, *E. cyclocarpum*, *Dalbergia spp.* y otras) o especies relativamente abundantes en asociaciones edáficas especiales (CCAD, 1991).

A fin de plantear alternativas de solución para satisfacer la creciente demanda de productos forestales, se requiere establecer plantaciones. Sin embargo, uno de los problemas principales que enfrentan quienes se dedican a la reforestación, es que no existe semilla suficiente, ni en cantidad ni calidad para satisfacer la demanda. Por interés comercial o falta de experiencia, esta escasez ha llevado al uso de semilla de calidad genética poco deseable. Como resultado, es frecuente encontrar plantaciones con alto grado de variación en diferentes características fenotípicas como: forma de los árboles, poda natural y rendimiento (Salazar y Boshier, 1989).

El problema anterior es más crítico para las especies nativas de América Tropical, ya que no se cuenta con los rodales apropiados para la producción de semilla, las cuales son colectadas en la mayoría de las veces de cualquier árbol. Al tratarse de especies de largo ciclo vegetativo, el resultado de seleccionar semilla inadecuada se podrá percibir una vez que el árbol ha alcanzado su madurez, lo cual trae como consecuencia pérdidas económicas y desestímulo para el establecimiento de plantaciones forestales. En el caso de especies exóticas, las semillas también son colectadas de rodales pequeños, sin haber realizado previamente pruebas de procedencia a fin de identificar fuentes de germoplasma. Con frecuencia, los árboles mal formados y con características maderables pobres son los que producen la semillas para futuras plantaciones debido al sistema de selección negativa (los árboles superiores son cortados para su procesamiento industrial) o porque su acceso es más fácil (Villalobos et al., 1983).

La mayoría de las especies forestales se reproducen sexualmente por polinización abierta, lo que mantiene una continua variación de muchos caracteres en las subsecuentes generaciones. Las características deseables podrían conservarse en la progenie si estos árboles se propagan vegetativamente o en forma clonal (Hartman y Kester, 1975). Esto podría ser altamente ventajoso para la explotación completa del mejoramiento en árboles, debido a que permite la multiplicación idéntica de los mejores individuos de las mejores familias en los programas convencionales de mejoramiento (Franclet, 1989).

Aunque se han logrado avances en el desarrollo de algunos métodos para la propagación vegetativa de muchas especies arbóreas, esto no ha sido posible en algunas especies forestales de gran importancia. Actualmente, se pueden obtener clones de varias especies, tanto de gimnospermas como

angiospermas, pero la tasa de multiplicación en algunos es baja y de lento crecimiento (George y Sherrington, 1984).

Las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen gran potencial para la multiplicación de especies forestales así como ayuda a los métodos tradicionales de mejoramiento genético forestal, particularmente en el área de evaluación de genotipos con respecto a tasas de crecimiento, resistencia a enfermedades y tolerancia a la sequía. Además, estos métodos pueden ayudar a explorar mutaciones espontáneas y características cuantitativas las cuales no pueden obtenerse por métodos sexuales.

La principal ventaja de usar cultivo de tejidos es su potencial para la producción a gran escala de individuos superiores o árboles plus. Como ya se indicó la ventaja comparativa de las técnicas de propagación in vitro comparativamente con los sistemas de propagación vegetativa convencional es muy grande; mientras una estaca enraizada produce una planta, la técnica más limitada en cultivo de tejidos puede producir varias yemas así como brotes adventicios; las cuales pueden ser inducidas a formar brotes adventicios y/o axilares adicionales, en unas pocas semanas o meses (Biondi y Thorpe, 1982, Villalobos et al., 1984).

Tomando en consideración lo anterior, este trabajo se planteó con el objetivo de establecer un sistema de propagación in vitro para algunas especies maderables tropicales como *Albizia guachepele*, *Cedrella odorata*, *Phitecellobium saman* y *Swietenia macrophylla*.

Como objetivos específicos se propuso:

- Inducir la formación de brotes por medio de organogénesis a partir de tejido juvenil.
- Establecer condiciones in vitro e in vivo óptimas para la regeneración y desarrollo de las plantas micropropagadas.
- Determinar histológicamente los eventos morfogénicos de esta ruta de diferenciación.

- Plantear una alternativa que ayude a rescatar especies maderables nativas en peligro de extinción.

Se probará con este estudio que las especies forestales del trópico pueden ser propagadas in vitro y que mediante esta método de propagación se puede recuperar la variabilidad genética existente.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Características generales de las especies en estudio

2.1.1. *Albizia guachapele* (guayaquil)

Fam.: Fabaceae

Se encuentra en forma natural desde México hasta Venezuela y el Caribe. Es un árbol de porte mediano a grande, deciduo y de crecimiento mediano. Es capaz de desarrollarse en sitios degradados, compactados y secos. Su madera es rojiza, pesada y atractiva. Es una leñosa fijadora de nitrógeno y en Costa Rica está en peligro de extinción.

Se propaga por semilla. En el CATIE, los intentos que se han hecho para regenerar esta especie por medio de pseudo-estacas han mostrado resultados muy variables (Proyecto MGF, CATIE, comunicación personal).

2.1.2. *Cedrella odorata* (cedro)

Fam.: Meliaceae

El cedro es originario de los bosques húmedos de América, desde México hasta el Amazonas pasando por las Antillas.

Es un árbol grande que puede alcanzar hasta un metro de diámetro y 35 m de altura. Las hojas son grandes, compuestas de 5 a 11 pares de foliolos. La madera preciosa se asemeja a la caoba.

Se propaga por semillas, las cuales conservan hasta por un año su poder germinativo, y por pseudo-estacas.

2.1.3. *Phitecellobium saman* (cenízaro)

Fam.: Fabaceae

El cenízaro es originario de América desde el sur de México hasta Brasil incluyendo Perú y Bolivia.

Es un árbol de 20 a 45 m de alto, con una copa muy extendida que puede abarcar más de 55 m en diámetro. Las ramas

horizontales alcanzan tamaños gigantes. Las hojas de 25 a 35 cm de largo, tienen 2 a 6 pares de pinas, cada una con 6-16 pares de hojuelas. La madera de color rojizo toma un aspecto muy atractivo al ser pulida. Aparentemente responde bien en suelos vertisoles comparada con otras especies.

Su forma de propagación es por semilla.

2.1.4. *Swietenia macrophylla* (caoba)

Fam.: Meliaceae

Originaria de los bosques húmedos desde el sur de México hasta la cuenca del Amazonas.

Es un árbol que alcanza hasta 50 m de altura con tronco corto y copa redonda. Las hojas se componen de 6-12 hojuelas. La madera de caoba es considerada como una de las mejores del mundo y más cotizadas, es de color rojizo, rosado o amarillento. En Costa Rica, esta especie se encuentra en vías de extinción.

Se propaga por semilla. Es una especie de crecimiento rápido: 1.80 m el primer año y hasta 15 m en 6-7 años en sitios favorables.

2.2. Propagación vegetativa y las especies forestales

Los programas avanzados de mejoramiento genético, necesitan de continuidad y estabilidad lo cual es un problema para especies forestales grandes y de vida larga. No obstante, las ganancias pueden obtenerse en poco tiempo, por simple selección de los mejores árboles con base en su apariencia y su multiplicación para las próximas generaciones (Khuspe *et al.*, 1987; Leakey *et al.*, 1987 citados por Ledig, 1989).

Las plantas propagadas clonalmente producen semilla de calidad uniformemente superior, mejoran la evaluación de progenies en los experimentos de mejoramiento y muestran

mejor vigor y calidad. Adicionalmente, muchos patógenos se eliminan durante la propagación clonal (Vasil y Vasil 1980).

EL enraizamiento de estacas y el injerto son los métodos vegetativos más utilizados en la propagación de especies forestales pero; para éste último el costo de propagación es muy elevado y está reservado para el establecimiento de huertos semilleros (Leakey, 1985; Franclet, 1989).

Muchos árboles tropicales han presentado problemas en su propagación vegetativa (Dyson, 1981; Roche et al., 1989; citados por Leakey et al., 1990) y aún más, en algunas de ellas no se ha estudiado su forma de propagación asexual (Leakey, 1990).

Thorpe y Biondi (1983), mencionan que en la mayoría de los árboles, la propagación por estacas con frecuencia se caracteriza por una pérdida rápida de la capacidad de enraizamiento de las estacas cuando aumenta la edad del árbol. Al respecto, Girouard (1974), señaló que la velocidad y el porcentaje de enraizamiento, el número y la longitud de la raíz, la sobrevivencia y el crecimiento en/y después del año disminuyen, particularmente, cuando la planta madre tiene más de 10 años.

2.3. Propagación vegetativa in vitro

La micropropagación se define como el procedimiento aséptico que involucra la manipulación de órganos de plantas capaces de derivar todos los procesos sexuales y de propagación vegetativa como cuando se practica convencionalmente (Hartman y Kester, 1975). Esta forma de propagación clonal está basado en el principio de totipotencia, el cual está inherente en la teoría celular de Schleiden y Schwann (Vasil y Vasil, 1980).

La propagación vegetativa in vitro puede presentar enormes ventajas para obtener altas tasas de multiplicación de plantas a partir de segmentos de tejidos; control de gran

número de individuos en espacios reducidos, conservación de germoplasma e intercambio internacional del mismo (Villalobos *et al.*, 1991). Además, podría ser muy importante para la propagación rápida de genotipos excepcionales, así como para la distribución y transporte de plantas seleccionadas, libres de patógenos, eliminando el riesgo de introducción de enfermedades (Snoeck, 1985). Franclet (1989), indicó que algunos frutales pueden ser propagados y liberados de virus a través de este método de multiplicación, en el cual se combina el efecto del meristema y la termoterapia.

Otra ventaja de esta forma de propagación es que presenta grandes posibilidades para estudios básicos del metabolismo vegetal, la diferenciación celular, la fisiología de la planta y el mejoramiento genético.

2.4. Propagación vegetativa in vitro de especies forestales

La regeneración in vitro de plantas es común entre angiospermas. Sin embargo, la mayoría de las especies de angiospermas estudiadas son herbáceas y de importancia hortícola con unas cuantas especies forestales, y en muchas de ellas, la propagación vegetativa es común en la naturaleza. En general, las especies leñosas o arbóreas; de angiospermas y gimnospermas, han presentado dificultades para cultivarlas y regenerarlas (Vasil y Vasil, 1980).

2.4.1. Historia del cultivo de tejidos en especies forestales

El cultivo de tejidos en especies forestales se inició con el trabajo de Gautheret cuando éste en 1934 publicó su estudio en el desarrollo de un callo sobre porciones de tejido cambial de *Salix capraea* y *Populus nigra*. Ball (1950), describió la obtención de yemas adventicias y tallos con hojas in vitro de *Sequoia sempervirens* pero no obtuvo la formación de plantas completas. Tulecke (1957-1960), cultivó

haploides con polen de gimnospermas y, Melchers y Bergman (1959), hicieron lo mismo en angiospermas abriendo nuevas perspectivas de aplicación al ámbito forestal.

En 1974, se publican resultados de la regeneración de plantas a partir de cultivo in vitro de algunas especies arbóreas como *Populus nigra* y *P. canescens* (Chalupa, 1974), *Ulmus americana* (Durzan y Lopusshanski, 1975), y en *Pinus palustris* (Sommer y Brown, 1974; Sommer et al., 1975) por enraizamiento de tallos procedentes de yemas adventicias generadas sobre segmentos de hipocotilo. Chalupa y Durzan (1973) cultivaron células y agregados celulares de callo de *Picea abies* que formaron embriones somáticos pero no se desarrollaron. Durzan y Chalupa (1975) con *Pinus banksiana* obtuvieron pequeñas estructuras de carácter embriode. Cheng (1975) logró la formación de plantas de *Pseudotsuga douglassi* y Campbell y Durzan (1976) de *Picea glauca*.

2.4.1.1. Angiospermas

Los primeros resultados satisfactorios de la obtención de plantas arbóreas in vitro en angiospermas fueron publicados por Winton (1968), quien trabajando con *Populus tremuloides*, obtuvo la primera planta in vitro. En 1969, Aneja y Atal trabajando con *Eucalyptus citriodora* obtienen un callo a partir de lignotubérculos y consiguen regenerar plantas completas. Berbee et al., (1972), lograron la formación de individuos a partir de callo en *Populus euramericana*, *P. deltoides* y *P. nigra*. Chalupa (1974) lo logra con *Populus canescens*, *P. nigra* y *P. tremula*.

Huhtinen y Yahyaoglu (1974) y Huhtinen (1978), indujo la formación de tallos adventicios a partir de porciones de tallo juvenil de *Betula*, que separados del explante fueron enraizados y transplantados con éxito a tierra. Cresswell y Nitsch (1975) logran la clonación de *E. grandis*, usando segmentos nodales juveniles, en los que se activan, alargan y

enraizan las yemas axilares. Lakshmisita (1979), obtiene plantas de *E. citriodora* a partir de callo formado sobre tallo de hipocotilo y sobre cotiledones. Posteriormente, se obtuvieron respuestas organogénicas en especies como: *Salix babilonica* (Fevre, 1981), *Morus alba* (Oka y Dhima, 1981) y *Tectona grandis* (Gupta et al., 1980). Barker et al., (1977) y De Fossard y Barker (1978), logran propagar individuos adultos de *Eucalyptus ficifolia*, Gupta et al. (1981) de *E. citriodora* y Methra-Palta (1982) de *E. nova anglica* y *E. viminalis*.

Después de estas primeras publicaciones, la obtención de plantas in vitro en especies forestales se ha convertido en una metodología eficiente para multiplicar especies de coníferas y unas cuantas angiospermas.

2.4.2. Multiplicación in vitro de especies forestales

La multiplicación in vitro de especies forestales puede lograrse por tres rutas diferentes: a) el desarrollo de brotes preexistentes, b) la formación de meristemos adventicios y c) diferenciación de embriones somáticos.

2.4.2.1. Regeneración a partir de brotes preexistentes

Hasta la fecha, la multiplicación de plantas por medio de ápices preexistentes es el método más común para la propagación clonal de maderas duras (von Arnold, 1988) y es el más utilizado en coníferas (Thorpe et al., 1991). En esta técnica, se utilizan ápices de yemas terminales, axilares y nudos. Este sistema de propagación presenta la ventaja de que los brotes se multiplican directamente, usualmente sin una fase intermedia de callo (masa de células no diferenciadas) y en general, las plantas regeneradas son genéticamente bastante estables (Vasil y Vasil, 1980). Sin embargo, el número de plantas que se produce es limitado

debido a que depende del número de brotes preexistentes en el explante. Si bien, la tasa de multiplicación inicial es baja, ésta se incrementa durante los primeros subcultivos y eventualmente se puede alcanzar una tasa considerable de multiplicación (Thorpe et al., 1991).

En angiospermas, se han obtenido resultados satisfactorios cuando se utilizan brotes axilares de árboles maduros seleccionados en especies como *Tectona grandis* (Gupta et al., 1980 citado por Thorpe et al., 1991), *Eucalyptus tolleriana* y *E. camaldulensis* (Gupta et al., 1983), *Dalbergia sisso* (Datta et al., 1983) y *Quercus robur* (Vieitez et al., 1985).

Más recientemente, Jaramillo y colaboradores (comunicación personal), ha logrado adoptar y desarrollar sistemas de propagación in vitro para algunas especies forestales tropicales como *Alnus acuminata*, *Cedrella odorata*, *Eucalyptus tereticornis* y *globulus*, *Tectona grandis*, *Tabebuia roseae* y *Podocarpus guatemalensis*.

La capacidad del órgano para diferenciar yemas depende del genotipo, del tipo de yema y del número previo de subcultivos (von Arnold, 1988). Tanto en angiospermas como en gimnospermas, en la multiplicación y alargamiento de las yemas, generalmente se emplean citoquininas, siendo más utilizada la benciladenina (BA). Frecuentemente es necesario eliminar las citoquininas para el alargamiento y el enraizamiento. Según von Arnold (1988) la capacidad de enraizamiento de las yemas está altamente influenciado por la juvenilidad de la planta madre y la fuente del explante. En las especies leñosas, diferentes partes de la planta tienden a permanecer juveniles y otras adultas (Hartman y Kester, 1975). Los propágulos de las partes maduras son fisiológicamente más viejos que los de las partes juveniles y frecuentemente exhiben características no deseadas como

crecimiento plagiotrópico, menor tasa de crecimiento etc. (Durzan, 1983).

Las dificultades de establecer cultivos asépticos de explantes maduros de plantas leñosas está asociado con necrosamiento de los explantes, contaminación microbial y oxidación fenólica; factores que han limitado los progresos en el desarrollo de la propagación in vitro de algunas especies (Barghchi y Alderson, 1983).

2.4.2.2. Organogénesis

En la propagación in vitro de especies forestales y particularmente en gimnospermas, la organogénesis es la ruta de diferenciación que más se usa (Villalobos et al., 1983).

El tipo de explante es de primordial importancia para lograr los sucesos en la organogénesis (Thorpe, 1980). Hay algunos factores que podrían ser considerados: a) el órgano que sirve como fuente de tejido, b) la edad ontogénica y fisiológica del explante, c) la época en la cual se obtiene el explante, d) el tamaño del explante y e) la calidad de la planta de la cual se extrae el explante (Murashige, 1974). Los inóculos más juveniles como los embriones de semillas maduras y/o a partir de plantas germinadas poseen la mayor capacidad organogenética (George y Sherrington, 1984). No obstante, tejidos de árboles maduros han mostrado ser capaces de formar primordios adventicios (Biondi y Thorpe, 1982) como en el caso de *Albizia falcataria* (Crizaldo, 1980), *Albizia lebbeck* (Gharyal y Maheswari, 1985), *Leucaena leucocephala* (Dhawan y Bhojwani, 1985), *Dalbergia latifolia* (Rao, 1986), *Quercus robur* (Favre y Juncker, 1987), *Albizia richardiana* (Tomar y Gupta, 1988) y *Sequoiadendron giganteum* (Monteuuis, 1991).

Los brotes adventicios pueden formarse directamente del explante o indirectamente a partir de un callo.

La producción vegetativa de nuevas plantas a partir de callo, pese a su gran ventaja de ser una fuente inagotable de propágulos, ya que se obtienen tasas mayores de propagación si se logra iniciar un cultivo de células en suspensión, presenta actualmente algunos inconvenientes. Se ha constatado que las células vegetales en cultivo de crecimiento intenso presentan una inestabilidad génica, fundamentalmente en sus niveles de ploidía (D'Amato, 1977) y existe el riesgo de que se puedan inducir aberraciones cromosómicas o cambios epigenéticos (Christianson, 1986).

La formación de brotes adventicios sin una intermediación de callo, se considera un proceso más viable para la propagación clonal porque representa tasas mayores de multiplicación por la estabilidad genética de los individuos regenerados.

Un estudio histoquímico de los tejidos que forman órganos evidenció que hay un acúmulo grande de almidón en el tejido, particularmente en las regiones donde se forman los brotes (Thorpe, 1980). Street (1977), puntualizó que las células meristemáticas o embrionales tienen un patrón básico de expresión de genes y están en tal estado que si ellas reciben las señales apropiadas pueden ser dirigidas a expresar diferentes vías de diferenciación. Hay evidencia directa que muestra que durante la formación de órganos es necesaria la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Thorpe, 1980).

Aparentemente, los procesos de novo, comienzan con cambios en una única célula del parénquima en una masa de células. Esos cambios conllevan a la aparente dediferenciación de la célula del parénquima a una célula meristemática y a un estado de vacuolización y división para desarrollar un meristema (Thorpe, 1980). Ese meristemoide consiste de una masa esférica de células isodiamétricas pequeñas con un citoplasma denso y una relación núcleo-citoplasma alta. Ese tejido meristemático o meristemoide es

inducido por medio de tratamientos con reguladores de crecimiento, en general, la bencil-adenina (BA) ha dado los mejores resultados en especies forestales (Villalobos et al., 1983). Posteriormente, estos meristemoides se diferencian a primordios y el subsecuente desarrollo de la planta completa (von Arnold, 1988; Thorpe et al., 1991), la cual generalmente se desarrolla en ausencia de reguladores de crecimiento.

El crecimiento de los brotes adventicios, está influenciado por el genotipo y el tratamiento del explante durante la inducción de los mismos (von Arnold, 1988). En coníferas, la formación de ápices con primordios requiere la transferencia a un medio con niveles diferentes de reguladores del crecimiento y de nutrimentos en el medio y con frecuencia, la adición de carbón activado (Biondi y Thorpe, 1982; Thorpe y Biondi, 1983). El efecto del carbón activado no está claro todavía, aunque se cree que posiblemente absorba excesos de fithormonas y sustancias inhibitorias.

En cotiledones de *Pinus radiata* en cultivo, los trasplantes con intervalos de tres semanas han mostrado ser un método eficiente; éstos se pasan a medios sin reguladores de crecimiento con reducción en el nivel de sacarosa (1-2%). Otra práctica común es la disminución de los reguladores de crecimiento, presentes en el medio original. En algunos casos, se ha empleado con éxito la disminución en 50% de los macro y micronutrientes de los medios de cultivo. Otros factores que permiten el alargamiento de los brotes son la adición de vitaminas D (5uM), la luz roja lejana y las altas intensidades de luz (Villalobos et al., 1983). Para el enraizamiento, los mejores resultados se han observado con ácido indolbutírico (AIB) (Haissig, 1974; Sondal et al., 1984; SaMartin et al., 1986).

Las plantas producidas asexualmente a través de organogénesis in vitro, son de calidad uniforme, y pueden ser

producidas mucho más rápidamente que si fuera posible a través de la reproducción sexual o por técnicas convencionales de propagación. Tales plantas, también han sido reportadas a crecer y a madurar más rápido que las plantas propagadas por semilla (Vasil y Vasil, 1980).

2.4.2.3. Embriogénesis somática

La embriogénesis asexual es el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje-radicular apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares pueden ser capaces de crecer y formar plantas completas.

La embrionía adventicia es una serie de eventos morfogénicos que ocurre in vivo a partir de tejidos de algunas especies y con ciertos géneros de plantas. También se puede originar de las sinérgidas, del suspensor y de otros tejidos localizados dentro del ovario como el endospermo (Litz y Jarret, 1991).

La embriogénesis somática y la regeneración de plantas se ha logrado en gimnospermas, destacando: *Picea* (Hakmand y von Arnold, 1985), *Pinus* (Gupta y Durzan, 1986) y *Pseudotsuga menziensis* (Durzan y Gupta, 1987). En angiospermas, se ha obtenido embriogénesis somática solamente en pocas especies maderables como *Santalum album*, *Aesculus hippocastaneum* (Radojevic, 1988), *Albizia richardiana* (Tomar y Gupta, 1988), *Eucalyptus citriodora* (Muralidharan et al., 1989), *Liriodendran tulipifera* (Merkle y Sommer, 1987), *Quercus rubra* (Gingas y Lineberger, 1989) y *Quercus suber* (Maataoui et al., 1990).

En la mayoría de las especies, la obtención de embriones somáticos en cultivo in vitro está muy influenciado por el explante utilizado así como por las condiciones de cultivo. En angiospermas, se han usado varios explantes para generar

callo embriogénico, sin embargo en coníferas se ha obtenido los mejores resultados con embriones maduros e inmaduros. En la mayoría de los casos los embriones somáticos se originan de callo embriogénico. En general, se usan medios que contienen altos niveles de sales (Thorpe, 1988), usualmente se requiere de una auxina como 2,4 D o ANA y en algunos casos se necesita una citocinina (von Arnold, 1988). Se ha observado que para la maduración del embrión somático, tanto en coníferas como en angiospermas, se necesita el ácido absísico (ABA) (Boulay et al., 1988; Attre et al., 1989; von Arnold, 1988). Los estudios ultraestructurales han mostrado que el ABA estimula a los embriones somáticos a acumular sustancias de reserva especialmente lípidos pero también proteínas y carbohidratos (Hakman y von Arnold, 1988). Parece ser que el almacenamiento de lípidos es un indicador del desarrollo de embriones somáticos verdaderos (Turnham y Northcote, 1982; Schwendiman et al., 1988).

