

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROPAGACION CLONAL in vitro DE DIFERENTES ESPECIES DE PORO
(Erythrina spp.)

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar por el grado de

Magister Scientiae

por

Alberto Antonio Berríos Pérez

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Programa de Producción Vegetal
Turrialba, Costa Rica
1986

DEDICATORIA

A mis padres Rafael y Virginia,
por enseñarme lo valioso que es
el deseo de superación.

A mi hermana Ana Lorena,
con quien he compartido
mis experiencias de
estudiante.

A mis sobrinos Lillian Elena y
José Rafael, a pesar de su corta
edad me han mostrado la sabiduría
de la niñez.

A mis tías María de los
Angeles, ejemplo de en-
tereza, y Lucía.

A la memoria de mi abuela Araceli
y mi tío Alberto Mario, quienes
me dedicaron sus mejores años.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea manifestar su agradecimiento a las siguientes personas, programas e instituciones:

Al Dr. Ludwig Muller, Profesor Consejero, por su colaboración durante la realización de esta investigación.

A los miembros del Comité Asesor por su valioso aporte a este trabajo.

Al personal del Programa de Estudios de Posgrado UCR-CATIE y la Biblioteca Conmemorativa Orton por su cooperación durante mis estudios.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE, por permitirme efectuar mi tesis en él.

Al Dr. Germán Sánchez y al Proyecto Arboles Fijadores de Nitrógeno CATIE-CIID por su interés y apoyo y por la financiación de la preparación de la tesis.

Al Dr. Pedro Ferreira por su orientación en la interpretación de los análisis estadísticos.

Al amigo y compañero José Elías Treviño M.Sc. por su desinteresada colaboración en el fotografiado del material experimental.

Al Programa Cooperativo para la Protección y Modernización de la Caficultura (PROMECAFE), en especial al

Ing. Jorge Echeverri M.Sc. por su cooperación y por permitirme finalizar la tesis.

A la Sra. Rita Abarca por su dedicación en la labor mecanográfica y por su amabilidad.

A la Sra. María Julia Ortega de Brenes por su ayuda en la preparación de la tesis.

A todos los compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y PROMECAFE por su amistad. Los gratos momentos que compartimos son inolvidables.

Al Gobierno de Holanda por financiar mis estudios de posgrado.

BIOGRAFIA

El autor, de nacionalidad costarricense, nació en la Ciudad de Guatemala en noviembre de 1958.

Realizó sus estudios en San José de Costa Rica. Los de educación secundaria en el Colegio De La Salle (1972-1976) y los de educación superior en la Escuela de Fitotecnia de la Facultad de Agronomía, en la Universidad de Costa Rica (1977-1983).

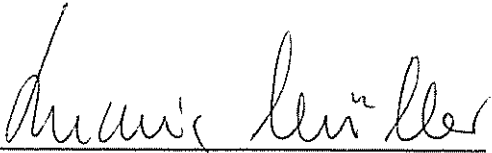
En 1984 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Convenio UCR-CATIE, donde obtuvo el grado de Magister Scientiae en diciembre de 1986.

Actualmente forma parte del personal de PROMECAFE, CATIE, en Turrialba, Costa Rica.

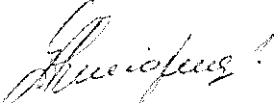
Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la Comisión de Estudios de Posgrado del Programa Conjunto UCR/CATIE como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae


COMITE ASESOR:



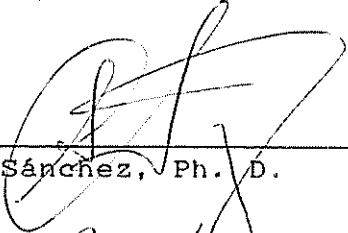
Ludwig Müller, Ph. D. Profesor Consejero



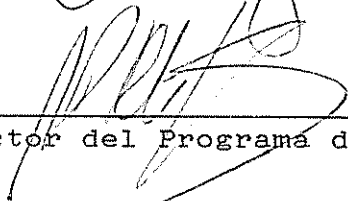
Gustavo Enríquez, Ph. D. Miembro del Comité