Existen dos patrones de desarrollo de la embriogénesis somática; directa e indirecta. En la embriogénesis somática directa las células se encuentran en estado meristemático requiriendo de las condiciones apropiadas para iniciar la división celular y expresar embriogénesis. La embriogénesis somática indirecta, requiere de una fase intermedia de callo como es el caso ya discutido en la organogénesis (Sannasgala, 1989 citado por Marroquín, 1991).

Hay varias interpretaciones acerca de la naturaleza de la diferenciación que da como resultado la embriogénesis somática. Se cree que en el tejido a sembrar o explante, ciertas células están determinadas para los eventos morfogénicos que llevan a esta embriogénesis (Thorpe, 1980; Tisserat et al., 1979). Por tal razón la presencia de reguladores exógenos de crecimiento, usualmente el 2,4 D, no solamente inicia la diferenciación de los embriones somáticos, sino que también estimula la multiplicación de las

células predeterminadas. La embriogénesis puede derivarse también de tipos diferenciados de células por medio de la predeterminación; este patrón de desarrollo induce la embriogénesis en determinadas células, y se basa en la suposición de que ciertas células que conducen a la embriogénesis somática han sido reprogramadas in vitro.

La embriogénesis somática es un método efectivo para la propagación rápida de gran cantidad de plantas, las suspensiones obtenidas de callo embriogénico pueden servir como fuente de protoplastos embriogénicos que pueden usarse en la ingeniería genética de especies arbóreas (Thorpe et al., 1991). Boulay (1987), menciona que por medio de la embriogénesis somática se puede obtener verdadero rejuvenecimiento de árboles maduros, almacenar fácilmente gran cantidad de embriones somáticos en cultivo líquido y las células pueden criopreservarse para uso futuro. También ofrece la posibilidad de producir semillas artificiales usando estos embriones y el posible uso de bioreactores para generar gran cantidad de embriones somáticos (Dustan, 1988; Thorpe, 1988). Sin embargo, la embriogénesis somática es menos frecuente que los otros métodos de propagación, particularmente en especies maderables. Mientras que el número de especies que se han propagado por este método ha incrementado, el porcentaje de regeneración de ellas es bastante bajo (Thorpe et al., 1991).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

El trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), de septiembre de 1991 a septiembre de 1992.

3.2. Material experimental

Fueron utilizadas semillas de: *Albizia guachapele* (Guayaquil), *Cedrella odorata* (cedro), *Phitecellobium saman* (cenízaro) y *Swietenia macrophylla* (caoba); suministradas del Banco Latinoamericano de Semillas del CATIE.

3.3. Desinfección

Antes de proceder a desinfectar las semillas, se les hizo una escarificación que consistió en cortarles el extremo distal (para cenízaro y guayaquil), eliminarles la parte alar (cedro); o bien, extraer el eje embrionario (para caoba).

Las semillas fueron lavadas con agua y jabón y se dejaron en agua corriente durante 30 minutos. Luego, fueron enjuagadas en alcohol de 70% por tres segundos. Se dejaron durante 20 minutos en cloro comercial (5.5 i.a.) y en la campana de flujo laminar se les hizo tres lavados en agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en un medio de cultivo compuesto por agar y agua, y se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad. El pH del medio de cultivo fue de 5.8.

3.4. Inoculación

Una vez que las semillas germinaron, aproximadamente a los 7-10 días en guayaquil, 10-17 días para caoba, 5-7 días en cedro y tres días con cenízaro; se procedió a dividir el hipocotilo en secciones de aproximadamente 1.5 cm de longitud

(Figura 1) y a sembrarlas en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con vitaminas, sacarosa, reguladores de crecimiento (según fuese el experimento, ver más adelante) y solidificado con Agar-agar o Gelrite (Cuadro 1A). Únicamente en el caso de caoba se empleó el epicotilo como explante, dada la morfología de su embrión (Alvarenga y Flores, 1988). Los medios de cultivo fueron ajustados antes de la esterilización a un pH de 5.8 con NaOH y HCl 1N. Con ayuda de un dispensador Wheaton Unispense Model III, se dispensaron 10 ml de medio en frascos de vidrio con una altura de 7.5 cm y 9.5 cm de diámetro.

Para todos los experimentos, los cultivos fueron colocados en un cuarto de crecimiento a una temperatura promedio de 27 ± 1 °C, 87 ± 3 % de humedad relativa, 2000 lux de intensidad lumínica y un fotoperíodo de 16 horas.

3.5. Inducción de la organogénesis

Para las cuatro especies en estudio, las secciones de hipocotilo fueron colocadas en un medio de cultivo con cuatro diferentes concentraciones del medio MS: 25%, 50%, 75%, 100%, en combinación con cinco concentraciones de BA: 8.8; 17.7; 26.6; 35.5; y 44.4; μ M.

3.5.1. Organogénesis en *Albizia guachapele* (guayaquil).

Dado los resultados observados en el primer ensayo, se repitió una parte del mismo que consistió en utilizar el medio MS (1962) al 50% y las mismas concentraciones de BA (8.8, 17.7, 26.6, 35.2 y 44.4 μ M).

3.5.2. Organogénesis en *Cedrella odorata* (cedro).

Con base en los primeros resultados, se planeó otro experimento en el cual fueron combinadas las cinco concentraciones de BA (4.4, 8.8, 13.3, 17.7 y 22.2 μ M) y tres

concentraciones de ANA (0, 2.6, 5.3 y 10.7 μM) en un MS a la mitad.

En otro experimento, fueron combinadas las mismas concentraciones de BA (4.4, 8.8, 13.3, 17.7 y 22.2 μM), con un las siguientes combinaciones de ANA: 0, 1.6, 2.6, 3.7, 4.8.

3.5.3. Organogénesis en *Swietenia macrophylla* (caoba).

En un segundo experimento con esta especie, se utilizó el medio MS al 50% y las cinco concentraciones de BA (8.8, 17.7, 26.6, 35.5 y 44.4 μM).

3.5.4. Organogénesis en *Pithecellobium saman* (cenizaro).

3.5.4.1. Inducción de los brotes adventicios.

El experimento se repitió en los ensayos siguientes empleando el medio de cultivo MS (1962) al 50% y 26,6 μM de BA.

3.5.4.2. Influencia de la edad del explante en la inducción de la organogénesis.

En el medio de cultivo conteniendo 26.6 μM de BA, fueron colocados explantes de hipocotilo de semillas con 5, 10, 15 y 20 días después de la germinación,

3.5.4.3. Influencia de la sección proximal, intermedia y distal del hipocotilo sobre la capacidad organógena

Con el propósito de observar la influencia de la polaridad sobre la inducción de los brotes y conocer que parte del explante responde más a los procesos organogenéticos. Para este ensayo, el hipocotilo, de cinco días de germinado, se dividió en tres secciones las cuales se denominaron proximal, intermedia y distal (Figura 2).

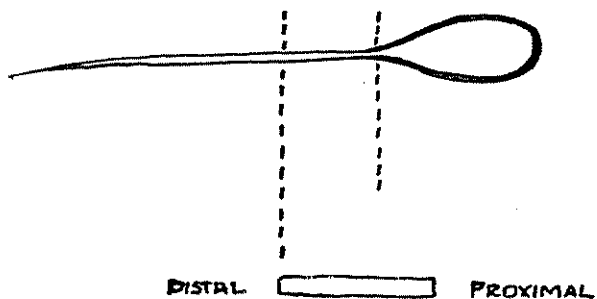


Fig.1. Sección de hipocotilo de *P. saman* empleado como explante, en el cual se observa el extremo proximal y distal.

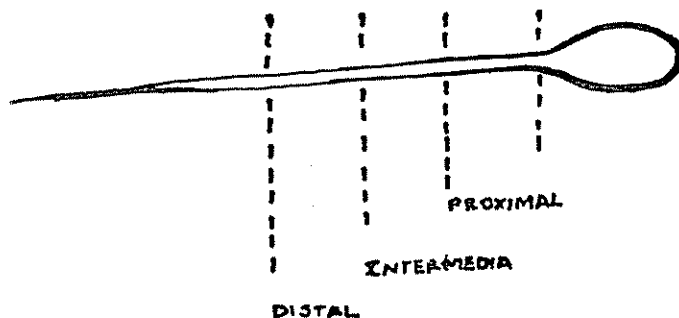


Fig.2. Secciones de hipocotilo de una plántula de *P. saman* en las que se muestra el explante proximal, intermedio y distal.

3.5.4.4. Influencia de la posición del explante sobre la inducción de brotes

Para determinar si la posición del explante influencia la formación de órganos de novo, se diseñó un experimento en el que las secciones de hipocotilo fueron puestas en posición vertical y en posición horizontal.

3.5.4.5. Efecto del período de exposición de los explantes a la bencil adenina (BA)

Las secciones de hipocotilo se expusieron por períodos de 7, 14, 21 y 28 días a un medio de cultivo que contenía 26.6 μ M de BA. Después de ese tiempo de cultivo, se transfirieron a un medio sin BA.

3.6. Desarrollo de los brotes adventicios de *P. saman*

3.6.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo para el desarrollo de los brotes diferenciados fue un MS (1962) suplementado con 3% de sacarosa y 0.5 g/l de Gelrite. Dicho medio fue distribuido en viales con un ancho de 2.0 cm y 9.5 cm de altura. El tamaño de los brotes -sólo con el primordio o un par de hojas- osciló entre 0.3 μ m y 1.0 cm.

3.6.2. Efecto de la concentración de carbón activado sobre el desarrollo de los brotes adventicios

Los brotes de aproximadamente 0.3 cm a 1.0 cm, se distribuyeron en el medio de cultivo que contenía las concentraciones de 0, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 g/l de carbón activado.

3.6.3. Efecto de la concentración de ácido giberélico (GA_3) sobre el desarrollo de los brotes adventicios

Se probaron cuatro concentraciones de ácido giberélico a saber: 1.4, 2.8, 4.3 y 5.7 μ M. Posteriormente, se probaron

concentraciones altas como: 144.4, 288.8 y 433.0 μM . El GA₃ se adicionó al medio esterilizado esterilizado mediante filtración. Los brotes fueron mantenidos en oscuridad durante los primeros 12 días.

3.7. Enraizamiento de las plántulas de *P. saman* originadas a partir de organogénesis

3.7.1. Medio de cultivo

Se utilizó un MS (1962) completo, al que se le adicionó 2% de sacarosa y 0.05% de Gelrite. El medio de cultivo se dispensó en tubos de ensayo de 2.0 cm de ancho y 9.5 cm de altura. El tamaño de los brotes sembrados osciló entre 1.0 y 1.5 cm. Estos variaron desde sólo el primordio foliar hasta tener tres pares de hojas.

3.7.2. Efecto de la concentración y del período de exposición al de AIB, en el desarrollo de las raíces.

Los brotes fueron expuestos durante 24, 48 y 72 horas en un medio que contenía cuatro concentraciones de AIB (123.0, 246.0, 369.0 y 492.0 μM).

3.8. Aclimatación y crecimiento en el invernadero de las plantas provenientes de organogénesis.

Con el fin de evaluar el crecimiento de las plantas originadas a partir de organogénesis en el invernadero, se estableció un ensayo en el que las plantas de aproximadamente 2.0 a 4.5 cm, fueron plantadas en bolsas de polietileno, las cuales contenían una mezcla de dos partes de tierra, una de arena y una de brosa de café. Las plantas se mantuvieron en el invernadero durante cuatro meses y se regaron diariamente. De la misma forma, se sembraron semillas bajo las mismas condiciones físicas y ambientales que las plantas obtenidas in vitro.

3.9. Estudio Histológico

3.9.1. Pasos involucrados en el origen y la formación de los brotes de novo en *P. saman*.

Para estudiar los eventos histológicos asociados con la formación de brotes de novo en *P. saman*, se fijaron tres muestras por cada día de evaluación durante las diferentes etapas de su desarrollo. Las muestras fueron tomadas cada tres días iniciando desde el día 0 hasta los 30 días de cultivo.

Para el respectivo estudio, se procedió a fijar las muestras, con un tamaño aproximado de 0.5 cm, en una solución de FAA (etanol 95%, agua destilada, formalina y ácido acético; en proporciones de 10:7:2:1). Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en una serie ascendente (50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% y 100%) de alcohol butílico terciario (T.B.A) (Cuadro 2A). Seguidamente se pasaron por una mezcla 1:1 de T.B.A-parafina durante dos horas, para dejarla por último en parafina líquida durante 48 horas. Para la infiltración en parafina se utilizó Paraplast-Plus. Los cortes se realizaron con un micrótopo de rotación a 8 μ m de grosor. Finalmente, estos fueron teñidos mediante la técnica de coloración Safranina-Verde rápido (CIRAD, 1989) y montados en portaobjetos. La interpretación y la toma de fotografías se llevó a cabo con un microscopio Nikon microphot-FX.

Para determinar el origen, y algunas características anatómicas asociadas con la formación de los brotes adventicios en las especies: *A. guchepele*, *C. odorata* y *S. macrophylla*; se utilizó el mismo procedimiento, excepto que no se estudiaron los eventos histológicos involucrados con la formación de los brotes.

3.9.2. Formación, origen y desarrollo de la raíz en las plantas de *P. saman* originadas por organogénesis.

El estudio sobre la formación, origen y desarrollo de la raíz se realizó con la misma técnica histológica ya descrita. Fueron fijadas tres muestras -aproximadamente de 0.6 cm - por evaluación durante un período de 20 días. Estas fueron tomadas cada cuatro días (4, 8, 12, 16 y 20 días).

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió principalmente en análisis de varianza, comparación de medias mediante el criterio HSD de Tukey y análisis de regresión (según el caso). Se utilizó el procedimiento GLM del SAS para analizar los datos. Las observaciones que requirieron ser transformadas, se transformaron con la raíz cuadrada de $x = \sqrt{x+0.5}$. El análisis de las variables en guayaquil y caoba, se hizo con la X^2 utilizando el procedimiento CATMOD (Grizzle *et al.*, 1969).

Los valores de significancia más relevantes se presentan en cuadros del apéndice.

3.10.1. Inducción de los brotes adventicios

Para el experimento de inducción de brotes en las cuatro especies, los tratamientos se distribuyeron en un arreglo factorial de 20 tratamientos. Cada unidad experimental constó de una caja petri grande con 10 explantes y dos repeticiones.

El modelo de análisis de varianza fue: $Y_{ij} = u + T_i + e_{ij}$
donde: Y_{ij} = variable de respuesta

u = media general

T_i = i ésimo tratamiento

e_{ij} = error experimental del i ésimo tratamiento en la j ésima observación

El cuadro del análisis de varianza se bosqueja a continuación:

F.V.	gl
conc BA	4
conc medio	3
concBA*concmedio	12
lineal	3
cuadrática	3
cúbica	3
error	20
total	39

Los experimentos posteriores de inducción de brotes en *P. saman* fueron planeados con un diseño irrestricto al azar. En este caso, para cada ensayo, hubo 10 ó 15 repeticiones por tratamiento y cada repetición con tres muestras. La toma de datos a los 40 días contempló las siguientes variables:

Número de brotes por explante, porcentaje de explantes con brotes, Promedio de brotes por explante, Número de brotes desarrollados.

En estos casos y los experimentos siguientes, el modelo estadístico para el análisis de varianza fue el mismo y el cuadro del ANDEVA el siguiente:

F.V.	gl
tratamiento	t-1
lineal	1
cuadrática	1
cúbica	1
error	n-t
total	n-1

3.10.2. Desarrollo de los brotes adventicios de *P. saman*

Los ensayos relacionados con el desarrollo de los brotes fueron distribuidos en un diseño experimental completamente

aleatorizado. Se usaron 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue una planta por tubo vial. Los datos se analizaron con la variable: Número de hojas por brote (cada diez días por un período de 40 días). Los tamaños aproximados de los brotes que se utilizaron fueron 1.0, 2.5 y 4.0 cm con uno, dos y tres pares de hojas respectivamente.

3.10.3. Enraizamiento de las plantas de *P. saman* originadas a partir de organogénesis

En esta fase del trabajo, se utilizó un diseño irrestricto al azar con 18 repeticiones y cada unidad experimental estuvo formada por una planta. Se midieron las siguientes variables: número de raíces por planta, porcentaje de plantas con raíces, número de hojas por planta.

Las observaciones se realizaron cada diez días por un periodo de 60 días.

3.10.4. Crecimiento en el invernadero de las plantas de *P. saman* provenientes de organogénesis

Para estudiar el comportamiento de las plantas, se estableció un diseño irrestricto al azar. Las repeticiones estuvieron formadas por 20 plantas de origen somático y 20 plantas de origen cigótico. La unidad experimental estuvo conformada de una planta por bolsa. Se realizó una sola observación a los 120 días. Las mediciones consistieron de: número de hojas por planta, tamaño de la planta en centímetros (de la base del tallo al primordio foliar), diámetro del tallo en centímetros (de la base de éste a 1.0 cm del tallo).

4. RESULTADOS

4.1. Organogénesis en *Albizia guachapele* (guayaquil)

En presencia de BA, los explantes de hipocotilo de guayaquil, forman un tipo de protuberancias de tejido verde que, en la mayoría de los casos, emergió de los lados del explante con el consecuente rompimiento de la epidermis. Esta ruptura de la epidermis fue muy característica y observada en todos los casos. La diferenciación de los brotes, se inició a partir de algunas de esas protuberancias. Estas estructuras organogénicas, comenzaron a identificarse visualmente después de los 25 días de cultivo y, la diferenciación completa de los brotes adventicios se observó entre los 30 ó 40 días de cultivo. Después de los 60 ó 70 días, se pudo observar brotes bien desarrollados.

El porcentaje de explantes con brotes y el promedio de brotes por explante, presentaron diferencias estadísticas en las diferentes concentraciones de BA (Cuadro 3A). El mayor porcentaje de explantes con brotes (20%) se dio en la concentración de 17.7 μM de BA, mientras que el promedio de brotes por explante más alto fue de 2.5 con 35.5 μM de BA (Figura 3). La variable número total de brotes fue significativa ($X^2 > 10.73 = 0.0297$) para las diferentes concentraciones de BA. El mayor número de brotes (15 brotes) se obtuvo con la concentración de 17.7 μM de BA. No hubo diferencias significativas para el número de brotes desarrollados empero, se observó que los brotes presentaron un mejor desarrollo en la concentración de 35.5 μM de BA (Figura 4). Un caso particular se presentó con la concentración de 26.6 μM de BA, en la cual se percibieron los valores menores para todas las variables evaluadas (Figuras 3 y 4).

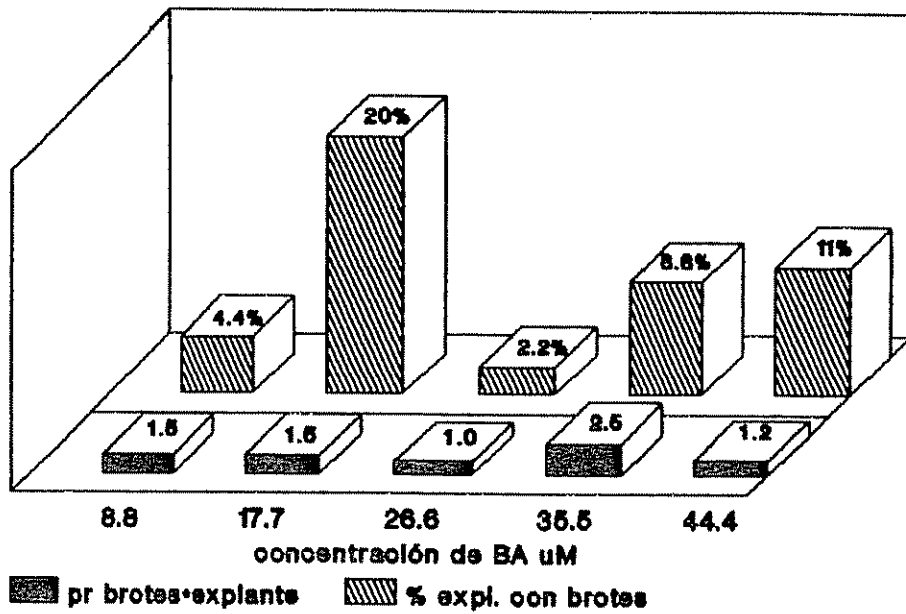


Fig.3. Efecto de la BA sobre el porcentaje de explantes con brotes y promedio de brotes en *A. guachapala*

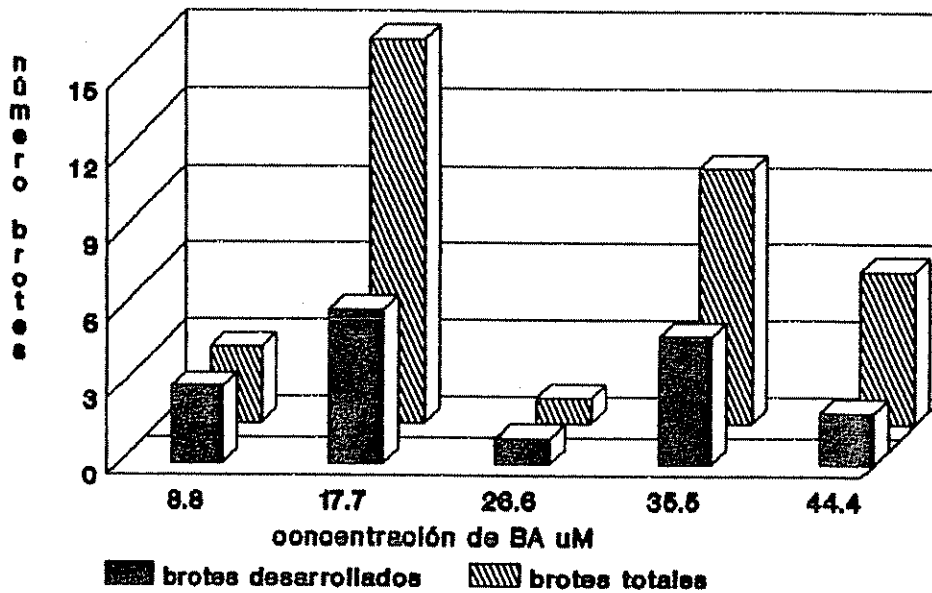


Fig.4. Efecto de la BA sobre el número de brotes adventicios y de brotes desarrollados en *A. guachapala*

En las Figuras 5A y 5b se observa la parte aérea de un brote adventicio de *A. guachapele* y protuberancias globulares, ambos desarrollados sobre el explante.

4.1.1. Origen de los brotes adventicios

El estudio histológico, evidenció que los brotes adventicios se originan a partir del parénquima de la corteza. Los brotes de novo comenzaron su diferenciación a partir de un número reducido de células que se diferenciaron de las células vecinas por su forma y contenido. Se observaron además, varios planos de división celular, núcleos grandes y citoplasma denso. En esa misma zona de actividad celular, se presentó también el desarrollo de tejido vascular (Figura 5C).

Los cortes transversales del explante mostraron que la peridermis estaba compuesta de varias capas de células, en la zona subepidérmica se observó, gran cantidad de parénquima formando la corteza. En esta capa cortical se inició la diferenciación de células de esclerénquima; hacia el interior, se encontró el cilindro vascular bien definido. Las secciones transversales de las protuberancias que se formaron en uno de los extremos del explante, mostraron centros vasculares bien formados con xilema y floema, rodeados de una masa de células parenquimáticas compactas y de forma redondeada. En otras, el xilema no presentó una dirección definida (Figura 5D).

4.2. Organogénesis en *Cedrella odorata*

Con esta especie, no se observó diferenciación de brotes adventicios en ninguna de las concentraciones de BA y de medio de cultivo estudiadas. Únicamente fue evidente la formación de protuberancias en los extremos de los explantes (Figura 6A).

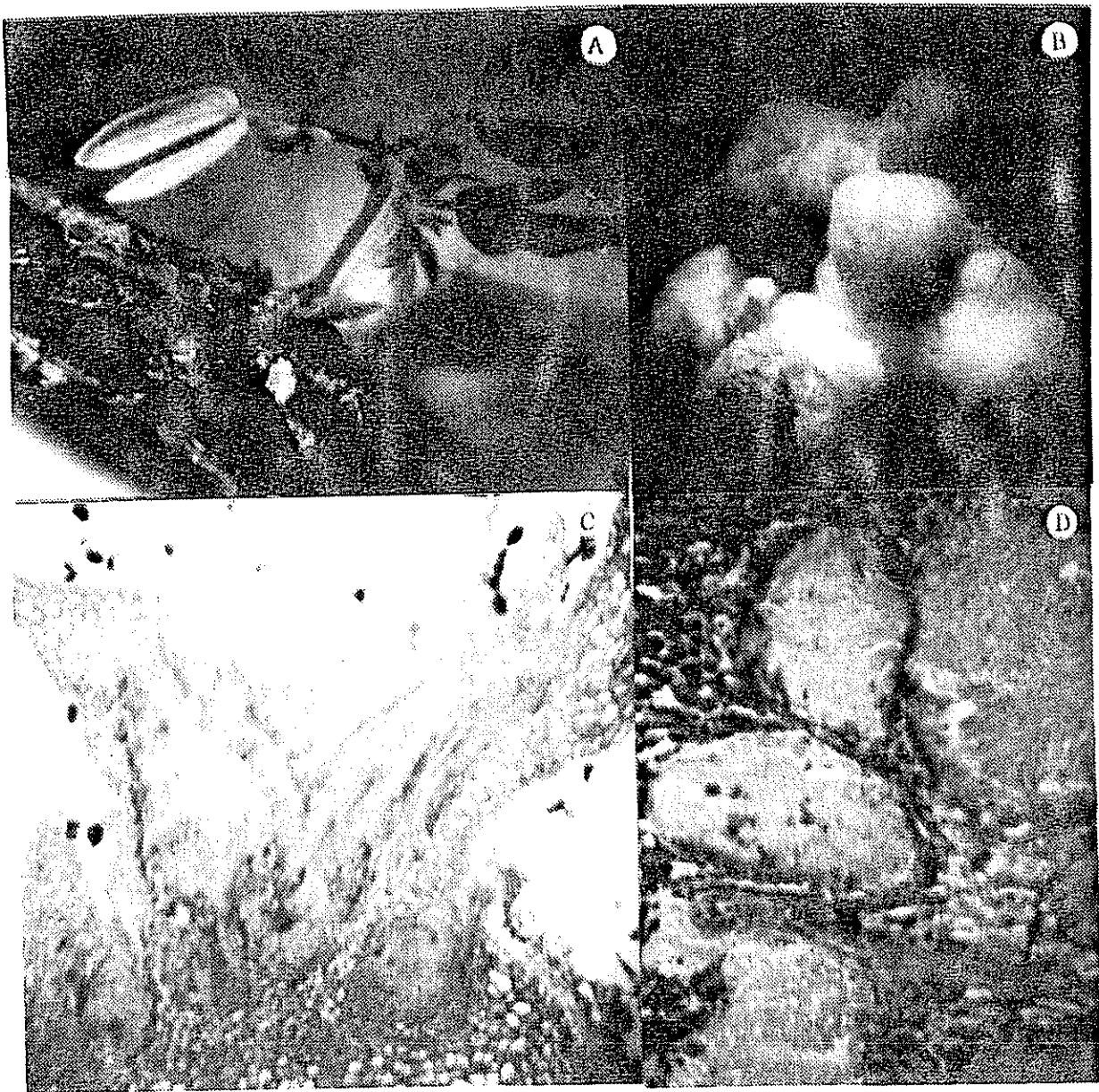


Fig.5. Parte aérea de una plántula de *A. guachapele* (A), Protuberancias globulares (B), Corte histológico mostrando el desarrollo de un primordio de brote (C) 4x y Sección transversal de una protuberancia mostrando centros de tejido vascular (D) 4x.

Cuando se combinó la BA con el ANA, se logró la formación de cinco brotes adventicios con una concentración de 17.7 μM de BA y 5.3 μM de ANA (Figura 6B). Los explantes formaron callo abundante sobre todo a concentraciones altas de BA. La presencia de raíces fue muy frecuente dependiendo de las relaciones BA:ANA (Cuadro 1). Se observó mucha variabilidad en el aspecto y el color del callo en las diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento.

Al reducir las concentraciones de ANA, para aproximarse a la combinación en la cual se obtuvo los primeros brotes, no fue posible obtener más de un brote adventicio con una concentración de 17.7 μM de BA y 3.7 μM de ANA. El resto de los explantes solo formaron callo abundante (Cuadro 2).

La formación de los brotes diferenciados empezó con un primordio pequeño que se inició entre los 40-45 días de cultivo y que posteriormente diferenció los primordios foliares hasta desarrollar la parte aérea de la planta (Figura 6C). La formación de los brotes se dio indistintamente en el borde del explante o en el centro del extremo del explante. El desarrollo de los brotes fue muy lento.

4.2.1. Origen de los brotes adventicios

El estudio histológico de los brotes adventicios, reveló que en el extremo terminal del explante, se observaron células corticales en división y grupos de células con protoplasma denso y núcleos grandes a partir de las cuales se formaron dichos brotes, así como una gran formación de xilema. El brote adventicio en sección longitudinal, mostró los primordios foliares y un tejido vascular bien diferenciado. A este nivel de desarrollo del brote ya hay conexión con el tejido vascular del explante y el brote adventicio (Figura 6D). El corte transversal de las protuberancias, mostró que estaban constituidas por células

Cuadro 1: Efecto de la concentración de BA y ANA en la organogénesis de *Cedrella odorata*.

ANA (μM)	Concentración BA (μM)				
	4.4	8.8	13.3	17.7	22.2
2.6	C	C	C	C	C
	R	-	-	-	-
5.3	C	C	C	C	C
	R	R	R	5B	C
8.1	C	C	C	C	C
	R	R	R	-	-
10.7	C	C	C	C	-
	R	R	R	R	R

C: callo
R: raíces

B: brotes adventicios

Cuadro 2. Efecto de la concentración de BA y ANA en la inducción de brotes adventicios de *Cedrella odorata*.

ANA (μM)	Concentración BA (μM)				
	4.4	8.8	13.3	17.7	22.2
0.5	C	C	C	C	C
	R	RO	RO	-	-
1.6	C	C	1B	C	C
	RO	RO	RO	RO	C
2.6	C	C	C	C	C
	R	R	R	RO	RO
3.7	C	C	C	C	C
	R	R	R	1B	RO
4.8	C	C	C	C	C

C: callo
R: Raíces

RO: Raíces ocasionalmente
B: Brotes adventicios

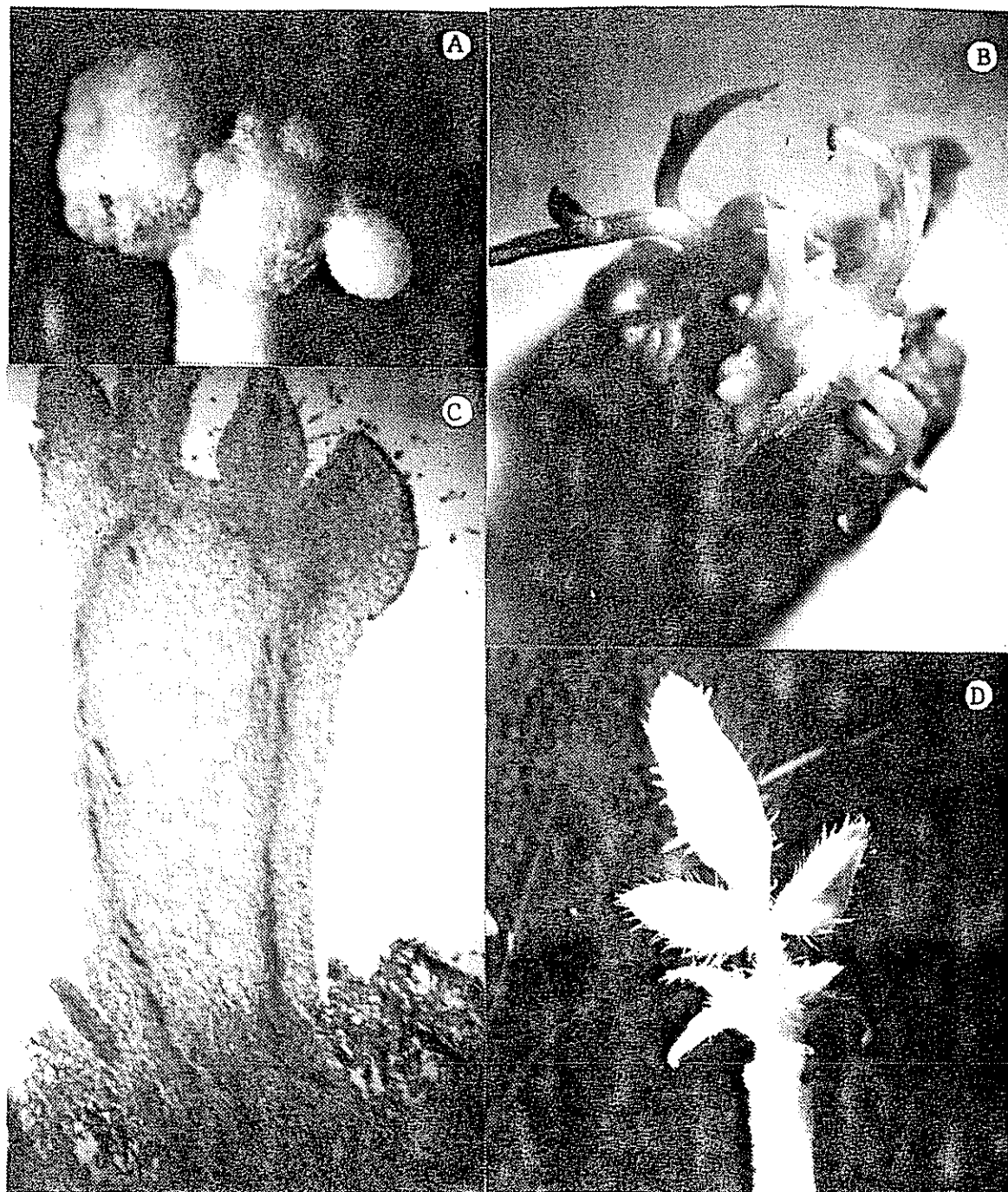


Fig.6. Protuberancias globulares observadas en los explantes de *Cedrella odorata* (A), Brotes formados sobre el explante (B), Parte aérea de una planta formada de novo (C), Corte longitudinal de un brote adventicio en el que se observa la conexión vascular con el explante (D) 4x.

de parénquima, grupos de fibras y tejido vascular que presentó un arreglo desordenado, con predominio del xilema. En otras estructuras, las células de la corteza del explante se dividieron para formar centros meristemáticos formados por células de citoplasma denso y núcleos prominentes, a partir de los cuales se originaron centros vasculares desordenados y localizados en toda el área de la estructura globular. En algunas células parenquimáticas se observó la presencia de numerosos cristales probablemente de carbonatos de calcio o de magnesio.

4.3. Organogénesis en *Swietenia macrophylla* (caoba)

En caoba, al igual que las dos especies anteriores, con las concentraciones de BA empleadas, la formación de brotes adventicios fue muy limitada. Se observó con frecuencia la formación de estructuras de tejido verde en los extremos del explante, las cuales se evidenciaron desde los primeros 15 días de cultivo. Ocasionalmente, se presentó una estructura verde que diferenció un primordio entre los 20 y los 40 días de cultivo. Este primordio, generalmente se originó en uno de los extremos del explante. También fue frecuente observar el desarrollo de un brote con varias yemas y del cual se formaron brotes múltiples.

La Figura 7 muestra que el porcentaje de explantes con brotes estuvo entre el 15%, y las diferencias entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas al 5% (Cuadro 4A). Se observó una cierta tendencia lineal para el número de brotes ($X^2 > 2.57 = 0.1090$) y promedio de brotes por explante ($X^2 > 2.23 = 0.1354$), los cuales aumentaron con la concentración de BA.

Las concentraciones de BA, permitieron el desarrollo de yemas ya existentes en el explante. La presencia de brotes múltiples (Figura 8A) así como de yemas preexistentes, fue más evidente a concentraciones de 35.5 y 44.4 μM de BA.

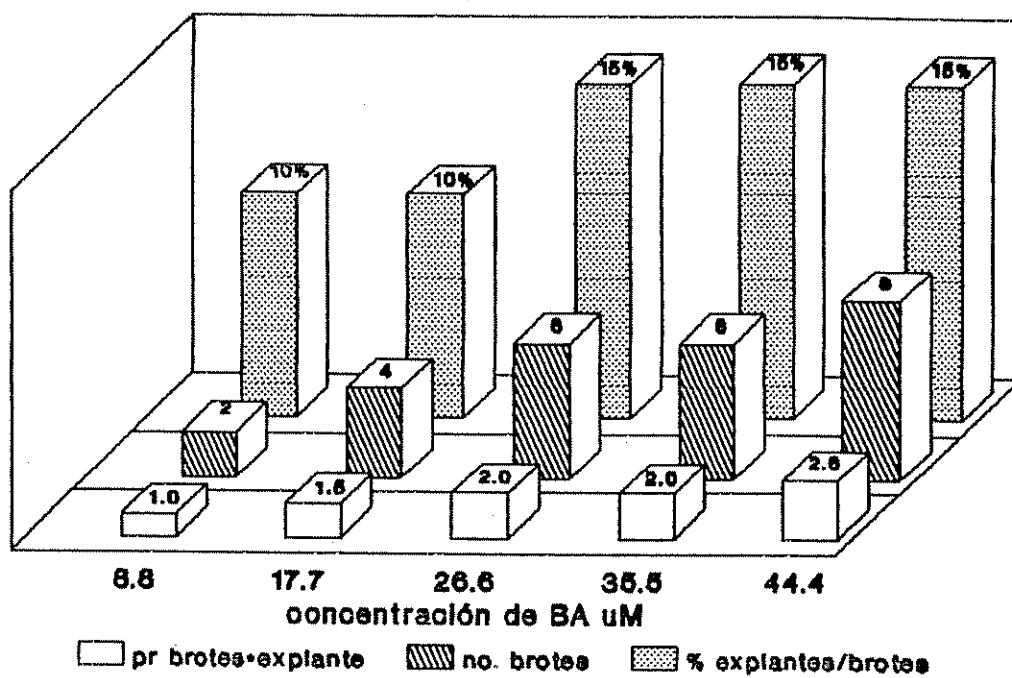


Fig.7. Efecto de la concentración de BA en la inducción de brotes adventicios de *Swietenia macrophylla*

La Figura 8B muestra la parte aérea de una planta de *S. macropylla* formada de novo.

.4.3.1. Origen de los brotes adventicios

Los cortes histológicos en caoba, mostraron que la formación de los brotes adventicios dio inicio en el parénquima cortical, dichas células pasaron por una serie de divisiones celulares hasta formar centros meristemáticos de células pequeñas, caracterizadas por su citoplasma denso, núcleos grandes y nucleolos conspicuos, que posteriormente dieron origen a un domo apical y a los primordios foliares (BC). En algunos casos, la formación de los brotes de novo estuvo acompañada por una estípula. Los brotes en formación mostraron que las células de su ápice tiñeron muy oscuro, lo cual sugiere un contenido denso. En este tipo de brotes, se observaron líneas continuas de procambium que se unieron con el tejido vascular del explante. El xilema de ambos estuvo compuesto por elementos de los vasos cortos con placas perforadas simples. En algunos brotes bien desarrollados, fue notable la presencia de yemas axilares.

En las células más externas del explante, se observaron una serie de divisiones anticlinales y periclinales predominantemente, las cuales formaron la peridermis. Se observaron también en esta región, líneas continuas de procambium formando xilema y floema. En la zona de la médula del explante, se presentó tejido vascular orientado hacia el primordio nuevo.

Secciones transversales de los extremos del explante donde se presentaron las protuberancias, denotó en su región más externa, grupos pequeños de tejido vascular, que suplen a las estructuras globulares. Asimismo, se observó que las protuberancias estaban conformadas por la estructura típica de un tallo en crecimiento secundario (Figura 8D) y algunas dieron inicio a la formación de un primordio de brote, el

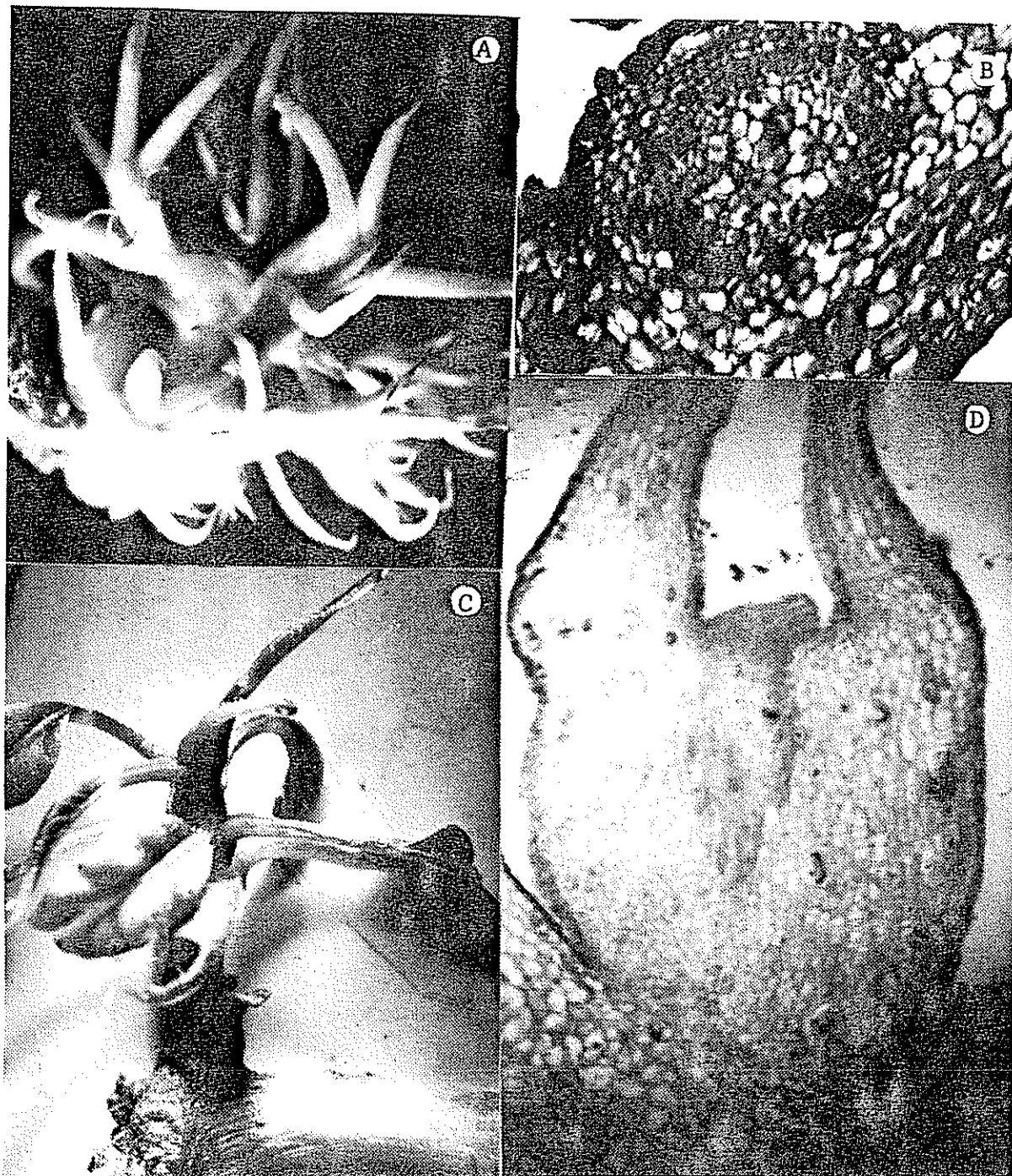


Fig.8. Brotes múltiples formados de novo en *S. macrophylla* (A), Corte transversal de una protuberancia (B) 4x, Parte aérea de una planta formada de novo (C), Corte longitudinal de un brote (D) 4x.

cual no se desarrolló. Hacia el interior, hubo células parenquimáticas con un gran contenido de fenoles. En algunas observaciones, estas células se encuentran en la periferia de la corteza formando un anillo continuo. La corteza es pequeña y hay en ella gran cantidad de centros de xilema sin una orientación definida. Las fibras se encontraron poco desarrolladas.

.4.4. Organogénesis en *Pithecellobium saman* (cenízaro)

Contrario a las otras especies, en cenízaro se observó una gran formación de brotes adventicios. Desde los primeros cinco días de cultivo, en el extremo proximal de los explantes, se denotó un hinchamiento y el inicio de la formación de un callo de color blanco y posteriormente en el otro extremo. Sin embargo, los primeros indicios de la formación de los brotes adventicios ocurre cuando alrededor de los 18 días de cultivo, el extremo proximal se torna de color verde y hasta los 24 días cuando comienzan a observarse la emergencia de las estructuras. La formación de los brotes se dio no solo en los extremos del explante, sino también a lo largo de la sección de hipocotilo donde se produjo una herida o un rompimiento de la peridermis (Figura 9A y 9B).

En los dos extremos del explante se presentó la formación de brotes, predominando la diferenciación y desarrollo de los brotes en el extremo proximal. En los casos donde hubo mucha proliferación de brotes, todos presentaron el mismo estado de desarrollo aunque generalmente hubo dominancia de uno o dos brotes, los cuales se desarrollaron sobre el explante. Cuando los brotes se desarrollaron separados uno de otro, lograron un crecimiento mejor. Después de su aparición, a las dos semanas y media los brotes dominantes alcanzaron un desarrollo vigoroso (Figura 9C y 9D). En algunos explantes, los brotes adventicios se desprendieron



Fig.9. Fotografía de microscopio electrónico mostrando la formación de brotes adventicios en el explante de *P. saman* (A,B), Parte aérea de una planta o brote desarrollado sobre el explante (C y D).

fácilmente de éste, en cambio, en otros permanecieron muy adheridos.

.4.4.1. Inducción de los brotes adventicios.