José Fargas, Ph. D. Miembro del Comité



Germán Sánchez, Ph. D. Miembro del Comité



Director del Programa de Estudios de Posgrado



Decano Sistema Estudios de Posgrado



Alberto Antonio Berríos Pérez, Candidato

INDICE

	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
BIOGRAFIA.....	v
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades.....	3
2.2. Propagación clonal <u>in vitro</u>	4
2.2.1. Fases de la propagación clonal <u>in vitro</u>	7
2.2.2. Importancia de los reguladores de crecimiento.....	12
2.2.3. Trabajos de cultivo <u>in vitro</u> de leguminosas arbóreas.....	14
3. MATERIAL Y METODOS.....	23
3.1. Localización del experimento.....	23
3.2. Material vegetal.....	23
3.3. Manejo y desinfección del material.....	23
3.4. Siembra de las semillas.....	24
3.5. Obtención de los explantes.....	24
3.6. Medios de cultivo.....	26
3.7. Condiciones de crecimiento.....	28
3.8. Evaluación.....	29
3.8.1. Fase de establecimiento (E).....	29
3.8.2. Fase de multiplicación y cultivo horizontal (M).....	29
3.9. Análisis de los datos.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
4.1. Fase de establecimiento (E).....	32

	Página
4.1.1. Supervivencia, contaminación y oxidación.....	32
4.1.2. Cultivo de ápices vegetativos.....	35
4.1.3. Cultivo de nudos cotiledonares.....	47
4.2. Fase de multiplicación y cultivo horizontal (M).....	56
5. CONCLUSIONES.....	61
6. LITERATURA CITADA.....	64
7. APENDICE.....	71

BERRIOS PEREZ, A. A. 1986. Propagación clonal in vitro de diferentes especies de poró (Erythrina spp). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C. R., Programa Universidad de Costa Rica/CATIE. 81 p.

Palabras claves: Erythrina, propagación in vitro, nudo cotiledonar, cultivo horizontal, tasa de multiplicación potencial.

RESUMEN

El poró (Erythrina spp.) es una leguminosa arbórea, usada en Costa Rica como sombra en cafetales y cacaoales y como cercas vivas. Es capaz de fijar nitrógeno, lo que contribuye al mejoramiento de la fertilidad del suelo. Generalmente se propaga por estacas, pero este método de propagación asexual tiene varias desventajas. Una alternativa es la utilización de la metodología del cultivo de tejidos. Su principal ventaja es su gran capacidad de multiplicación vegetativa a partir de un fragmento de tejido u órgano de la planta madre.

La presente investigación se realizó entre julio de 1985 y agosto de 1986, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Los objetivos generales fueron: 1) establecer las mejores condiciones para el cultivo in vitro de ápices vegetativos y nudos cotiledonares de diferentes especies de Erythrina; 2) lograr, por medio de explantes, la multiplicación clonal rápida in vitro.

Se utilizaron plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente de E. poeppigiana, E. berteriana, E. costaricensis y E. fusca. De cada plántula se aisló el ápice vegetativo y el nudo cotiledonar. En la fase de establecimiento se usaron diferentes medios de cultivo, fundamentados en el medio básico de Murashige y Skoog (MS). En cada medio se adicionó sacarosa al 3 por ciento, 30 mg·l⁻¹ de cisteína-HCl, agar al 0,7 por ciento, 0, 1, 2 o 4 mg·l⁻¹ de ácido indolbutírico (IBA), y 0, 1, 2, 4 o 8 mg·l⁻¹ de bencilaminopurina (BAP). Se probaron todas las posibles combinaciones de concentraciones de ambos tipos de reguladores de crecimiento. En la fase de multiplicación y cultivo horizontal se usó el medio básico MS más sacarosa al 3 por ciento, 30 mg·l⁻¹ de cisteína H-Cl, "gelrite" al 0,15 por ciento y 1 mg·l⁻¹ de IBA o 1 mg·l⁻¹ de BAP.

Los porcentajes de supervivencia, oxidación y contaminación, obtenidos del total de explantes cultivados

en la fase de establecimiento, variaron con la especie de Erythrina. Para E. poeppigiana se alcanzó el menor porcentaje de supervivencia (59 por ciento), mientras que para E. berteriana se logró el mayor porcentaje de supervivencia (84 por ciento). La contaminación fue causada principalmente por microorganismos endofíticos, que no se eliminaron con la desinfección superficial del material. Se encontró una contaminación de un 4 por ciento en E. poeppigiana y E. costaricensis, un 9 por ciento en E. fusca, y un 7 por ciento en E. berteriana. Se determinó que la oxidación fue la causa más importante de la pérdida de propágulos. Para E. poeppigiana y E. costaricensis la oxidación alcanzó un 37 por ciento y un 24 por ciento, respectivamente.

No se obtuvo el crecimiento de yemas axilares múltiples en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de poró. La única tendencia definida que se notó, en la respuesta morfogénica del cultivo in vitro de ápices vegetativos, fue la diferenciación de raíces. Esta ocurrió con los tratamientos que carecieron de BAP, incluido aquél en que no se añadió ningún regulador de crecimiento al medio de cultivo. Esto significa que el nivel endógeno de auxinas para este género es alto.