En todas las diluciones del medio MS y concentraciones de BA estudiadas, se observó la formación de brotes adventicios. Se encontró un efecto significativo del medio sobre el número total de brotes, el número de brotes desarrollados y el promedio de brotes por explante. El porcentaje de explantes con brotes no presentó diferencias estadísticas significativas (Cuadro 5A). El número de brotes adventicios tendió a aumentar conforme aumentó la concentración de sales del medio de cultivo, obteniéndose el mayor valor promedio (35 brotes) al 100% de su concentración (Figura 10A). El promedio de brotes por explante, también mostró un comportamiento lineal, en el cual los mejores resultados (5.49 brotes por explante) se lograron con un MS completo (Figura 10B). Con un MS al 25%, se observó menos formación de brotes adventicios y la mayoría de los explantes adquirieron una coloración oscura que luego necrosaron. Consecuentemente, el desarrollo de los brotes se vio afectado ya que solo 0.9 brotes se desarrollaron, mientras que a concentraciones altas del medio el número incrementó; observándose un promedio de 5.9 brotes desarrollados con el medio de cultivo al 100%. No obstante, al 75% se manifestó una ligera disminución (Figura 10C).

El efecto de la concentración de la BA para cada concentración del medio, fue significativa (Cuadro 5A) para la variable número de brotes, por lo que se consideró relevante analizar solamente esta interacción. Para una concentración del medio MS de 25%, el mayor valor promedio de brotes adventicios fue de 32.5 con la concentración de 17.7 μM de BA (Figura 11A) y de 46.5 brotes con 26.6 μM de BA con

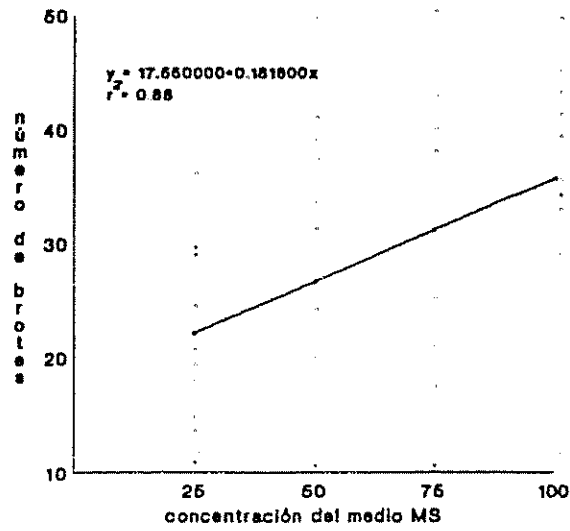


Fig.10A.Efecto de la concentración del medio MS sobre el número de brotes adventicios

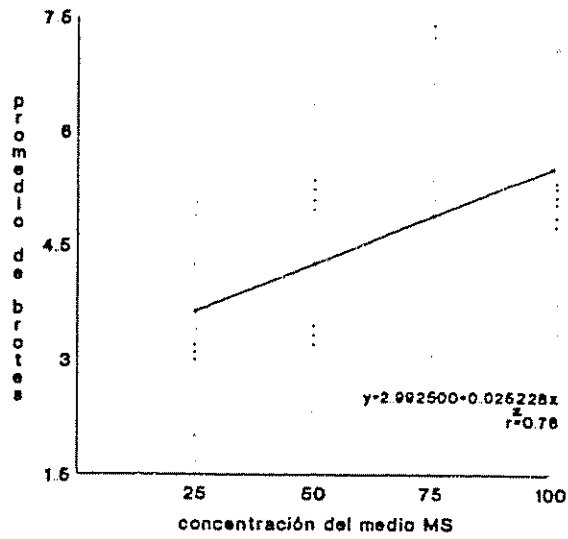


Fig.10B.Efecto de la concentración del medio MS sobre el promedio de brotes por explante

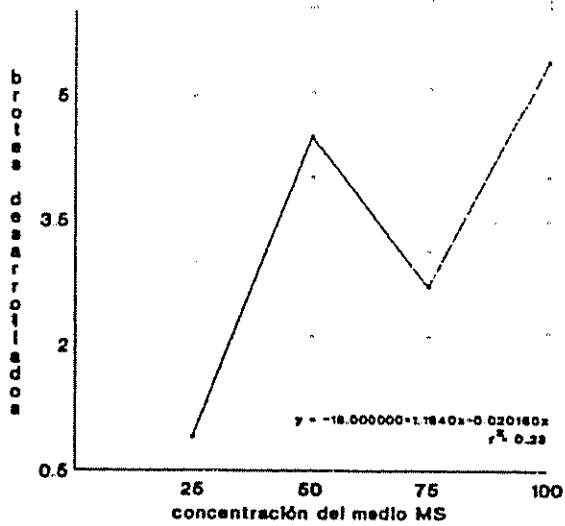


Fig.10C.Efecto de la concentración del medio MS sobre el número de brotes desarrollados

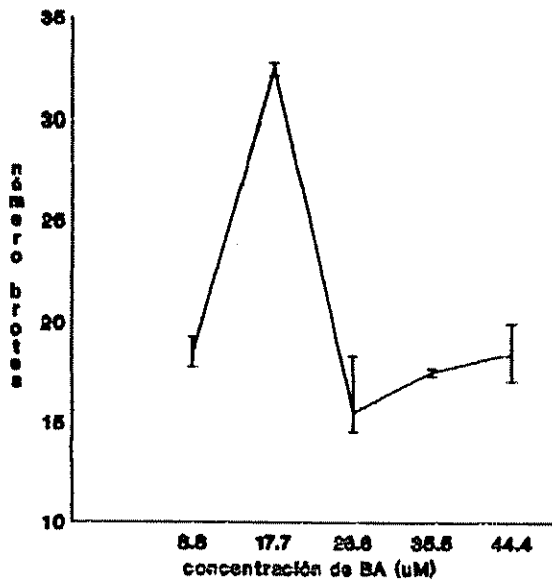


Fig.11A. Número de brotes adventicia de *P. saman* con un MB al 25%

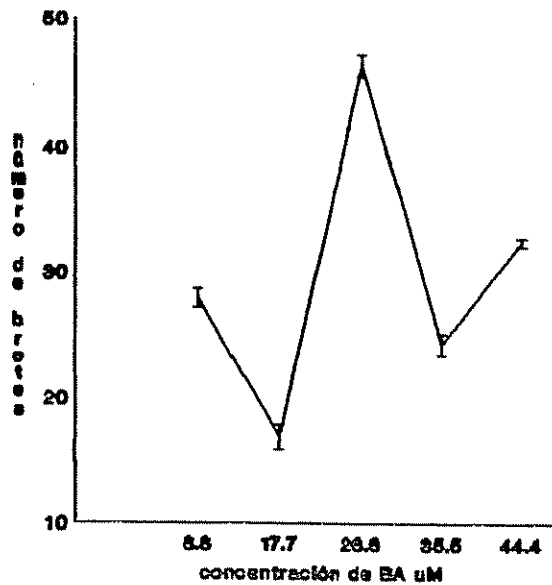


Fig.11B. Número de brotes adventicios de *P. saman* con un MB al 50%.

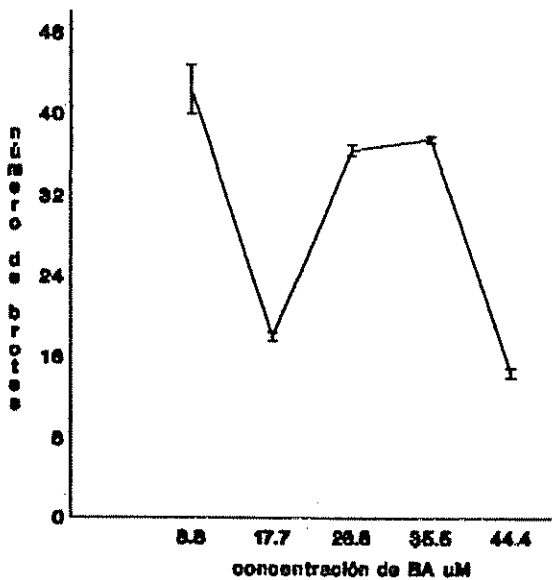


Fig.11C. Número de brotes adventicios de *P. saman* con un MB al 75%

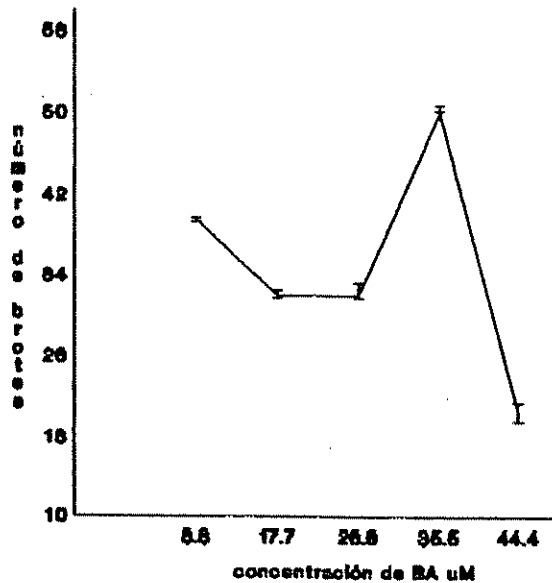


Fig.11D. Número de brotes adventicios de *P. saman* con un MB completo

un MS al 50% (Figura 11B). Con el MS al 75%, el mayor número de brotes (39.5 brotes) se observó a 8.8 μM de BA (Figura 11C) y al 100% (50.5 brotes) con 35.5 μM (Figura 11D). Evidentemente, los valores más altos para la formación de brotes se obtuvieron con las concentraciones mayores del medio.

De acuerdo con los resultados, existió una tendencia de la concentración de BA a incrementar el número de brotes adventicios a concentraciones mayores de BA cuando la concentración del medio aumentó. En el caso de 8.8 μM , el comportamiento no es claro, pero si se observa que las concentraciones óptimas se encuentran entre 17.7 μM y 35.5 μM de BA, con una disminución de brotes en la concentración de 44.4 μM . Fue frecuente observar con esta última concentración, explantes que permanecieron inactivos y perdieron su color verde hasta necrosar. En todas las concentraciones del medio, principalmente al 25%, a 8.8 μM y 44.4 μM de BA muchos de los explantes formaron en sus extremos, estructuras nodulares que fueron brotes en sus primeros estadios y que no lograron desarrollarse.

En el Cuadro 7A se presentan las medias del número de brotes en cada concentración de BA y de medio con sus respectivas desviaciones estándar.

4.4.2. Influencia de la edad del explante en la inducción de la organogénesis.

El porcentaje de explantes con brotes y el promedio de brotes por explante, fue muy similar en todas las edades de los explantes sin que se detectaran diferencias estadísticas significativas para ambas variables (Cuadro 8A). Los porcentajes de explantes con brotes estuvieron entre un 56% y 66%, mientras que el promedio de brotes por explante osciló entre 6 y 7 brotes para explantes de 5, 10 y 15 días después de la germinación (Figura 12). Los explantes más juveniles,

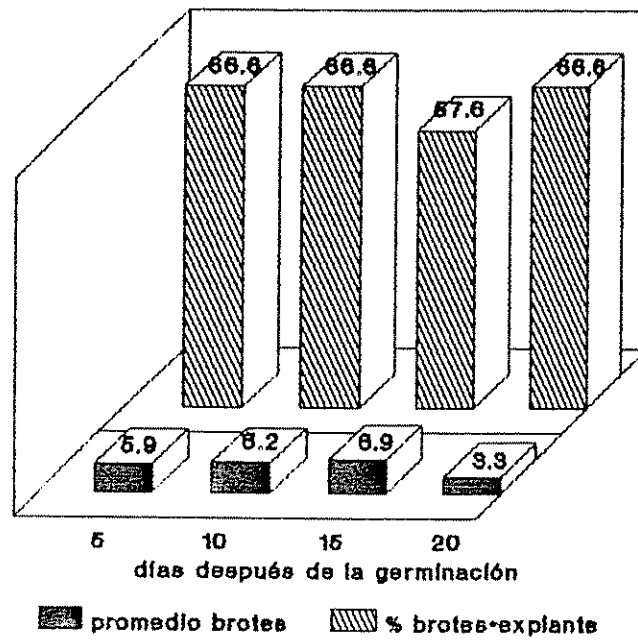


Fig.12. Efecto de la edad del explante de *P. saman* sobre el porcentaje de explantes con brotes y el promedio de brotes por explante

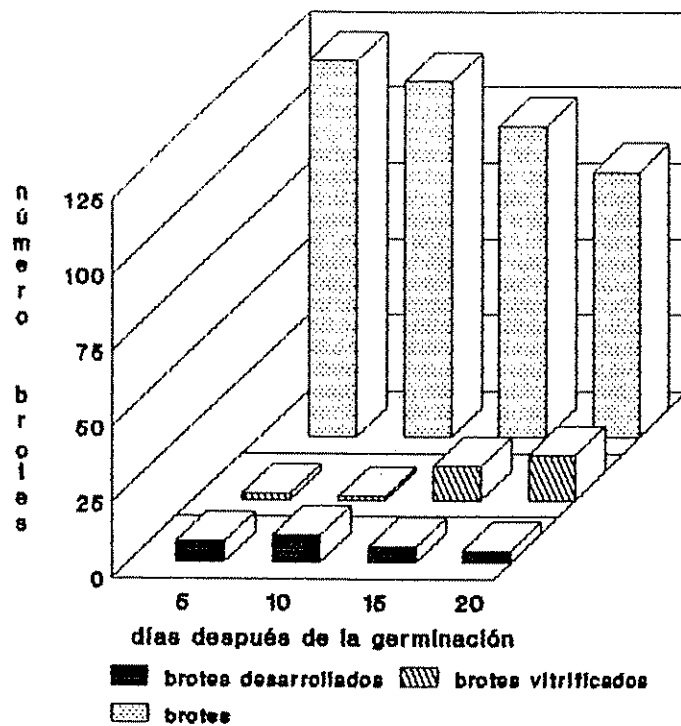


Fig.13. Efecto de la edad del explante de *P. saman* sobre el número de brotes adventicios, brotes desarrollados y vitrificados

5, 10 y aún 15 días, no mostraron diferencias significativas entre ellos, y ostentaron los valores más altos para el número de brotes adventicios formados, pero si comparativamente con explantes de 20 días después de la germinación (Figura 13 y Cuadros 8A y 9A). Estos últimos, desarrollaron callos más grandes y la peridermis aparentemente se engrosó más. Sin embargo, esto no impidió la formación de brotes adventicios aunque, en muchos casos, los brotes no se desarrollaron y se conservaron como pequeñas estructuras nodulares. Fue frecuente en estos explantes al igual que los diferenciados después de los de 15 días, la presencia de brotes vitrificados. Algunos de ellos lograron desarrollarse.

No obstante que en todas las edades los brotes adventicios se desarrollaron (Figura 13), los brotes desarrollados a partir de explantes de 20 días, presentaron un menor tamaño y fueron menos vigorosos que los brotes desarrollados en los otros tratamientos.

4.4.3. Influencia de la sección proximal intermedia y distal del hipocotilo sobre la capacidad organógena.

Las diferentes secciones del hipocotilo mostraron un comportamiento similar en la formación de los brotes adventicios. Las secciones proximal e intermedia exhibieron porcentajes de explantes con brotes de 53% y 46.6% respectivamente, mientras que la sección distal solo manifestó un 20%. De igual manera, los promedios de brotes por explante y el número de brotes adventicios fueron superiores para las dos primeras secciones del hipocotilo; la proximal con 76 brotes y la intermedia con 70 brotes. En el explante distal solo se formaron 24 brotes adventicios (Figuras 14 y 15). A pesar de estas diferencias observadas, estadísticamente no fueron significativas al 5% de significancia. Únicamente, el número de brotes desarrollados

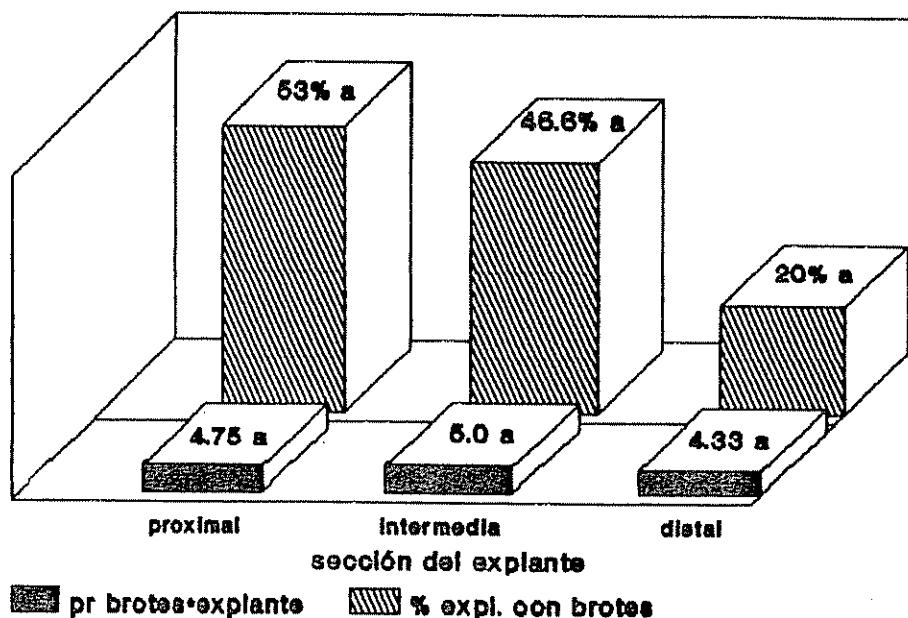


Fig.14. Efecto de la sección de hipocotilo sobre el porcentaje de explantes con brotes y promedio de brotes en *P. saman*

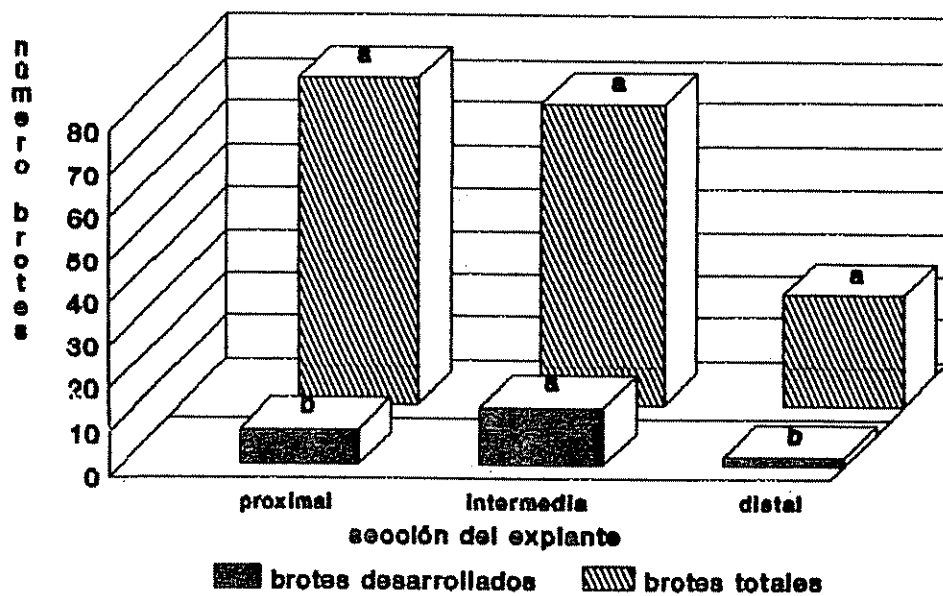


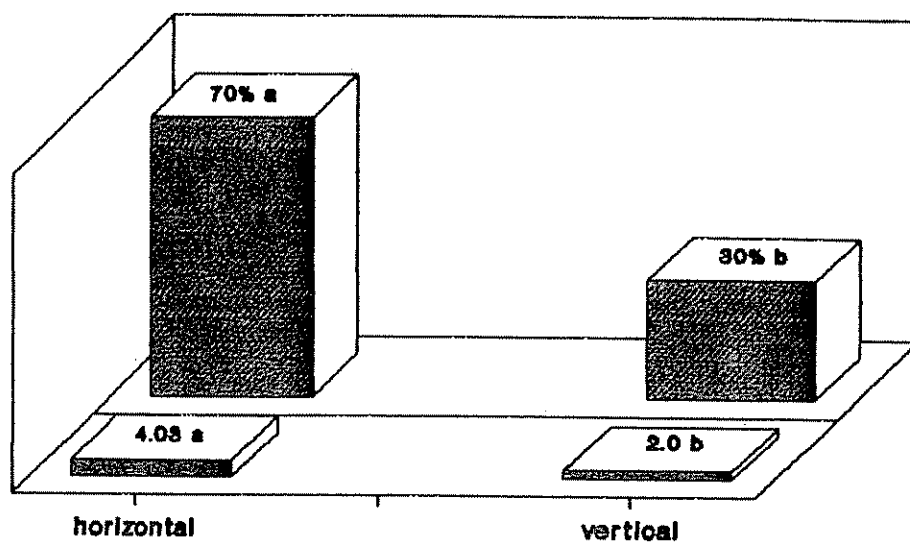
Fig.15. Efecto de la sección de hipocotilo sobre el número brotes adventicios y brotes desarrollados en *P. saman*

fue significativo (Cuadro 10A y 11A). Hubo un número significativamente mayor de brotes desarrollados en el explante intermedio (Figura 15).

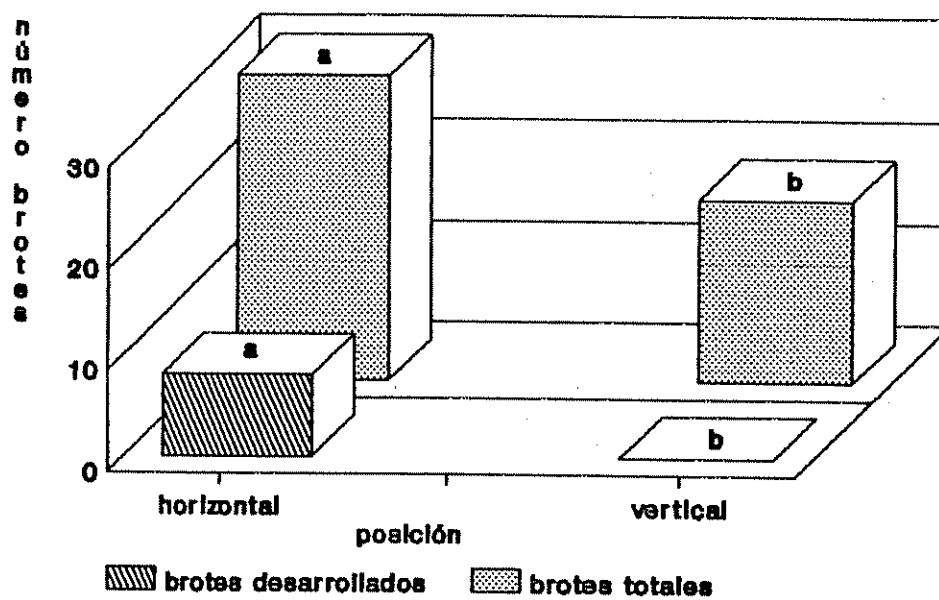
4.4.4. Influencia de la posición del explante sobre la inducción de brotes adventicios

La posición del explante, afectó el período de formación de los brotes, el número de brotes y el desarrollo de los brotes. En la posición horizontal, fueron visibles entre los 24 y 27 días de cultivo, mientras que en la posición vertical éstos fueron observables entre los 37 y 42 días de cultivo. En ambas posiciones, la formación de callo se inició desde los 5 días de cultivo. Los explantes colocados en posición vertical, formaron callo blanco abundante en el extremo en contacto con el medio y menos callo en el extremo superior. En este último, el callo se evidenció hasta los 14 ó 20 días de cultivo. En el extremo superior de algunos explantes se formó un engrosamiento del tejido, a partir del cual se originó un número considerable de brotes adventicios, o bien, los brotes tendieron a salir hacia los lados de los extremos. Las diferencias observadas, fueron estadísticamente significativas al 1% de significancia para todas las variables comparadas (Cuadro 12A y 13A).