El desarrollo de yemas cotiledonares solo ocurrió en E. berteriana y E. costaricensis. Los mejores tratamientos fueron 2 o 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP para E. berteriana, independientemente de la concentración de IBA, y 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA más 8 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP para E. costaricensis.

Por medio del cultivo horizontal ("in vitro layering") se obtuvo un número adecuado de explantes para proseguir con la fase de multiplicación. Las tasas de multiplicación potencial alcanzadas fueron $2,51\cdot 10^2$ explantes por año para E. poeppigiana, $6,3\cdot 10^2$ explantes por año para E. berteriana, $1,3\cdot 10^2$ explantes por año para E. costaricensis, y $2,7\cdot 10^2$ explantes por año para E. fusca. Estas tasas indican que el género Erythrina responde adecuadamente a la propagación clonal in vitro.

BERRIOS PEREZ, A.A. 1986. In vitro clonal propagation of different species of Erythrina. Master of Science Thesis, Turrialba, C. R., University of Costa Rica/CATIE Program. 81 p.

Key words: Erythrina, in vitro propagation, cotyledonary node, vegetative apex, in vitro layering, potential multiplication rate.

SUMMARY

Erythrina is a leguminous tree, used in Costa Rica as shade in coffee and cacao plantations, and also as life fence posts. It can fix nitrogen, a process that contributes to the improvement of soil fertility. Generally it is propagated by cuttings, but this method has several disadvantages. As an alternative tissue culture methodology can be used. Its greatest advantage is the large capacity of vegetative multiplication from tissue explants or organs of the mother plant.

The present investigation was carried out between July 1985 and August 1986 in the Tissue Culture Laboratory of CATIE, at Turrialba, Costa Rica. The general objectives were: 1) to establish the best conditions for in vitro culture of vegetative apices and cotyledonary nodes of different species of Erythrina, 2) to achieve, by the use of different explants, a high clonal propagation rate in vitro.

As material plantlets were used, derived from seeds germinated under aseptic conditions, of E. poeppigiana, E. berteriana, E. costaricensis and E. fusca. From each plantlet the vegetative apex was removed, the same as the cotyledonary node. During the phase of establishing the culture different culture media were used, based on the basal Murashige and Skoog (MS) medium. To each of these media were added: sucrose 3 per cent, cysteine-HCl $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, agar (Difco) 0.7 per cent, indolebutyric acid (IBA) 0, 1, 2, or $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, benzylaminopurine (BAP) 0, 1, 2, 4 or $8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. All possible combinations were tried out, regarding the concentrations of both types of growth regulators. During multiplication phase and in vitro layering, the basal MS medium was used, with sucrose 3 per cent, cysteine-HCl $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, gelrite 0.15 per cent, IBA $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ or BAP $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

The percentages of survival rate, oxydation and contamination of all explants during the establishment phase varied with the species of Erythrina. For E. poeppigiana the survival percentage was lowest (59 per cent) whereas for E. berteriana it was highest (84 per cent). The contamination was caused principally by endophytic microorganisms, which could not be eliminated with surface

sterilization of the explants. The contamination rate was 4 per cent in E. poeppigiana and E. costaricensis, 9 per cent in E. fusca, and 7 per cent in E. berteriana. The oxydation was the principal cause of loss of propagules. For E. poeppigiana and E. costaricensis it reached 36 per cent and 24 per cent, respectively.

No multiple axillary buds were obtained in vitro when cultivating vegetative apices of Erythrina. The only clear tendency of morphogenic response to in vitro culture of vegetative apices was the differentiation of roots. This occurred in the treatments without BAP, including the one without any growth regulator. This means that the endogenous level of auxins for this genus is rather high.

The development of cotyledonary buds only occurred in E. berteriana and E. costaricensis. The best treatments were 2 or 4 mg·l⁻¹ of BAP for E. berteriana, independently of the concentration of IBA, and 1 mg·l⁻¹ of IBA together with 8 mg·l⁻¹ of BAP for E. costaricensis.

By in vitro layering an adequate number of explants were obtained to start the multiplication phase. the potential multiplication rate calculated were per year: 2.51x10⁷ explants for E. poeppigiana, 6.3x10⁶ explants for E. berteriana, 1.3x10⁶ explants for E. costaricensis and 2.7x10⁶ explants for E. fusca. These rates indicate that the genus Erythrina responds adequately to in vitro clonal propagation.