Las Figuras 16 y 17, muestran que el porcentaje de explantes con brotes fue de un 70% para la posición horizontal y solo de un 30% con la posición vertical. El promedio de brotes por explante fue de 4.03 en la posición horizontal y 2.0 para la posición vertical. El número de brotes adventicios observados fue de 28 y 16 para la posición horizontal y vertical, respectivamente. Evidentemente, con la posición vertical, no se obtuvo brotes desarrollados hasta la última fecha de evaluación, es decir que necesitan más tiempo para formarse.



■ pr brotes-explante ■ % expl. con brotes
 Fig.16. Efecto de la posición del explante de *P. saman* sobre el porcentaje de explantes con brotes y promedio de brotes en *P. saman*



▨ brotes desarrollados ▨ brotes totales
 Fig.17. Efecto de la posición del explante sobre el número de brotes adventicios y brotes desarrollados en *P. saman*

4.4.5. Efecto del período de exposición de los explantes a la BA

El período de exposición de los explantes a la BA, no influyó la formación de brotes adventicios. En todos los períodos de exposición, se formó callo blanco en el extremo de los explantes desde los 5 días de cultivo.

La diferenciación de los primordios se observó desde los 25 días de cultivo y no se hallaron diferencias visuales entre los tratamientos. Estadísticamente no se hallaron diferencias significativas para el porcentaje de brotes por explante, cuyos valores oscilaron entre 30% (14 días en BA) y 53.3% (siete días en BA), promedio de brotes por explante, cuyo mayor valor (5.5 brotes) se observó con 14 días en BA (Figura 18), ni para el número de brotes adventicios con valores entre 54 y 46 brotes -7 y 21 días en BA, respectivamente-. El número de brotes desarrollados fue significativo para los brotes desarrollados con un período de exposición de siete días en BA (Figura 19).

Los valores de significancia y los coeficientes de variación pueden ser observados en los cuadros 14A y 15A.

4.4.6. Origen y eventos asociados con la formación de los brotes adventicios.

Los brotes adventicios en cenizaro, se originaron con mayor frecuencia a partir de las células del parénquima de la corteza y en algunos casos de células de los callos formados en el extremo del explante. El estudio de los eventos involucrados en la formación de los brotes, mostró que cuando se dió la formación de muchos brotes, las células del parénquima de la corteza se multiplicaron.

El corte longitudinal de los explantes a los nueve días de cultivo, mostró que en el extremo proximal, fue posible observar células rectangulares del parénquima con gran contenido citoplasmático y núcleos prominentes (Figura 20A).

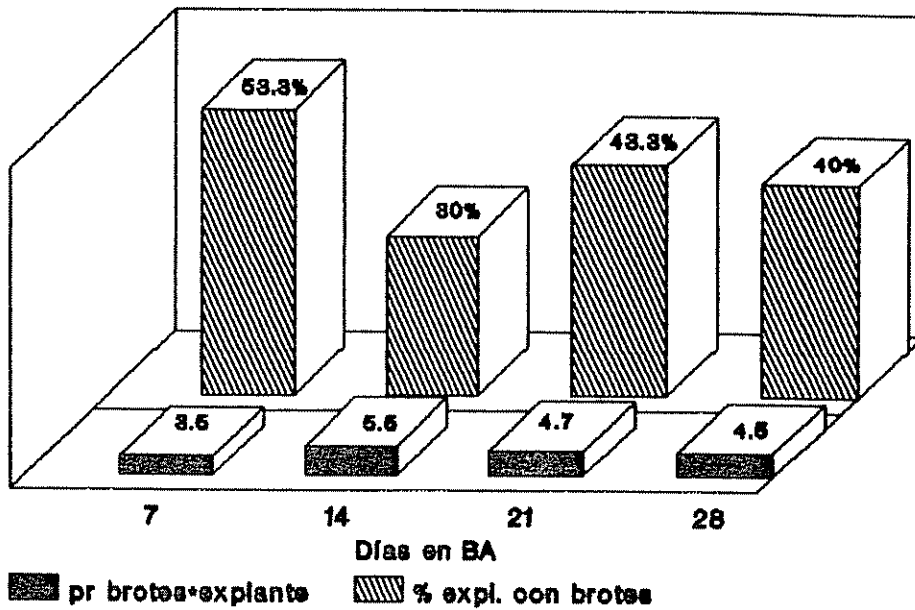


Fig.18. Efecto del período de exposición de los explantes a la BA sobre el porcentaje de explantes con brotes y el promedio de brotes en *P. saman*

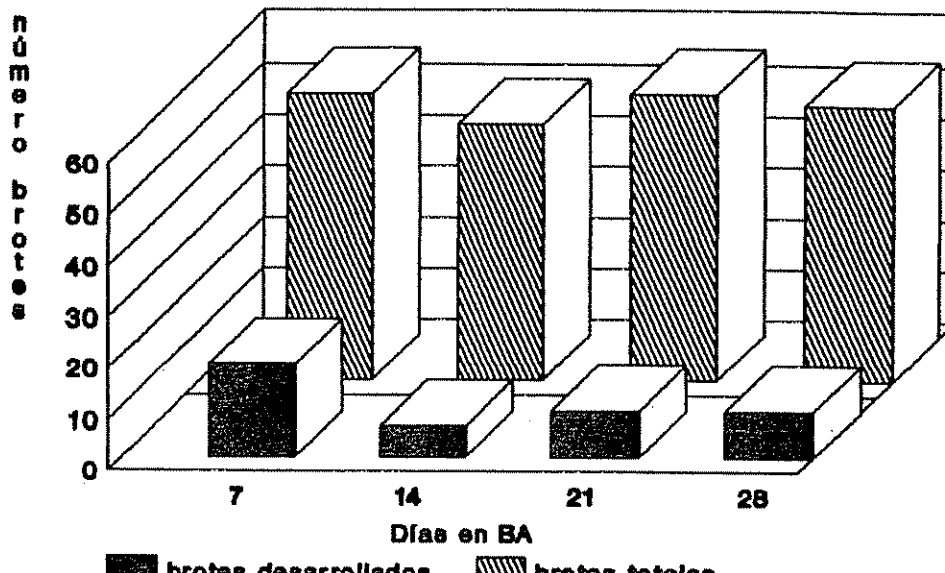


Fig.19. Efecto del período de exposición de los explantes a la BA sobre el número de brotes adventivos y brotes desarrollados en *P. saman*

A los doce días de cultivo, dichas células se dividieron y formaron xilema. A los quince días de cultivo, se presentó un anillo continuo de células formado por cambium vascular, xilema, floema y fibras floicas. A los veintiún días, se observó una masa grande de células parenquimáticas que difirieron en forma y tamaño, las cuales se dividieron en varios planos para dar origen a una estructura globular. En esta estructura, además de la epidermis se evidenciaron grupos de células más pequeñas y redondeadas con mucho citoplasma y núcleos grandes, semejantes a las células meristemáticas (20B). Otro grupo de células se encontraban en división para formar xilema, el cual fue muy abundante. Aproximadamente, a los 24 días, estas estructuras formadas de novo, tendieron a polarizarse en uno de sus extremos, presentando zonas más densas de células que estaban en actividad meristemática; en la base de dichas estructuras, se observaron centros de tejido vascular en formación (Figura 20C). Entre los 24 y 27 días de cultivo, se diferenció el primordio foliar y el tejido vascular a lo largo del brote para terminar uniéndose con el del explante. Finalmente, a los 30 días de cultivo, se pudo observar brotes completamente diferenciados que conformaron la parte aérea de la planta (Figura 20D).

Existen otros brotes que se originaron a partir de callo. Este último se desarrolló en la región externa de la corteza del explante. Los brotes que se originan de él se diferenciaron siguiendo la misma secuencia de desarrollo que la anteriormente descrita.

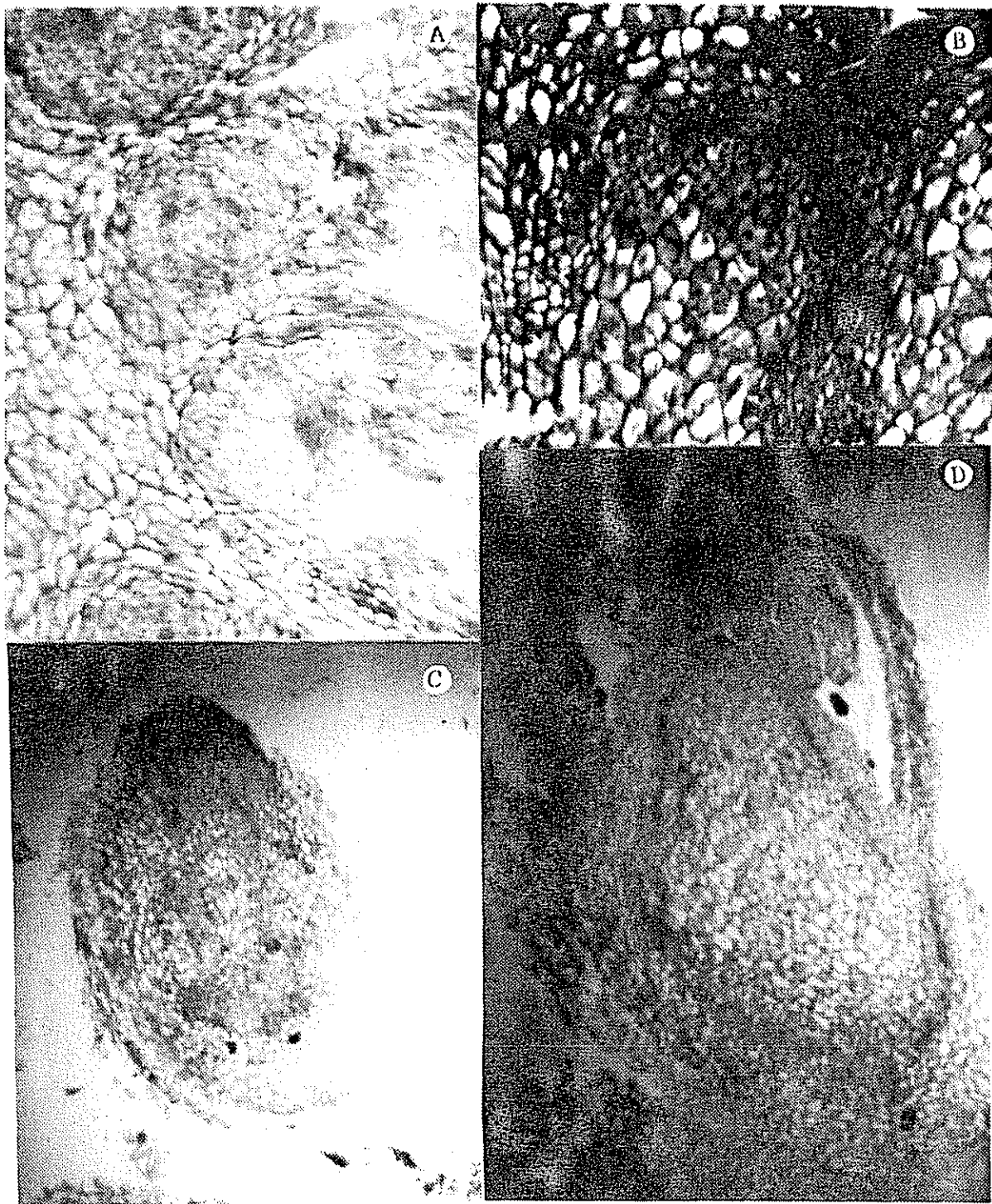


Fig.20. Centros meristemáticos en la corteza del explante (A) 4x, Primordio de brote (B) 10x, Estructura polarizada en la que se observan células en actividad meristemática y centros vasculares en formación (C) 4x, y Brote bien diferenciado donde se observa claramente sus primordios foliares y tejido vascular (D) 4x.

4.5. Desarrollo de los brotes adventicios de *P. saman*.

4.5.1. Efecto de la concentración de carbón activado en el desarrollo de los brotes adventicios.

El desarrollo de los brotes adventicios evidenciaron un desarrollo mejor cuando el carbón activado estuvo presente en el medio de cultivo. En ausencia de carbón activado, no se observó un crecimiento adecuado de las plantas, el desarrollo fue menos vigoroso y más lento (Figura 21A y 21B). Esta observación fue estadísticamente significativa al 1% (Cuadro 17A). Existió un efecto positivo de la concentración de carbón activado, sobre el número promedio de hojas producidas por planta, como una medida indirecta de crecimiento. Se pudo observar que existe una relación lineal positiva entre el número promedio de hojas por planta y la concentración de carbón activado (Figura 22). Cuando el explante, con los brotes adventicios formados, se seccionó en varias partes, y se colocaron en un medio de cultivo con la mejor concentración de carbón activado (5 g/l), se logró el desarrollo paulatino de más brotes, los cuales al separarse, permitió que otros brotes se desarrollaran. Los resultados son mejores cuando se hicieron transferencias cada 15 ó 22 días a un medio fresco con carbón activado. Un período de dos semanas fue suficiente para lograr un desarrollo adecuado de las plantas y listas para ser enraizadas. Con este método, fue posible lograr que se desarrollaran hasta cuatro plantas por explante o bien, un desarrollo aceptable cuando los brotes mayores de 0.5 cm fueron separados.

4.5.2. Efecto de la concentración de GA_3 sobre el desarrollo de los brotes adventicios.

El GA_3 no mostró ningún efecto sobre el alargamiento de los brotes de *P. saman*. En las concentraciones de GA_3 evaluadas, los brotes no se desarrollaron, por el contrario, se les formó un callo traslúcido en la base. Algunos brotes

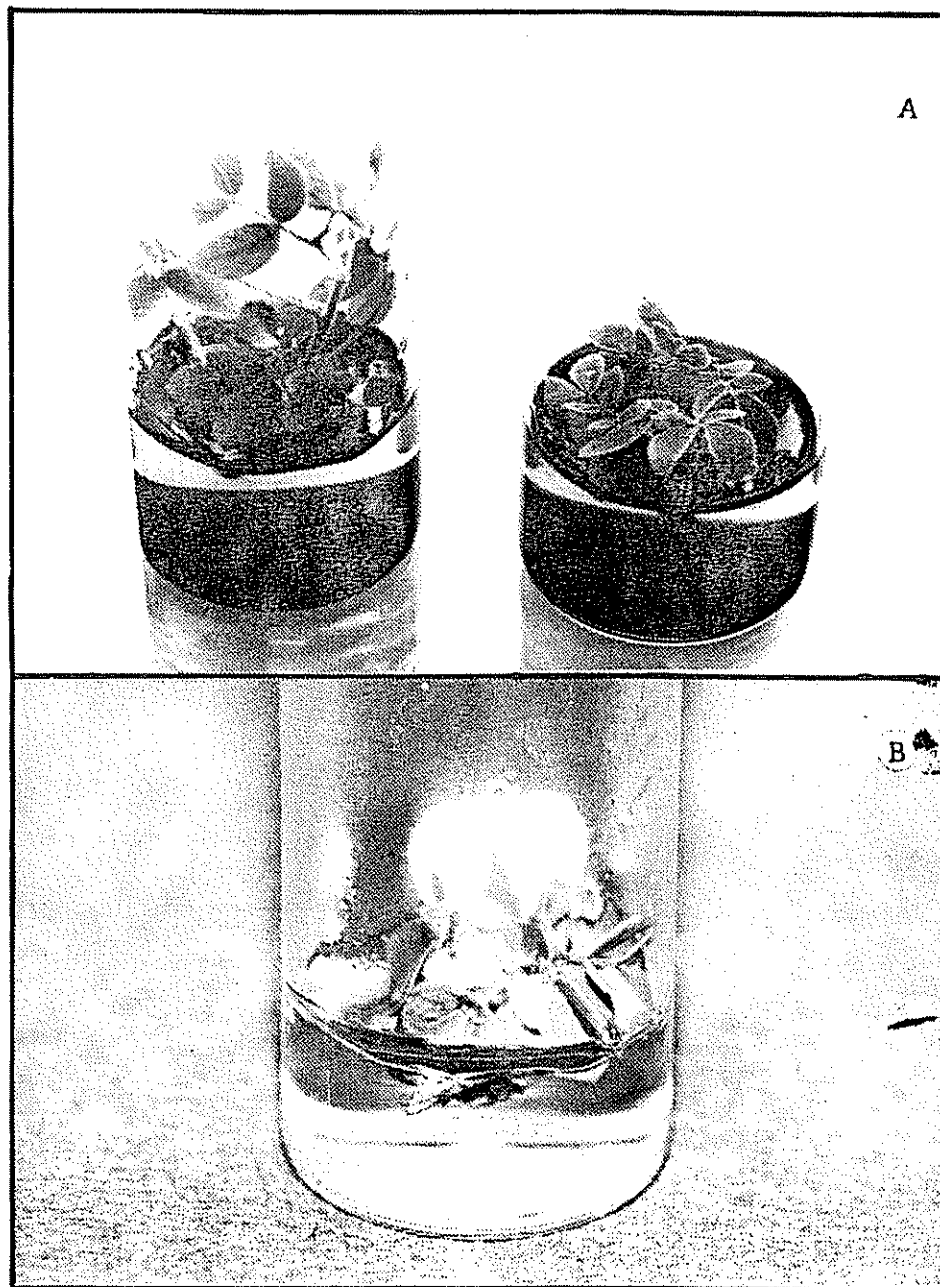


Fig.21. Crecimiento de brotes adventicios de *P. saman* en presencia de carbón activado (A) y En ausencia de éste (B).

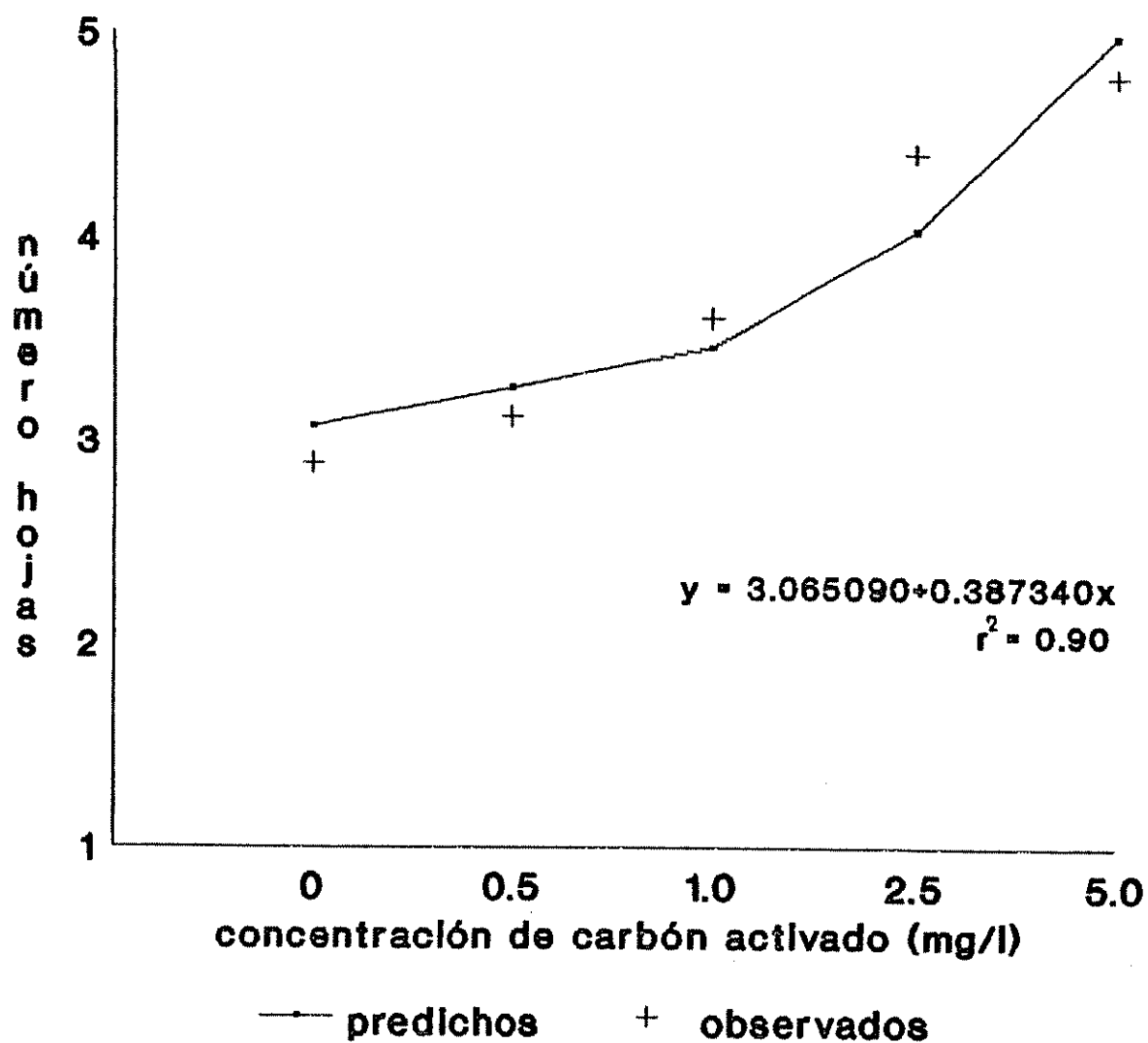


Fig.22. Efecto de la concentración de carbón activado sobre el número de hojas en brotes adventicios de *P. saman*

evidenciaron un desarrollo débil de una o dos hojas mal formadas (Figura 23A).

Aparentemente, mantener los brotes por un período de oscuridad de 12 días, afectó su desarrollo, ya que provocó senescencia de las hojas y los brotes tardaron en recuperar su color verde.

Con concentraciones altas de GA₃, hubo una ligera apertura del primordio foliar como si las hojas se fuesen a abrir, pero parece que llegan a un punto en que detienen el desarrollo y eventualmente se forma en las hojas y en la base el callo anteriormente descrito (Figura 23B).

4.6. Enraizamiento de las plántulas de *P. saman* obtenidas in vitro.

El período de enraizamiento en cenízaro fue relativamente corto. Desde los diez días de cultivo se observó un callo blanco que recubrió toda la base del tallo en contacto con el medio de cultivo. Entre los 14 y 17 días, se observó la presencia de nódulos blancos que en la mayoría de los casos parecieron emerger del callo o, directamente de la epidermis. Entre los 17 y los 30 días de cultivo, estos nódulos se alargaron y tomaron el aspecto característico de la raíz diferenciada.

Cuando las plantas de *P. saman* fueron tratadas con el AIB y se colocaron en el medio de cultivo para su posterior enraizamiento, tendieron a perder sus hojas y a renovarlas en este mismo período de cultivo.

4.6.1. Efecto de la concentración y del período de exposición al AIB, en la formación de raíces.

El AIB, fue efectivo para inducir raíces adventicias en los brotes de *P. saman*. El período de exposición al AIB fue altamente significativo al 1%, no en cambio las concentracio-

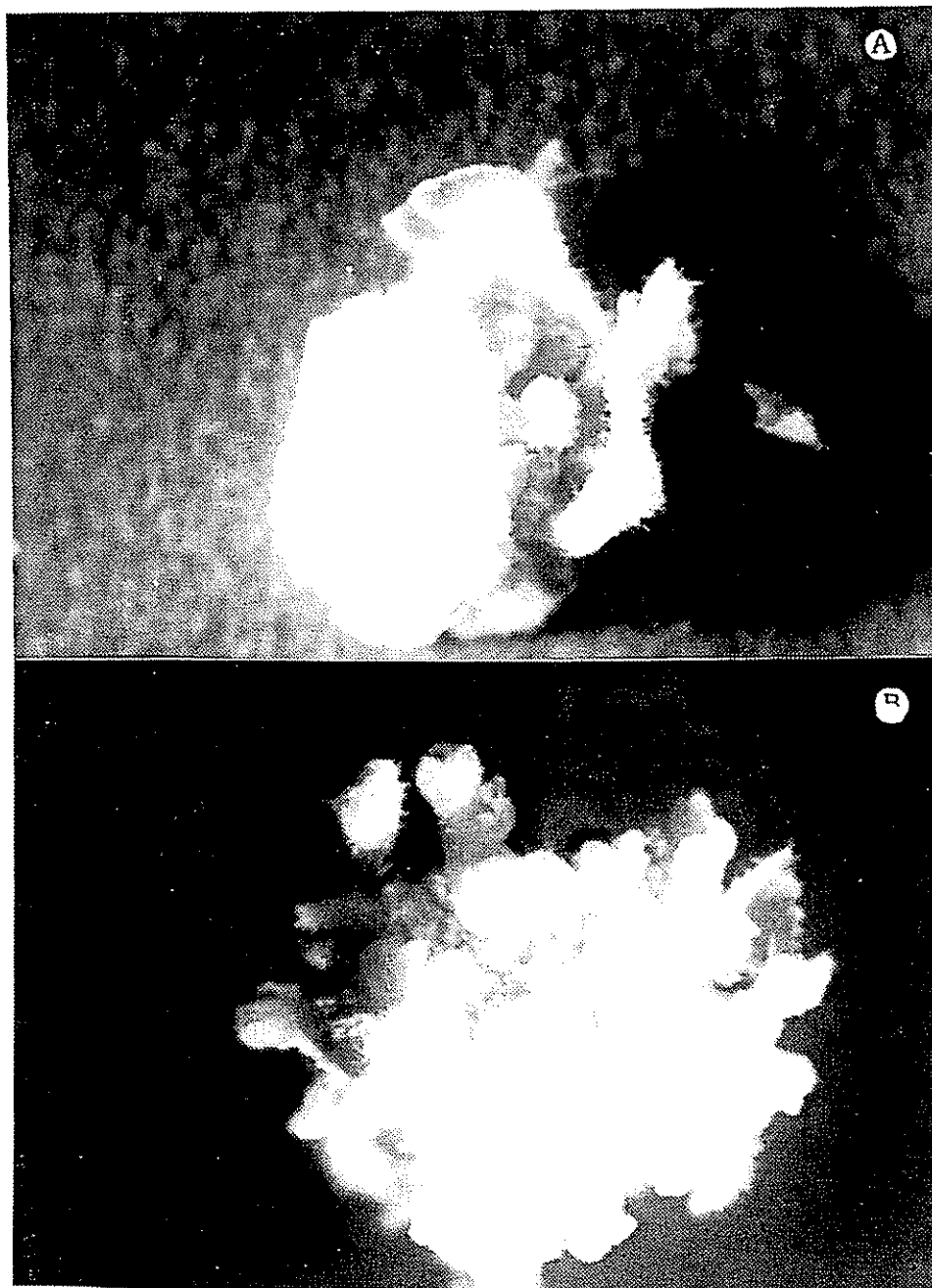


Fig.23. Desarrollo de brotes adventicios de *P. saman* en presencia de concentraciones bajas de GA₃ (A) y concentraciones altas (B).

nes de éste ni su interacción (Cuadro 18A). El efecto del periodo de exposición mostró una tendencia lineal negativa sobre el porcentaje de enraizamiento de los brotes. EL mayor porcentaje de enraizamiento (55%) se observó con un periodo de exposición de 24 horas y el menor porcentaje (24%) con 72 horas de exposición al AIB. Con 48 horas de exposición se presentó un 30% de enraizamiento (Figura 24).

No obstante que el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre las distintas concentraciones en los diferentes períodos de exposición al AIB, y en consecuencia no se encontró una concentración óptima; en la Figura 25 se puede observar que dicha concentración puede estar entre las concentraciones de 123.0, 246.0 y 369.0 μM de AIB; dado que en estas concentraciones se presentaron los porcentajes más altos de enraizamiento (55%, 63% y 50% respectivamente, para un periodo de exposición de 24 horas). Con una concentración de 492.0 mg/l de AIB, fue frecuente observar un necrosamiento o una pérdida del color en la base del tallo. Esto se presentó más en los brotes que se expusieron por 72 horas al AIB.

En las concentraciones menores de AIB como 123.0, 246.0 y 369.0 μM , se produjeron raíces más gruesas que las observadas a una concentración de 492.0 μM . A estas concentraciones también se observaron plantas con raíces más alargadas y un sistema radical más ramificado.

En la figura 26A se observan brotes enraizados con una concentración de 492 μM de AIB.

4.6.2. Origen y eventos involucrados con la formación de la raíz.

Los cortes transversales de la base del tallo, de las plantas de cenízaro, mostraron que a los cuatro días de cultivo, solo se observó un tallo típico en crecimiento secundario conformado por una médula, xilema, floema, cambium vascular, una corteza y externo a ella un anillo continuo de

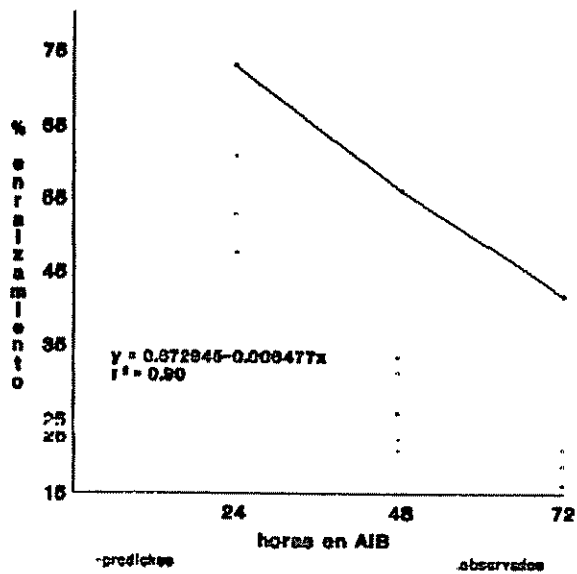


Fig.24. Efecto del periodo de exposición al AIB sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes adventicios de *P. saman*.

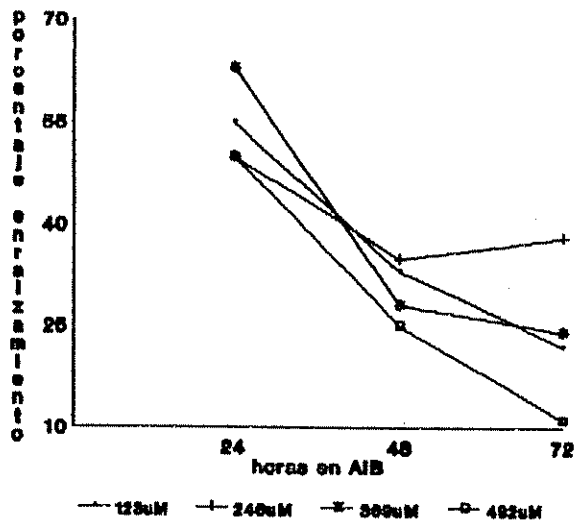


Fig.25. Porcentaje de enraizamiento de brotes adventicios de *P. saman* en diferentes concentraciones de AIB y períodos de exposición a éste

fibras y una peridermis (Figura 26B). A los ocho días de cultivo, se evidenciaron en el cambium vascular, zonas bastante densas de células redondeadas con mucho contenido citoplasmático y núcleos muy prominentes, las cuales conformaron los primordios radicales (Figura 26C). El crecimiento y el alargamiento de la raíz fue posible observarlo a los doce días de cultivo, en donde la raíz emergió hacia el exterior. A los 16 días de cultivo, se pudo observar una raíz bien formada con tejido vascular propio, el cual se conectó con el vástago (Figura 26D).

El corte transversal de la raíz, mostró una raíz pentarca en crecimiento primario formada por una médula, xilema, floema, una vaina amilífera, parénquima cortical y una rizodermis. Los cortes mostraron que el origen de la raíz se da a partir del cambium vascular y que el callo formado no intervino en la formación de la raíz.

4.7. Comportamiento en el invernadero de las plantas de *P. saman* provenientes de cultivo in vitro.

La mayoría de las plantas provenientes de organogénesis, al ser transferidas a tierra, perdieron sus hojas quedándoles solo el primordio foliar. No obstante, continuaron su crecimiento normal y los porcentajes de sobrevivencia logrados fueron del 95%. Aquellas plantas que mostraron un crecimiento mayor fueron las únicas que no presentaron caída de hojas. Estas plantas también evidenciaron un desarrollo mejor en condiciones de invernadero. La semilla botánica necesitó ser escarificada, de la misma forma en que se realizó la escarificación in vitro.

El crecimiento en ambos tipos de plantas durante el primer mes parece lento pero a partir de éste, las plantas muestran buena respuesta a las condiciones dadas. Bajo condiciones de invernadero, las plantas de cultivo in vitro

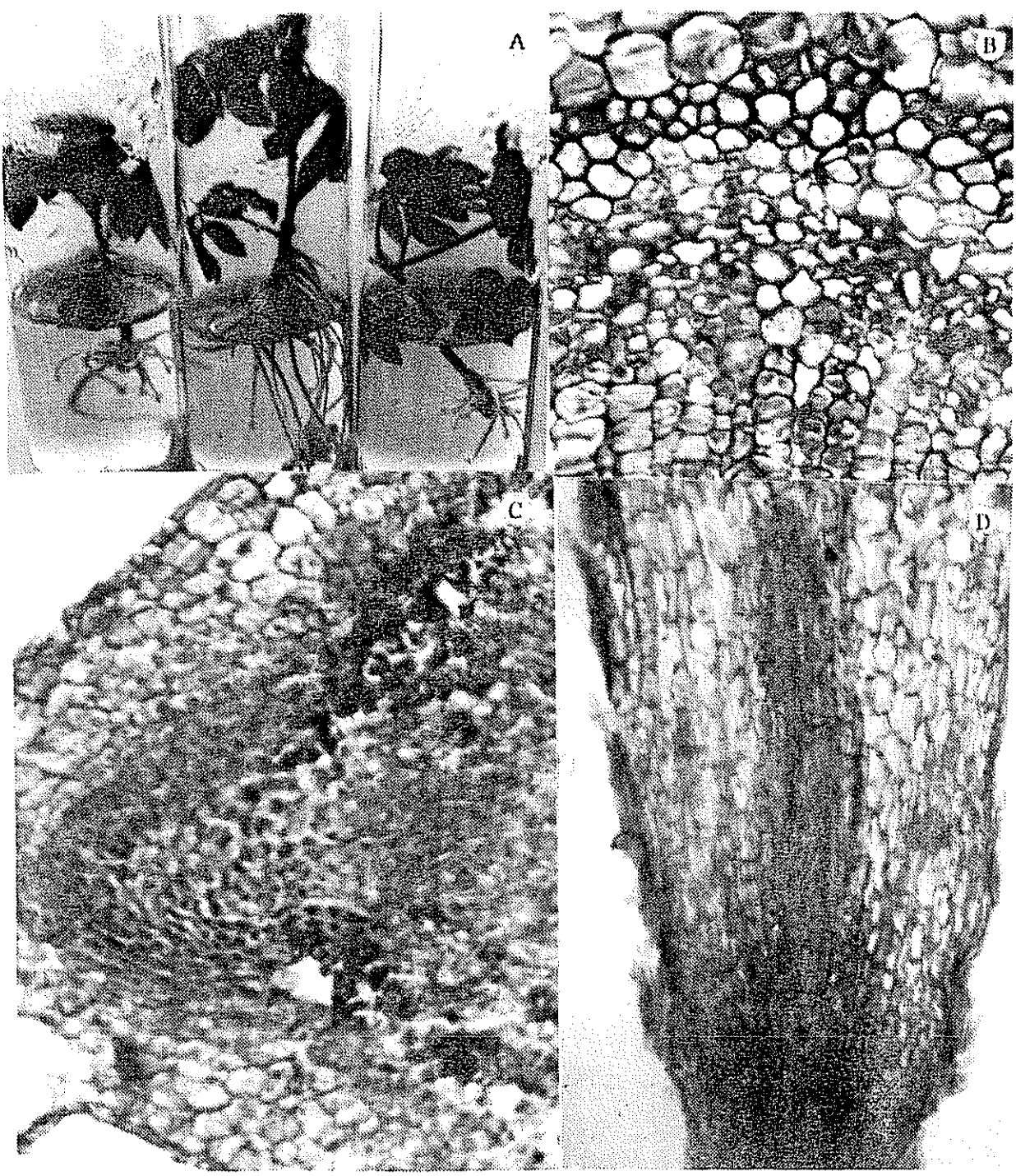


Fig.26. Brotes enraizados de *P. saman* en presencia de BA (A), Sección transversal de tallo de una planta de *P. saman* (B) 4x, Primordio radicular (C) 10x, Raiz bien formada la cual presenta su propio tejido vascular (D) 4x.

muestran un mejor crecimiento que las plantas de semilla botánica tanto en altura como grosor del tallo, número de hojas y amplitud de las ramas (variable no cuantificada). Sin embargo, el análisis estadístico del comportamiento de las plantas a los tres meses de edad en cuanto a número de hojas, diámetro del tallo y altura encontró diferencias significativas al 5% únicamente para la variable número de hojas (Cuadro 20A). Como se observa en la figura 27, para las plantas de cultivo in vitro el promedio de altura y de diámetro del tallo fue de 20.53 cm y de 3.058 cm, respectivamente. Las plantas de semilla botánica presentaron valores de 17.19 cm y 2.47 cm para altura y diámetro del tallo respectivamente. El número promedio de hojas fue de 7.3 en las plantas de cultivo in vitro y de 6.10 en las de semilla botánica (Figura 28).

Las figuras 29A muestran plantas de cultivo in vitro a los 4 meses de edad.

El sistema radical en ambos tipos de plantas fue muy semejante. Las raíces de las plantas in vitro también desarrollaron nódulos (Figura 29B), lo cual es característico en la familia Fabaceae.

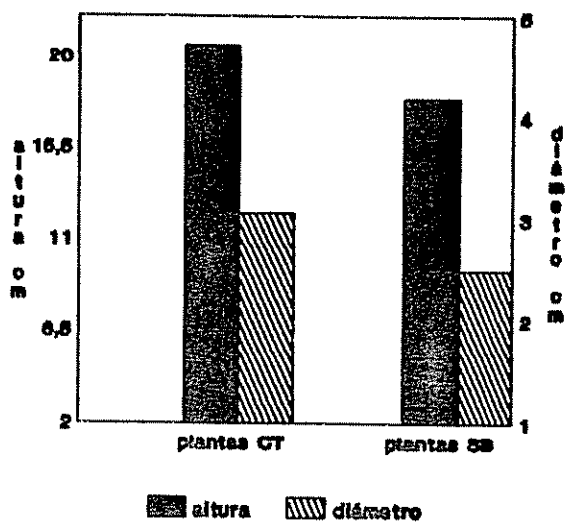


Fig.27. Crecimiento en altura, diámetro del tallo en plantas de cultivo de tejidos (CT) y de semilla botánica (SB) de *P. saman* en condiciones de invernadero a los tres meses de edad.

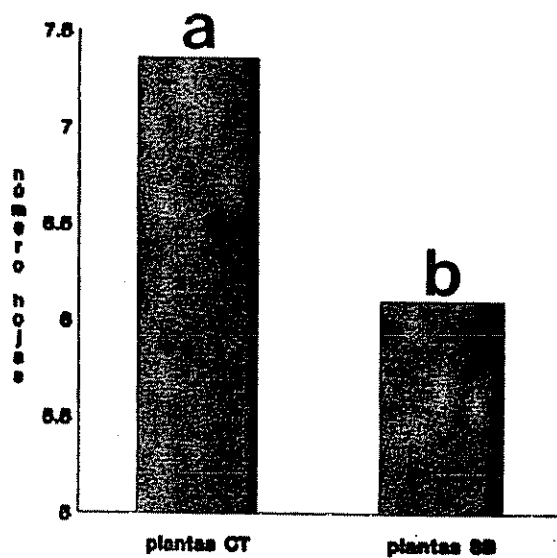


Fig.28. Número promedio de hojas observadas en plantas de cultivo de tejidos (CT) y de semilla botánica (SB) de *P. saman* en condiciones de invernadero a los tres meses de edad.



Fig.29. Plantas de *P. saman* provenientes de cultivo *in vitro* a los 4 meses (A), Plantas de origen somático (izquierda) mostrando la formación de nódulos en sus raíces (B).

5. DISCUSION

5.1. Inducción de la organogénesis

Especies como *Albizia guachapele*, *Swietenia macrophylla* y *Phitecellobium saman*, respondieron organógenamente a la presencia de BA en el medio de cultivo. En dichas especies, se formaron brotes adventicios que fueron capaces de desarrollarse. Otras especies maderables, como las coníferas, producen brotes adventicios en respuesta solo a citocinina exógena (Villalobos *et al.*, 1984). Se ha observado que las citocininas juegan un rol directo en las tasas relativas de división celular y diferenciación (Phillips, 1980). Algunos trabajos en otras especies han indicado que la bencil-aminopurina estimula la síntesis de proteínas, la formación de poliribosomas y los cambios cualitativos en el espectro de proteínas recién sintetizadas (Villalobos *et al.*, 1983).

En guayaquil, caoba, se observó la formación de protuberancias globulares que no diferenciaron ninguna estructura en particular. Los cortes histológicos de esas protuberancias evidenciaron que en la mayoría de los casos, estaban constituidas por el desarrollo de tejido vascular que no presentó un arreglo definido y en otros casos, toda la estructura estaba formada por un centro vascular bien definido. Chen y Galston (1967) citados por Thorpe (1980) pudieron desarrollar nódulos de *Pelargonium* formados a partir de callo de médula en un medio con auxina y citocinina, cuando los subcultivaron en un medio sin reguladores de crecimiento.

Para guayaquil y caoba, no se halló una concentración óptima de BA para inducir la organogénesis, dado que los brotes formados fueron pocos, aunque en todas las concentraciones se logró inducir éstos. Sin embargo, se puede decir que con los niveles de BA probados, para el caso

de guayaquil las concentraciones mejores fueron de 17.7 y 35.5 μM ya que en ellas se presentaron la mayor cantidad de brotes, promedio de brotes por explante, de brotes desarrollados y el mejor desarrollo de los brotes (principalmente a 35.5 μM).

En caoba, la mayor cantidad de brotes se obtuvo con 26.6 y 44.4 μM de BA.

Cedro fue la única especie que no respondió organógenamente a la presencia de BA, excepto con la formación de las estructuras nodulares anteriormente descritas. Esta especie, necesitó la adición de una auxina exógena como el ANA para expresar su potencial organogénico. Con cedro no es factible deducir cual fue la mejor combinación de BA y ANA, en vista de que la formación de brotes fue muy escasa y poco frecuente. Empero, en este estudio la mayor presencia de brotes formados (5 brotes) fue con 17.7 μM de BA y 5.3 μM de ANA.

Margara (1988), señaló que la caulogénesis depende de una relación óptima entre las concentraciones totales de citocininas y de auxinas exógena y endógena. La mayoría de los sistemas de cultivo de células requieren una suplencia exógena de auxinas pero existen excepciones como el cultivo de hipocotilo de *Picea glauca* (Campbell y Durzan, 1976). Esas diferencias en requerimientos hormonales probablemente reflejen diferencias en las concentraciones de hormonas endógenas presentes dentro del explante e indican que el balance auxina-citocinina debe tomar en cuenta el estado fisiológico del explante (Biondi y Thorpe, 1983).

Villalobos et al. (1983), mencionan que aún los limitados conocimientos sobre contenidos endógenos de hormonas y su mecanismos de acción, las variaciones auxina-citocinina no siempre anteceden a la formación de órganos. Estos últimos, observaron que otros factores físicos y

químicos desempeñan un papel importante en el control y regulación de la morfogénesis.

Los resultados obtenidos con estas tres especies, muestran que éstas tienen gran potencial para ser micropropagadas in vitro mediante organogénesis pero sus requerimientos in vitro necesitan ser optimizados.

Phitecelobium saman fue una especie que mostró una gran respuesta organogénica en presencia de BA.

La concentración del medio MS mostró un efecto significativo sobre el número de brotes promedio y promedio de brotes por explante, los cuales aumentaron con la concentración del medio de cultivo. Von Arnold y Erickson (1981), indicaron que tanto el medio de cultivo como su concentración son muy importantes para obtener un alto rendimiento de brotes adventicios. Al respecto, George y Sherrington (1984) mencionan que el crecimiento y la morfogénesis de los cultivos de tejidos está marcadamente influenciado por la disponibilidad de nitrógeno y la forma en la cual éste está presente. Tanto el nitrato como el amonio son dos formas del nitrógeno generalmente consideradas a ser más importante para el cultivo de tejidos de plantas. El medio Murashige y Skoog está caracterizado por un contenido fuerte de nitrógeno (60 meq/l, aproximadamente) del cual $\frac{2}{3}$ está aportado en forma reducida (NH_4^+) y por una concentración igualmente elevada en potasio (Margara, 1988).

En varias especies de gimnospermas, se ha documentado la influencia que tiene la formulación de las sales sobre la morfogénesis. Así por ejemplo, en *P. strobus*, una alta relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ favoreció la caulogénesis (Webb et al., 1988). Senawi y Tamin (1988), mencionan que las especies leñosas prefieren una formulación de nutrientes baja en concentraciones de sales.

La organogénesis en cenizaro fue posible hasta con un MS al 25% pero la respuesta fue mejor conforme incrementó la

concentración del medio. Parece obvio que en esta especie dicho proceso morfogénico necesita de altos requerimientos en la concentración de los nutrimentos y específicamente altos requerimientos de nitrógeno.

La interacción efecto de la concentración del medio MS y de la concentración de BA fue significativamente relevante sobre el número de brotes adventicios formados. Con una concentración de MS del 25%, la mejor concentración fue de 17.7 μM de BA, y con un MS a la mitad de 26.6 μM de BA. El MS al 75% mostró el mayor valor a una concentración de 8.8 μM de BA, seguido por la de 35.5 μM . A 17.7 μM de BA se observó una disminución del número de brotes lo cual puede deberse a la heterogeneidad de la semilla utilizada ya que no fue seleccionada durante su colecta en el campo ni para este estudio. El MS completo mostró los mejores resultados con una concentración de 35.5 μM y fue la concentración en la que se observó la mayor proliferación de brotes adventicios.

Fue clara una tendencia del BA a aumentar su efecto sobre la formación de brotes cuando se incrementó la concentración del medio MS, observándose un ámbito óptimo entre 26.6 y 35.5 μM de BA.

En todas las concentraciones de medio 44.4 μM presentó un bajo número de brotes.

5.2. Eventos anatómicos asociados con la formación de los brotes adventicios

Las cuatro especies estudiadas mostraron el mismo patrón de formación de brotes. En todas, se dio una organogénesis directa sin previa formación de callo, excepto para cenizaro en la cual, algunos brotes se originaron de callo.

Los eventos morfogénicos tuvieron su origen en las células del parénquima de la corteza, las cuales comienzan a diferenciarse de sus compañeras por su forma y contenido hasta formar mediante divisiones sucesivas un centro

meristemático o meristemoide que paulatinamente va formando un primordio hasta diferenciar un brote adventicio.

Las características que presentaron las células que formaron los órganos de novo, coincidieron con las descritas por Thorpe (1980) y por Villalobos et al (1984) así como los eventos morfogénéticos.

En cenizaro, los brotes también se originan de células de parénquima de la médula.

5.3. Organogénesis en *Phitecellobim saman*

5.3.1. Influencia de la edad del explante en la inducción de la organogénesis

La edad del explante fue un factor de importancia en el número de brotes adventicios y su desarrollo. El número de brotes fue mayor en explantes de 5, 10 y 15 días después de la germinación. Los explantes de 15 y 20 días presentaron muchos brotes vitrificados y estructuras nodulares que posiblemente hayan sido brotes que no lograron diferenciarse. Con explantes de 5, 10 y 15 días, se observó el mejor desarrollo de los brotes adventicios. Dichos brotes, presentaron un mayor alargamiento de los entrenudos.

En algunas especies, la edad del explante ha sido un factor importante en regular la organogénesis. Los tejidos juveniles presentan frecuentemente una mayor aptitud para la organogénesis, que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes (Villalobos et al., 1983; Margara, 1988). En *Pinus canariensis*, Martínez et al. (1990), observaron que la capacidad de formar brotes disminuyó gradualmente con la edad y el tamaño del explante. Los cotiledones de embriones germinados de 3 ó 4 días de edad fueron más eficientes formando brotes. Villalobos et al. (1984) encontraron que en *Pinus radiata* los explantes de cotiledones de 5 y 7 días, fueron los más eficientes.

Similarmente, con *P. strobus*, Webb et al., (1988) observaron que los cotiledones de embriones cultivados por 5 y 7 días fueron más caulogénicos. Después de siete días de cultivo de embriones, el potencial caulogénico de los cotiledones declinó y se mantuvo constante hasta los 28 días. Por su parte, Goldfarb et al. (1991) hallaron que los cotiledones de las plántulas más jóvenes produjeron más brotes. La vitrificación de los brotes frecuentemente ocurre durante el cultivo in vitro y parece que son muchos los factores que intervienen en el fenómeno. Factores como las bajas concentraciones de agar (Debergh et al., 1981) alta humedad en el medio de cultivo (Aitken et al., 1981) y concentraciones altas de citocininas en combinación con concentraciones bajas de agar (Debergh, 1983).

5.3.2. Influencia de la parte proximal, intermedia y distal del explante de hipocotilo de *P. saman* sobre la capacidad organógena

La sección proximal e intermedia del explante es la más idónea para lograr gran cantidad de brotes y asegurar la obtención de mayor porcentaje de explantes con brotes. La parte intermedia presentó mayor cantidad de brotes desarrollados que las otras dos secciones de hipocotilo. Estos resultados obtenidos confirman la idea de que existe un gradiente de polaridad a lo largo del hipocotilo.

La sección proximal e intermedia es la parte inmediata a la zona de los cotiledones de la plántula. Como es sabido, las citocininas se transportan acrópetamente y las auxinas basipetamente. Puede que en esta zona cercana a los cotiledones exista un mayor contenido de reguladores de crecimiento y de otros factores que pueden intervenir en la formación de brotes adventicios lo cual permita que se mantengan más activas organogénicamente.

La sección distal aunque formó brotes, tendió más hacia la formación de callo.

Webb et al., (1988) con *P. strabus* observaron que la formación de los brotes fue altamente polar ya que la mayoría se originó de la porción apical del hipocotilo y hubo una pérdida basipetal de la capacidad caulogénica.

La polaridad morfológica es debida al transporte polarizado de sustancias de crecimiento (auxinas, etc.) e incluso ligada a una polaridad a nivel celular (Phillips, 1980).

5.3.3. Influencia de la posición del explante de *P. saman* sobre la inducción de brotes adventicios.

La posición del explante fue un factor importante para el porcentaje de explantes formadores de brotes, el número de brotes adventicios y de brotes desarrollados. Aparentemente, en la posición vertical hay un traslado de auxinas hacia la base del explante lo cual conduce a una excesiva formación de callo en la parte distal del explante. La expresión de los brotes tarda más tiempo que en la posición horizontal quizás debido a que la única vía de transporte del BA sea mediante el tejido vascular, ya que en la posición horizontal puede darse por medio de difusión.

Existe una marcada polaridad dentro del explante ya que es en el extremo proximal donde se forman los brotes y muy ocasionalmente en el extremo distal. Esto es más evidente cuando se coloca el explante en posición vertical con su extremo proximal en contacto con el medio de cultivo; los brotes se forman en ésta parte del explante y no en el extremo superior.

Hay evidencia que los gradientes polarizados de fitohormonas influyen en los patrones de regeneración (Vardjan y Nitsch, 1961). El movimiento polar de auxinas se ha implicado también en la distribución de los centros de

división en segmentos de tallo cultivados de *Torella fournieri* (Chylah et al., 1975). Además, el contenido de fitohormonas endógenas puede ser crítico para la regeneración de órganos (Bonnett y Torrey, 1965).

5.3.4. Efecto del período de exposición de los explantes de *P. saman* a la BA.

Los explantes que estuvieron expuestos a la BA por 7 días, mostraron el mayor porcentaje de explantes que formaron brotes adventicios y la mayor cantidad de brotes formados. No obstante, no se encontraron diferencias significativas con los otros períodos de exposición (14, 21 y 28 días). El número de brotes desarrollados sí mostró ser significativo ($p < 0.01$) para los explantes que se expusieron durante 7 días a la BA.

Estos resultados sugieren que en cenizaro, 7 días de exposición a la BA son suficientes para que los procesos morfogénicos se lleven a cabo y se obtenga buena formación de brotes.

La diferencia significativa observada con este período sobre el número de brotes desarrollados, pone en evidencia que estos brotes adventicios no necesitan la suplencia exógena de la BA para que se dispare su crecimiento y que, una vez determinados los eventos morfogénicos que conducen a la organogénesis, los brotes son capaces de diferenciarse y desarrollarse.

Los resultados observados coinciden con los encontrados por otros autores. Así por ejemplo, Villalobos et al. (1984), con *Pinus radiata* observaron que tres días de exposición a la BA fue suficiente tiempo para desencadenar los procesos morfogénicos que conllevan a la formación de órganos en esa especie.

Con cotiledones de *Pinus canariensis*, Martínez et al. (1990) observaron que la exposición al BA afectó el número de

brotos y la calidad y la subsecuente tasa de crecimiento de los brotes producidos. El período óptimo de cultivo en presencia de BA fue entre 2 y 3 semanas. Las exposiciones prolongadas al BA aumentó la formación de callo y condujo a la producción de brotes que no crecieron. Webb *et al.* (1989) con *P. strobus*, obtuvieron una óptima caulogénesis con 10 μM de BA por 21 días.

Aunque el BA es indispensable en la fase de inducción de brotes adventicios para cenizaro, éste no muestra ningún efecto sobre el desarrollo de dichos brotes. La presencia de BA en el medio de desarrollo indujo a una excesiva formación de callo traslucido en el brote.

5.4. Desarrollo de los brotes adventicios de *P. saman*

5.4.1. Efecto de la concentración del carbón activado sobre el desarrollo de los brotes adventicios de *P. saman*

El carbón activado tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el desarrollo de los brotes adventicios. Hubo una respuesta lineal positiva ($r^2 = 90$) de la concentración de carbón activado sobre el número de hojas. El mayor número de hojas y el mejor crecimiento de las plantas se observó con una concentración de 5 g/l de carbón activado.

El efecto positivo del carbón activado del carbón sobre el crecimiento es similar al que se ha observado en varias otras especies leñosas (Boulay, 1979; Favre y Juncker, 1987; Enjalric y Carron, 1982).

El efecto específico del carbón activado sobre el desarrollo de las plantas se desconoce. Sin embargo, se le ha asociado con la adsorción de compuestos secretados por los tejidos cultivados o que están presentes en el agar y que podrían inhibir el crecimiento.

Otra particularidad importante es que remueve reguladores de crecimiento del medio de cultivo, particularmente las auxinas.

Como el carbón activado es madera carbonizada, es posible que dependiendo del tipo de madera su efecto en el medio de cultivo sea diferente en las diferentes especies. Von Arnold y Erickson (1981) observaron que el carbón activado de coníferas mejora significativamente el alargamiento de los brotes con *P. strobus* y produce un resultado similar con otras coníferas. Horgan (1987), señaló que el carbón activado promovió el alargamiento de los cotiledones pero aceleró su senescencia.

Algunos autores sugieren que el carbón activado contiene poliaminas que pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de eventos morfogénicos. Dichas poliaminas se derivarían de la madera carbonizada.

5.4.2. Efecto de la concentración de GA_3 sobre el desarrollo de los brotes adventicios

A pesar de que en algunas especies se ha informado del papel que tiene el GA_3 en el alargamiento y desarrollo de los brotes (Hu y Yang, 1983; George y Sherrington, 1984; Margara, 1988), en este caso para cenizaro, ninguna de las concentraciones de GA_3 probadas, tuvo un efecto positivo. Por tanto, se puede prescindir de él en el medio de cultivo. En otras especies como *Pinus strobus*, se ha observado un poco efecto del GA_3 sobre el crecimiento de embriones (Minocha, 1978). Villalobos et al., (1983) mencionan que teóricamente el ácido giberélico (GA_3) favorece el alargamiento de los entrenudos; sin embargo, en coníferas no ha mostrado ningún efecto.

5.5. Enraizamiento de los brotes adventicios de *P. saman*

5.5.1. Efecto del periodo de exposición y la concentración de AIB sobre el enraizamiento de brotes adventicios.

El periodo de exposición al AIB fue un factor limitante sobre el porcentaje de enraizamiento. El porcentaje de enraizamiento de los brotes presentó un comportamiento lineal negativo ($r^2=0.90$) con respecto al tiempo de exposición. Exposiciones de más de 24 horas al AIB reducen el porcentaje de enraizamiento. Esto también fue corroborado cuando se dejaron los brotes en presencia de AIB durante todo el periodo de enraizamiento, las plantas no crecieron y perdieron su color verde oscuro tornándose de un color verde amarillento. La parte del tallo en contacto con el medio tomó una coloración blanca. Este efecto fue mayor a concentraciones altas de AIB (492 μM de AIB).

Las concentraciones de AIB no mostraron un efecto significativo sobre el porcentaje de enraizamiento. Este mostró además un comportamiento muy inconsistente en las diferentes concentraciones. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos se puede considerar que la concentración óptima de AIB está entre 123 y 329 μM , donde se obtuvieron los mayores porcentajes de enraizamiento (24-63%).

Leakey (1985) menciona que la capacidad de enraizamiento varía entre especies de árboles, entre clones dentro de las especies y entre plantas dentro de clones. El componente genético de esta variabilidad puede atribuirse algunas a: a) una carencia de auxinas endógenas, fenoles u otros cofactores de enraizamiento, b) una falta de enzimas o sus activadores para la síntesis de complejos fenoles-auxinas, c) la presencia de inhibidores y d) la presencia de enzimas que degradan auxinas o sus cofactores.

5.5.2. Eventos anatómicos asociados con la formación de las raíces adventicias

El primer evento asociado con la formación de la raíz adventicia es una serie de divisiones que se observan en la región del cambium vascular. Estas divisiones son observables desde los 4 días de cultivo y culminan con la formación de primordios radicales que a la vez que emergen hacia la corteza van diferenciando sus tejidos característicos hasta conformar una raíz bien definida.

Cuando las raíces adventicias se originan de tejidos profundos como el cambium, las células que las originan sufren una desdiferenciación que conduce a la formación de células meristemáticas primarias (Margara, 1988). Lovell y White (1986), encontraron que para los tallos de plantas leñosas hay relativamente pocos lugares donde se pueda formar el primordio radical, mencionando a los rayos adyacentes al floema y cambium, o en las lagunas foliares. Otros autores indican que el primordio radical puede originarse de la epidermis, la corteza, el periciclo, el parénquima de los rayos, el floema, el cambium y la médula del tallo.

Se han hecho muy pocos estudios histológicos de las raíces en tallos de angiospermas enraizadas in vitro, a pesar de que el proceso in vivo se tiene bien documentado (Hicks, 1987).

5.6. Crecimiento de las plantas de *P. saman* en el invernadero

Las plantas no presentaron problemas para su crecimiento en el invernadero. Estas crecieron normalmente y se comportaron similarmente a las plantas originadas de semilla botánica. Tanto en altura como en diámetro del tallo no se detectaron diferencias estadísticas entre unas y otras. No obstante, se observó un mayor crecimiento de las plantas de origen somático. El número de hojas si fue

significativamente mayor en estas últimas a la vez que éstas mostraron una mayor amplitud.

Estas diferencias que no se detectaron, pueden deberse a un comportamiento heterogéneo observado en las plantas somáticas debido a que no se hizo una selección por tamaño, número de hojas y de raíces cuando éstas fueron transferidas al invernadero.

No se observaron diferencias morfológicas entre un tipo de plantas y otro. El sistema radical de las plantas somáticas fue idéntico a las de semilla botánica. Tanto que fueron capaces de desarrollar gran cantidad de nódulos en sus raíces. El sistema radical fue muy ramificado y voluminoso. En algunos casos se observó que las plantas que mostraron pocas raíces una de ellas crece gruesa como si fuera una raíz pivotante y las otras logran un desarrollo mínimo.

5.7. Etapas en la propagación in vitro para *P. saman* a partir de explantes de hipocotilo

Con este trabajo se logró establecer una metodología de propagación in vitro por medio de organogénesis para cenizaro. La fase de inducción se realiza en un periodo de 30-40 días; la mejor concentración del medio es un MS completo o a la mitad de su concentración, en combinación con 26.6 ó 35.5 μM de BA. El mejor explante para formar brotes es la sección proximal o intermedia de hipocotilos de 5 a 15 días de germinados y en posición horizontal sobre el medio de cultivo. La fase de desarrollo de los brotes requiere de 5 g/l de carbón activado en el medio de cultivo y puede hacerse en un periodo de 2 a 3 semanas. Para la fase de enraizamiento se requiere la presencia de AIB en concentraciones de 123-329 μM y se puede realizar por un periodo de 40 a 60 días. La aclimatación de las plantas se lleva a cabo en un invernadero durante 3 ó 4 meses para ser trasladadas a condiciones de campo periodo en el cual su

sistema foliar y su sistema radical están bien formados. El tiempo que se necesita para llevar las plantas desde la fase de inducción hasta el campo es de aproximadamente 5 ó 6 meses.

5.8. Perspectivas de la micropropagación en especies forestales

Se puede decir que las técnicas de cultivo de tejidos son una herramienta para la Ingeniería Genética de los árboles. El uso de la ingeniería genética para mejorar genotipos superiores seleccionados puede tener un impacto significativo en la tasa de mejoramiento genético en especies forestales (Ellis et al 1991). Los métodos de la ingeniería genética van a permitir poder introducir genes de interés comercial en esas especies al igual que en otros cultivos. Dichos genes pueden ser transferidos usando *Agrobacterium* como vector o bien, otros sistemas funcionales como la electroporación y la balística (Ledig, 1989).

6. CONCLUSIONES

Con base al material y la técnica utilizada se concluye:

1. El cultivo in vitro de explantes de hipocotilo permitió establecer una metodología de propagación mediante organogénesis para *Pithecellobium saman*. Los resultados observados con *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* y *Swietenia macrophylla*, indican que éstas también se pueden propagar in vitro por organogénesis pero necesitan ser más estudiadas.
2. Para la inducción de brotes adventicios en cenizaro, la concentración del medio MS y de BA son dos factores de importancia. Un medio MS completo en combinación con 26.6 ó 35.5 μM de BA, proporcionaron la mayor cantidad de brotes adventicios.
3. La edad del explante afectó el número de brotes formados. Los explantes con 5, 10 y 15 días después de la germinación fueron la mejor fuente de explante para la inducción de brotes en *P. saman*.
4. El explante en posición horizontal favoreció el número de brotes y el desarrollo de los brotes adventicios en *P. saman*.
5. La sección del hipocotilo utilizada como explante influyó sobre el número de brotes y el desarrollo de los brotes formados. La sección proximal e intermedia presentaron el mejor comportamiento.
6. Para que los eventos morfogénicos ocurran en cenizaro, es suficiente siete días de exposición de los explantes a la BA.

7. En el desarrollo de los brotes de cenizaro, el carbón activado en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento mostró un efecto positivo. La mejor concentración de carbón activado resultó ser la de 5 g/l.

8. El ácido giberélico en concentraciones de 1.4, 2.8, 4.3, 5.7 μM y 144.4, 288.8, 4.33 μM manifestó un efecto negativo sobre el desarrollo de los brotes. Se continuó desarrollando brotes sin GA_3 .

9. En la fase de enraizamiento de los brotes el ácido indolbutírico evidenció una respuesta lineal negativa. Un periodo de exposición de 24 horas al AIB produjo el mayor porcentaje de plantas enraizadas (67%).

10. El porcentaje de enraizamiento no presentó diferencias significativas al 5% de significancia, entre las diferentes concentraciones de ácido indolbutírico probadas.

11. En condiciones de invernadero, las plantas originadas mediante organogénesis mostraron un crecimiento y desarrollo de órganos continuo y similar a las plantas originadas de semilla botánica. Las plantas de origen somático presentaron un crecimiento mayor que las otras empero, solo el número de hojas fue estadísticamente significativo al 5% de significancia.

12. El estudio histológico mostró que en guayaquil, caoba y cedro, los brotes adventicios se originan del parénquima medular o bien a partir de callo originado en la región de la corteza. El origen de la raíz adventicia en los brotes de cenizaro es a partir del cambium vascular.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda en futuras investigaciones:

1. Estudiar más los factores físicos y químicos que intervienen en los procesos organogénéticos de las especies en estudio (tipos de medio de cultivo, reguladores de crecimiento y su concentración, tipo de solidificante etc.).
2. Realizar una selección in vitro de las plantas que son transferidas al invernadero para su aclimatación, con el propósito de tener un material más uniforme.
3. Realizar una selección de la semilla o planta de la cual se va a extraer el explante.
4. Desarrollar una metodología de micropropagación utilizando las yemas axilares de los brotes adventicios a través de transferencias y desarrollo de dichas yemas.
5. Evaluar en el campo el comportamiento de las plantas obtenidas por medio de organogénesis in vitro
6. Utilizar explantos de árboles maduros seleccionados los cuales pueden ser rejuvenecidos mediante técnicas como injertaciones sucesivas u otros métodos que permitan rejuvenecer los tejidos.

8. LITERATURA CITADA

- AITKEN, J.; HORGAN, K.J.; THORPE, T.A. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Canadian Journal Forestry Research (Canada) 11:112-117.
- ALVARENGA, S.; FLORES, E. 1988. Morfología y germinación de la semilla de caoba *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). Revista Biología Tropical (C.R.) 36(2A):261-267.
- BALL, E. 1950. Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervirens*. Growth (EEUU) 14:295-325.
- BARGHCHI, M. ALDERSON, P.G. 1983. *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. from seedling tissues. Journal of Horticultural Science (Copenhagen) 58(3):435-445.
- BARKER, P.K.; DE FOSSARD, R.A.; BOURNE, A. 1977. Progress towards clonal propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. Proceeding International Plant Propagators Society. pp. 27.
- BERBEE, F.M.; BERBEE, J.G.; HILDEBRANDT, A.C. 1972. Induction callus and trees from stem tip cultures of a hybrid poplar. *In vitro* 7:269.
- BIONDI, S.; THORPE, T.A. 1982. Clonal propagation of forest tree species. In Rao A.N. COSTED Symposium on tissue culture of economically important plants. Singapore. pp. 197-204.
- BONNETT, H.; TORREY, J. 1965. Chemical control of organ formation in root segments of *Convolvulus* cultured *in vitro*. Plant Physiology (EEUU) 40(5):1228-1236.
- BOULAY, M. 1979. Propagation *in vitro* du Douglas par micropropagation de germination aseptique et culture de bourgeons dormants. AFOCEL, Etud. Rec., 12:67-75.

- BOULAY, M. 1987. In vitro propagation of Tree Species. In: Green, C.E.; Somers, W.P.; Hackett, D.D.; Giesboer, A. Plant Tissue and Cell Culture. Inc. New York. pp. 360-367.
- CAMPBELL, R.A.; DURZAN, D.J. 1976. Vegetative propagation of *Picea glauca* by tissue culture. Canadian Journal Forestry Research (Canada) 6(6):240-243.
- CHALUPA, V. 1974. Control of root and shoots formation and production of trees from poplas callus. Biology Plantarum (Praha) 16(4):316-320.
- CHALUPA, V.; DURZAN, D.J. 1973. Growth of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) tissue and cell culture. Commun. Institute Forestalis Chechoslov (Checosl.) 8:111-125.
- CHENG, T.Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsuga menziessii* (Mirb.) Franco. Plant Science Letters (Netherlands) 4(2):97-102.
- CHRISTIANSON, M.L. 1987. Casual events in Morphogenesis. In: C. E. Green, D. A. Sommers, W. P. Hackett, D. D. Biesbeer. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss. New York. pp. 45-55.
- CHYLAH, H.; TRAN THANH VAN, M. 1975. Distribution pattern of cell division centers on the epidermis of stem segments of *Torenia fournieri* during de nove bud formation. Plant Physiology (EEUU) 56(1):28-33.
- COMISION CENTROAMERICANA DE AMBIENTE Y DESARROLLO. 1991. Plan de Acción Forestal Tropical para Centroamérica. Documento Base. 113 p.
- CRESSWELL, R.J.; NITSCH, D. 1975. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. Planta (Berl.) 125:87-90.
- CRIZALDO, E. 1980. Tissue culture of fast-growing trees. Sylvatrop Phillipine Forestry Resources Journal (Filipinas) 5(2):123-138.

- D'AMATO, D.F. 1977. Citology, Citogenetics, and Plant Breeding. In: J. Reinert; Y.P. Bajaj. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, New York. pp. 343-357.
- DAHAWAN, V.; BHOJWANI, S.S. 1985. In vitro vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. Plant Cell Reports (EEUU) 4(6):315-318.
- DATTA, S.K.; DATTA, K.; PRAMANIC, T. 1983. In vitro multiplication of mature trees of *Dalbergia sisso* ROXB. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Netherlands) 2(1):15-20.
- DEBERGH, P.; HARBAQUI, Y.; LEMEUR, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolynus*): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potencial. Physiologia Plantarum (Copenhagen) 53(1):23-29.
- DEBERGH, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiology Plantarum (Copenhagen) 59(2):270-272.
- DE FOSSARD, R.A. DE; BARKER, P.A. 1978. The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. Acta Horticultural 78:157.
- DHAWAN, V.; BHOJWANI, S. 1985. In vitro propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. Plant Cell Reports (EEUU) 4(6):315-318.
- DURZAN, D.J. 1983. Special problems: adult vs juvenile explants. In: W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Amminato, Y. Yamada. Handbook of Plant Cell Culture. Vol 2. Crop Science. pp. 471-504.
- DURZAN, D.J.; CHALUPA, V. 1975. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*P. banksiana*) 3. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. Canadian Journal of Botany (Canada) 54(516):416-457.

- DURZAN, D.J.; GUPTA, P.K. 1987. Biotechnology of Somatic Polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Biotechnology (EEUU)* 5:147-151.
- DURZAN, D.J.; LOPUSHANSKI, S.M. 1975. Propagation of American elm via cell suspension cultures. *Canadian Journal Forestry Research (Canada)* 5:273.
- DUSTAN, D.I. 1988. Prospects and progress in conifer biotechnology. *Canadian Journal Forestry Research (Canada)* 18:1497-1506.
- ELLIS, D.D.; McCABE, D.; RUSSELL, D.; MARTINELL, B.; McCOWN, B.H. 1991. Expression of inducible angiosperm promoters in gymnosperm *Picea glauca* (White spruce). *Plant Molecular Biology (Netherlands)* 00:000-000.
- ENJALRIC, F.; CARRON, M.P. 1982. Microbouturage in vitro de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* (Kunth, Mull. Arg.) CR Academic Scien Paris. Series 111. pp.
- FAVRE, J.M.; JUNCKER, B. 1987. *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Netherlands)* 8(1):49-60.
- FEBVRE, E. 1981. Froid et croissance de boutures de saules (*Salix babylonica* L.) cultivées *in vitro*. Proceedings International Workshop on *in vitro* cultivation of forest tree species. Fontaine bleau 31 agosto-september, 1981. France 115-118.
- FLORES, J. 1985. Diagnostico del sector Industrial forestal. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San Jose, C.R. 115 p.
- FRANCLLET, A. 1989. Biotechnology and the Genetic Improvement of Trees. *In: Plant Biotechnologies for developing countries. Proceedings of an International Symposium by CTA and FAO. Luxembourg, 26-30 june, 1989.* pp. 263-278.

- GEORGE, F.G.; SHERRINGTON, D.P. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Inglaterra, Exegetics. 177 p.
- GHARYAL, P.K.; MAHESWARI, S.C. 1983. *In vitro* differentiation from tissue cultures of *Albizia lebebeck*. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Netherlands) 2(1):49-53.
- GINGAS, V.M.; LINEBERGER, R.D. 1989. Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus rubra*. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Netherlands) 17(3):191-203.
- GIROUARD, R. 1974. Propagation of spruce by stem cuttings. New Zeland Journal Forestry Science (New Zel.) 4:140-149.
- GOLDFARB, B.; STRAUSS, S.; HOWE, E.; ZAERR, J. 1991. Transient gene expression of microprojectile-introduced DNA in Douglas-fir cotyledons. Plant Cell Reports (EEUU) 10(10):517-521.
- GRIZZLE, J.E.; STARMER, C.F.; KOCH, G.G. 1969. Analysis of categorical data by linear models. Biometrics. 25(1-4):489-504.
- GUPTA, P.K.; DURZAN, D.J. 1986. Somatic polyembriogenesis from callus of mature sugar pine embryos. Biotechnology (EEUU) 4:643-645.
- GUPTA, P.K.; MEHTA, V.J.; MASCARENHAS, A.F. 1983. A tissue Culture Method for Rapid Clonal Propagation of Mature Trees of *Eucalyptus torelliana* y *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell Reports (EEUU) 2(6):296-299.
- GUPTA, P.K.; NADGIR, A.L.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. 1980. Tissue culture of Forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. Plant Science Letters (Netherlands) 17:259-268.

- HAISSIG, B. 1974. Origins of adventitious roots. New Zealand Journal Forestry Science (New Zealand) 4(2):299-310.
- HAKMAN, I.; VON ARNOLD, S. 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). Plant Science 38:53-58.
- HARTMAN, H.; KESTER, D. 1975. Plant propagation: principles and practices. 3ed. Engelwood Cliffs, N.J. Prentice Hall. 271 p.
- HICKS, 1987. Adventitious rooting of apple microcultings *in vitro*: an anatomical study. Canadian Journal of Botany (Canada) 65(9):1913-1920.
- HORGAN, K. 1987. *Pinus radiata*. In: J.M. Bonga, Durzan, D.J. Cell and Tissue Culture Forestry. vol.3. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands. pp. 128-145.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. 1983. Meristem, shoot, tip, and bud culture. In: W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato, Y. Yamada. Handbook of Plant Cell Culture, vol. 2. Crop Sciences. pp.
- HUHTINEN, O. 1978. Callus and plantlet regeneration from anther cultures of *Betula pendula* Roth. In: T. Thorpe. Abstract 4th International Congress Plant Tissue and Cell Culture. 169 p.
- HUHTINEN, O.; YAHYAOGU, Z. 1974. Dag friihenvonaus kallus kulturen herangesogenen. Pflänzchen bei dei birke (*Betula pendula* Roth). Silv. Genetica 23:32-34.
- LAKSMISITA, G. 1979. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary cultures of *Eucalyptus*. Plant Science Letters (Netherlands) 14:63-88.
- LEAKEY, R.R. 1985. The capacity for vegetative propagation in trees. In: Attributes of trees as Crop Plants. Ed. por M.G. Cannell, J.E. Jackson. Institute of

Terrestrial Ecology, Abbots Ripton, Huntingdon, England.
p. 110-133

- LEAKEY, R.R.; MESEN, J.F.; TCHOUNDJEU, Z.; LONGMAN, K.A.; DICK, J.; NEWTON, A.; MATIN, A.; GRACE, J.; MUNRO, R.C.; MUTHOKA, P.N. 1990. Low-Technology Techniques for the Vegetative Propagation of Tropical Trees. Commonwealth Forestry Review (Scotland) 69 (3):247-257.
- LEDIG, F.T. 1989. The Relevance of Biotechnology to Forestry in Developing Countries. In: Plant Biotechnologies for developing countries. Proceedings of an International Symposium by CTA and FAO. Luxembourg, 26-30 june, 1989. pp. 255-261.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: W. Roca, L. Uroginski. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali. pp. 143-172.
- LOVELL, P.; WHITE, J. 1986. Anatomical changes during adventitious root formation. In Jackson, M. New root formation in plants and cuttings. Dordrecht, Netherlands, Martinuz Nijhoff. pp. 111-140.
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Versión español de J.M. Mateo Box, P. Urbano Terrón. Mundi-Prensa, Madrid. 232 p.
- MARROQUIN, C.G. 1991. Suspensiones celulares y embriogenesis somática en *Musa acuminata* spp. malaccensis. Tesis Mag. Scie. CATIE, Turrialba. 114 p.
- MARTINEZ, C.; HARRY, I.; THORPE, T. 1990. In vitro regeneration, of plantlets of Canary Island (*Pinus canariensis*). Canadian Journal Forestry Research (Canada) 20(8):1200-1211.

- MELCHERS, G.; BERGMAN, L. 1958. Untersuchungen an kulturen von haploiden Geweben von *Antirrhinum majus*. Ber Deut Botan Ges 71:458-473
- MERKLE, S.A.; SOMMER, H.E. 1986. Somatic embryogenesis in tissue culture of *Liriodendron tulipifera*. Canadian Journal Forestry Sciences (Canada) 16:420-422.
- METHRA-PALTA, A. 1982. Clonal propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. Plant Science Letters (Netherlands) 26:1-11.
- MINOCHA, S.C. 1980. Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of White pine (*Pinus strobus*). Canadian Journal Botany (Canada) 58(3):366-370.
- MONTEUUIS, O. 1991. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments. Physiologia Plantarum (Copenhagen) 81(1):11-115.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review Plant Physiology (EEUU). 25(5): 135-166.
- MURALIDHARAN, E.M.; GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. 1989. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. Plant Cell Reports (EEUU) 8(1):41-43.
- OKA, S.; OHIMA, K. 1981. *In vitro* initiation of adventitious bud and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). Canadian Journal of Botany (Canada) 59 (1):68-74.
- PHILLIPS, R. 1980. Citodifferentiation. In: Vasil I.K. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. International Review of Cytology. Supplement IIA. Academic Press, New York. pp. 145-175.

- RADOJEVIC, L. 1988. Plant regeneration of *Aesculus hippocastaneum* L. (Horse Chestnut) through somatic embryogenesis. *Journal Plant Physiology* (EEUU) 132: 322-326.
- RAO, K.S. 1986. Plantlets from somatic callus tissue of the East Indian Rosewood (*Dalbergia latifolia*) ROXB. *Plant Cell Reports* (EEUU) 5(3):199-201.
- SALAZAR, R.; BOSHIER, D. 1989. Establecimiento y manejo de rodales de semilleros de especies forestales prioritarias en América Central. Serie Técnica. Informe Técnico No.148. CATIE, 1989. 77 p.
- SAMARTIN, A.; VIEITEZ, A.M.; VIEITEZ, E. 1986. Rooting of tissue cultured camellias. *Journal of Horticultural Science* (G.B.) 61(1):113-120.
- SCHWENDIMAN, J.S.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. 1988. Histology of somatic embryogenesis of the oil palm *Elaeis guinensis*. *Annals of Botany* (G. B.) 62(1):43-52.
- SENAWI, M.; TAMIN, M. 1988. Micropropagation: The problems Whit Woody Species. *Cell And Tissue Culture In Field Crop Improvement. Proceedings of the Seminar Cell and Tissue Culture in Field Crop Improvement, Taiwan, october 4-9, 1987. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region.* 134 p.
- SOMMER, H.E.; BROWN, C.L.; KORMANIK, P.P. 1975. Differentiation of plantlets in long-leaf pine (*Pinus palustris* Mill) tissue cultures *in vitro*. *Botanical Gazette* (Chicago) 136:196.
- SOMMER, H.E.; BROWN, C.L. 1974. Plantlet formation in pine tissue culture. *American Journal of Botany* (EEUU) 61:11.
- SONDHAL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINE-FILTTO, H.P.; CARVALHO, A.; FAZVOLI, L.C.; COSTA, W.N. 1984. *In: P.V. Ammirato, D. Evans, W. Sharp, Y. Yamada. Handbook of plant cell culture; vol. 3: Crop species. New York; Mac-Millan. pp. 564-590.*

- STREET, H. 1977. Cell culture and secondary products. *In*: Reinert, J.; Bajaj, Y.P. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, New York. pp. 649-667.
- SUDHA DEVI, A.M.; NATARAJA, K. 1987. *In vitro* regeneration and establishment of plantlets in stem cultures of *Dalbergia Latifolia* ROXB. Indian Forester (India) 113(4):501-506
- THORPE, J.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. 1991. Application of micropropagation to forestry. *In*: P.C. Deberghy, R.h. Zimmerman. Micropropagation. Kluwer Academic Publishers (Netherlands): pp. 311-336.
- THORPE, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *In*: I.k. Vasil. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. International Review of Cytology. Supplement IIA. Academic Press. pp. 71-105.
- THORPE, T.A. 1988. *In vitro* somatic embryogenesis ISI Atlas of Science: Animal and Plant Science vol. 1: 81-88.
- THORPE, T.A.; BIONDI, S. 1983. Conifers. *In*: W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato, Y. Yamada. Handbook of Plant Cell Culture, vol. 2. Crop Sciences. pp. 435-470.
- THURNHAM, E.; NORTHOCOTE, D.H. 1982. The use of acetyl-CoA carboxylase activity and changes in wall composition as measures of embryogenesis in tissue cultures of oil palm (*Elaeis guinensis*). The Biochemical Journal (G. B.) 20(2):323-332.
- TISSERAT, B.; ESAN, E.; MURASHIGE, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiospermes. Horticultural Review 1:1.
- TOMAR, U.K.; GUPTA, S.C. 1988. Somatic embriogenesis and organogenesis in calls cultures of a tree legume *Albizia richardiana* King. Plant Cell Reports (EEUU) 7(1):70-73.

- TULECKE, W. 1957. The pollen of "*Ginkgo biloba*", *in vitro* cultures and tissue formation. *American Journal of Botany* (EEUU) 44(7):602-608.
- TULECKE, W. 1960. Arginine requiring strains of tissue obtained from *Ginkgo* pollen. *Plant Physiology* (EEUU) 35(1):19-24.
- VASIL, I.K.; VASIL, V. 1980. Clonal propagation. *In*: I.k. Vasil. *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. International Review of Citology. Supplement IIA.* Academic Press. pp. 145-174.
- VIEITEZ, A.M.; SAN JOSE, M.C.; VIEITEZ, E. 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. *Journal of Horticultural Science* (EEUU) 60(1):99-106.
- VIEITEZ, A.M.; VIEITEZ, M.L. 1982-1983. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Scientia Horticulturae* (Netherlands) 18(4):343-351.
- VILLALOBOS, V.M.; LEUNG, D.; THORPE, T. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation en cultured cotyledon explant of *Radiata* pine. *Physiology Plantarum* (Copenhagen) 61(3):497-504.
- VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.; YEUNG, E. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo. CONAYCIT, Mexico.* 51(3):43-59.
- VON ARNOLD, S. 1988. *Tissue Culture Methods for Clonal Propagation of Forest Trees.* Newsletter (Holland) 1(56):1-13.
- VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal Botanical* (Canada) 59(5):870-874.
- VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. 1984. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious

shoots of *Picea abies* (L.) Karst. Plant Cell Tissue Organ Culture (Netherlands) 3(3):257-264.

VON ARNOLD, S.; HAKMAN, I. 1988. Regulation of somatic embryo development en *Picea abies* by absicsic acid (ABA). Journal Plant Physiology (EEUU) 132: 114-169.

WEBB, D.T.; FLINN, B.S. GEORGIS, W. 1988. Micropropagation of Eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Canadian Journal Forestry Research (Can.) 18(12):1570-1580.

WEBB, D.T.; VILLALOBOS, V.M. 1978. *In vitro* regeneration of Central and South American conifers. In papper 12 p.

WINTON, L. 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. Science (EEUU) 160:1234-1235.

9. APENDICE

Cuadro 1A. Composición del medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962), más suplementos empleados para inducir organogénesis en explantes de algunas especies arbóreas.

Sales	mg/l
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	37.3
Microelementos	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.6
KI	0.83
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Constituyentes orgánicos	
ácido nicotínico	2
HCl-piridoxina	2
HCl-tiamina	10
glicina	4
myo-inositol	200
ó	
bencilaminopurina	44.4-8.8**
ácido naftalenacético	2-0.5
ácido indolbutírico	492-123**
sacarosa	30*
ó	
agar	7.0*
gelrite	0.5*
pH	5.8

*g/l

**uM

Cuadro ZA. Técnica de deshidratación empleada para el estudio histológico de los brotes adventicios y la raíz.

Deshidratador		Tiempo
ABT	50%	2 horas
ABT	70%	Toda la noche
ABT	80%	2 horas
ABT	85%	1 hora
ABT	90%	1 hora
ABT	95%	1 hora
ABT	100%	Toda la noche
ABT	100%	2 a 4 horas
ABT	puro	2 a 4 horas
ABT-parafina	1:1	1 hora
parafina	pura	3 horas
parafina	pura	2 horas
parafina	pura	2 horas

A.B.T.: Acohol butilico terciario.

Cuadro 3A. Análisis de varianza para la inducción de brotes adventicios en *A. guachapele*.

Variable	F.V.	gl	$\frac{2}{X}$	Prob.
% de explantes con brotes	conc BA	4	14.4	0.0790*
Numero de brotes	conc BA	4	10.7	0.0297*
Promedio de brotes por explante	conc BA	4	9.7	0.0440*
Brotes desarrollados	conc BA	4	3.5	0.4754

*significativa al 5%

*significativa al 10%

Cuadro 4A. Análisis de varianza para la inducción de brotes adventicios en *S. macrophylla*.

Variable	F.V.	gl	$\frac{2}{X}$	Prob.
% de explantes con brotes	conc BA	4	1.40	0.8439
Numero de brotes	conc BA	4	3.89	0.4216
	Lineal	1	2.57	0.1090*
Promedio de brotes por explante	conc BA	4	3.95	0.4129
brotes desarrollados	Bonc BA	4	2.23	0.1354

*significativa al 10%

Cuadro 5A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración del medio y la concentración de BA sobre la inducción de brotes adventicios en *P. saman*.

Variable	F.V.	gl	F	Pr>F _{0.05}
% explantes				
	conc medio	3	1.34	0.2611
	conc BA	4	1.34	0.2611
Numero brotes				
	conc BA	4	2.74	0.0575
	conc medio	3	4.62	0.013**
	lineal	3	7.26	0.010**
	concBA*concmedio	12	2.61	0.027*
Promedio brotes				
	conc medio	3	5.12	0.008**
	lineal	3	4.46	0.041*
Brotes desarrollados				
	conc medio	3	3.99	0.022*
	cuadrática	3	4.63	0.038*
	Error	20		
	Total	39		

*significativa al 5%

**significativa al 1%

Cuadro 6A. Medias y coeficientes de variación para el efecto de la concentración del medio MS sobre la inducción de brotes adventicios en *P. saman*.

Variable	25%	Media			CV
		50%	75%	100%	
Brotes	20.50	29.70	29.80	35.60	31.76
χ brotes	3.39	4.29	5.09	5.49	28.45
Bdesarrollados	0.90	4.50	2.70	5.40	93.57

Cuadro 7A. Medias y desviación estándar para el número de brotes adventicios en la interacción concentración de BA*concentración del medio en explantes de hipocotilo de *P. saman*.

Conc medio %	Conc BA μ M	Media	E.estándar
25	8.8	18.50	7.77
25	17.7	32.50	3.53
25	26.6	15.50	9.19
25	35.5	17.50	2.12
25	44.4	18.50	14.84
50	8.8	28.00	7.77
50	17.7	17.00	9.89
50	26.6	46.50	9.19
50	35.5	24.50	7.77
50	44.4	32.50	3.54
75	8.8	42.50	24.74
75	17.7	18.00	4.24
75	26.6	36.50	4.94
75	35.5	37.50	3.53
75	44.4	14.50	4.95
100	8.8	39.50	2.121
100	17.7	32.00	5.65
100	26.6	32.50	7.77
100	35.5	50.50	3.53
100	44.4	20.50	9.19

Cuadro 8A. Análisis de varianza para el efecto de la edad del explante sobre la inducción de brotes adventicios de *P. saman*.

Variable	F.V.	gl	F	Pr > F _{0.05}
% explantes	días	3	0.23	0.8747
promedio brotes	días	3	0.53	0.8043
numero brotes	días	3	1.81	0.1631
b desarrollados	días	3	0.20	0.8936
	error	36		
	total	39		

*significativa al 5%

Cuadro 9A. Valores y coeficiente de variación para el efecto de la edad del explante sobre la inducción de brotes adventicios en *P. saman*

Variable	días después de la germinación				CV
	5	10	15	20	
% explantes	66.6	66.6	57.6	66.6	19.09
número brotes	124	117	112	85	85.86
promedio brotes	5.9	6.2	6.9	3.3	66.23
b desarrollados	7	9	5	4	20.43

Cuadro 10A. Análisis de varianza para el efecto de la sección de hipocotilo de *P. saman* empleada como explante sobre la inducción de brotes adventicios.

Variable	F.V.	gl	F	Pr > F _{0.05}
% explantes	sección	2	2.16	0.1353
Numero brotes	sección	2	2.20	0.1307
Promedio brotes	sección	2	2.53	0.0980
Bdesarrollados	sección	2	3.32	0.050*
	Error	27		
	Total	29		

*significativa al 5%

Cuadro 11A. Medias y coeficiente de variación para el efecto de la sección del explante de *P. saman* empleada como explante sobre la inducción de brotes adventicios.

Variable	Proximal	Sección Central	Distal	CV
% explantes	53	46.6	20	27.99
Numero brotes	76	72	26	54.49
Promedio brotes	4.75	5.0	4.33	43.62
Bdesarrollados	8	13	2	26.29

Cuadro 12A. Análisis de varianza para el efecto de la posición de los explantes sobre la inducción de brotes adventicios en *P. saman*.

Variable	F.V.	gl	F	Pr>F _{0.01}
% explantes	posición	1	8.64	0.0088**
Numero brotes	posición	1	19.39	0.0003**
Promedio brotes	posición	1	13.40	0.0018**
	Error	18		
	Total	19		

**significativa al 1%

Cuadro 13A. Medias y coeficientes de variación para el efecto de la posición de los explantes sobre la inducción de brotes adventicios en *P. saman*.

Variable	Posición		CV
	Horizontal	Vertical	
% explantes	70	30	19.57
Número brotes	28	18	25.99
Promedio brotes	4.03	2.0	25.50

Cuadro 14A. Análisis de varianza para el efecto del período de exposición de los explantes de hipocotilo de *P. saman* a la BA.

Variable	F.V.	gl	F	Pr>F
% explantes	días	3	0.91	0.4481
Número brotes	días	3	0.18	0.9065
Promedio brotes	días	3	0.24	0.8690
Bdesarrollados	días	3	2.36	0.0873*
	Error	36		
	Total	39		

*significativa al 10%

Cuadro 15A. Medias y coeficiente de variación para el efecto del período de exposición de los explantes de *P. saman* a la BA.

Variable	Periodo (días)				CV
	7	14	21	28	
% explantes	53.3	30.0	43.3	40.0	33.48
Número de brotes	53	49	53	51	56.88
Promedio brotes	3.5	5.5	4.7	4.5	48.82
Bdesarrollados	8	3	5	4	41.06

Cuadro 16A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de carbón activado sobre el desarrollo de brotes adventicios de *P. saman*.

Variable	F.V.	gl	F	Pr>F _{0.01}
Numero hojas	conc carb	4	6.65	0.0001**
	lineal	1	36.8	0.0090**
	Error	95		
	Total	99		

**significativa al 1%

Cuadro 17A. Medias del numero de hojas y coeficiente de variación para el efecto de la concentración de carbón activado sobre el desarrollo de brotes adventicios de *P. saman*.

concentración (mg/l)	Hojas Media	CV
0	1.22	
0.5	1.53	
1.0	1.60	14.58
2.5	2.80	
5.0	3.50	

Cuadro 18A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración y el periodo de exposición al AIB sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes adventicios de *P. saman*.

Variable	F.V.	gl	F	Pr>F
% enraizamiento				
	conc AIB	3	0.96	0.4499
	horas AIB	2	26.05	0.0005**
	lineal	1	10.68	0.035*
Promedio raíces				
	horas	2	17.24	0.0001**
	Error	11		
	Total	12		

*significativa al 5%

**significativa al 1%

Cuadro 19A. Porcentajes de enraizamiento en las diferentes concentraciones de AIB y diferentes periodos de exposición a éste en brotes adventicios de *P. saman*.

Horas AIB	AIB (uM)	Enraizamiento (%)	Raíces por planta
24	123.0	56	2.83
	246.0	50	4.83
	369.0	63	3.47
	492.0	50	7.00
48	123.0	33	2.55
	246.0	35	1.82
	369.0	28	1.88
	492.0	25	0.75
72	123.0	22	1.22
	246.0	38	1.50
	369.0	24	1.76
	492.0	11	0.33

Cuadro 20A. Análisis de varianza para el crecimiento de las plantas provenientes de cultivo in vitro y de semilla botánica de *P. saman* en condiciones de invernadero a los 3 meses de edad.

Variable	F.V.	gl	F	Pr>F
Altura	plantas	1	2.44	0.1277
Diámetro	plantas	1	41.04	0.0525*
Hojas	plantas	1	7.04	0.0120**
	Error	36		
	Total	37		

*significativa al 5%.

**significativa al 1%.

Cuadro 21A. Medias y coeficientes de variación para altura, diámetro del tallo y del número de hojas en plantas de cultivo in vitro y de semilla botánica de *P. saman* en condiciones de invernadero a los 3 meses de edad.

Variable	Plantas (media)		CV
	<u>in vitro</u>	semilla botánica	
Altura	20.53	17.19	42.22
Diámetro	3.058	2.471	35.43
Hojas	7.368	6.105	25.74