LISTA DE CUADROS

En el texto

Cuadro		Página
1	Investigaciones realizadas en diferentes leguminosas arbóreas cultivadas <u>in vitro</u>	15
2	Procedencia de las semillas de las especies de <u>Erythrina</u> usadas.....	24
3	Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).....	25
4	Composición de los medios de cultivo utilizados en la propagación clonal <u>in vitro</u> de <u>Erythrina</u> spp.....	27
5	Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>E. poeppigiana</u>	36
6	Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>E. berteriana</u>	37
7	Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>E. costaricensis</u>	38
8	Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>E. fusca</u>	39
9	Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>E. berteriana</u> al considerar solo las concentraciones de IBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).....	49
10	Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>E. berteriana</u> al considerar solo las concentraciones de BAP ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).....	49
11	Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>E. costaricensis</u> al considerar solo las concentraciones de IBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).....	51

12	Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>E. costaricensis</u> al considerar solo las concentraciones de BAP ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).....	51
13	Número promedio de yemas desarrolladas en el cultivo horizontal de ejes caulinares de <u>Erythrina</u> spp.....	57
14	Tiempo total en días, para completar un ciclo de propagación clonal <u>in vitro</u> de <u>Erythrina</u> spp.....	58
15	Número aproximado de ciclos de propagación por año y tasa de multiplicación potencial para <u>Erythrina</u> spp.....	59

En el apéndice

1A	Análisis de varianza para la variable número de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>E. berteroana</u> y <u>E. costaricensis</u>	72
2A	Número total y promedio de yemas cotiledonares diferenciadas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>E. berteroana</u>	73
3A	Número total y promedio de yemas cotiledonares diferenciadas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>E. costaricensis</u>	74
4A	Número de yemas diferenciadas en el cultivo horizontal de ejes caulinares de <u>Erythrina</u> spp.....	75
5A	Tiempo transcurrido en días, para que se desarrollaran las yemas axilares en el cultivo horizontal de ejes caulinares de <u>Erythrina</u> spp.....	76
6A	Tiempo transcurrido en días, para que las yemas de <u>Erythrina</u> spp. provenientes del cultivo horizontal, formasen ejes caulinares.....	77

LISTA DE FIGURAS

En el texto

Figura		Página
1	Supervivencia, contaminación y oxidación, en porcentaje, obtenidas del total de explantes cultivados en la fase de establecimiento de la propagación <u>in vitro</u> de <u>Erythrina</u> spp.....	33
2	Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina poeppigiana</u>	41
3	Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina berteroa</u>	42
4	Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina costaricensis</u>	43
5	Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina fusca</u> ...	44
6	Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>Erythrina berteroa</u>	53
7	Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo <u>in vitro</u> de nudos cotiledonares de <u>Erythrina costaricensis</u>	55

En el apéndice

1A	Desarrollo de ejes caulinare, expresado en porcentaje, en el cultivo <u>in vitro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina poeppigiana</u>	78
----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

2A	Desarrollo de ejes caulinare, expresa- do en porcentaje, en el cultivo <u>in vi- tro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina berteroana</u>	79
3A	Desarrollo de ejes caulinare, expresa- do en porcentaje, en el cultivo <u>in vi- tro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina costaricensis</u>	80
4A	Desarrollo de ejes caulinare, expresa- do en porcentaje, en el cultivo <u>in vi- tro</u> de ápices vegetativos de <u>Erythrina fusca</u>	81

1. INTRODUCCION

La familia de las leguminosas incluye gran diversidad de especies, tanto herbáceas como arbóreas. Muchas de ellas son útiles al hombre debido a sus múltiples beneficios.

En la actualidad ha surgido un considerable interés en estas plantas. La crisis económica mundial puso en evidencia la necesidad de desarrollar técnicas que incrementen la producción y disminuyan los costos. En la búsqueda de soluciones se resaltó la importancia de incorporar leguminosas fijadoras de nitrógeno como cultivos asociados o como cultivos en rotación. De esta manera se reduce la dependencia de insumos externos.

Dentro de esta familia se encuentra el género Erythrina, ampliamente usado en Costa Rica como sombra en cafetales y cacaotales (E. poeppigiana y E. fusca) y como cercas vivas (E. berteroana y E. costaricensis). Produce grandes cantidades de materia orgánica y es capaz de fijar nitrógeno, lo que contribuye al mejoramiento de la fertilidad del suelo.

Generalmente se propaga por estacas. Este método de reproducción asexual es sencillo y rápido. Sin embargo, la multiplicación vegetativa por estacas tiene varias desventajas: pierden la capacidad de enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo; los árboles portadores de

estacas deben estar lo suficientemente maduros para que expresen las características deseadas; no se pueden obtener grandes cantidades de ellas a partir de una sola planta.

Una alternativa es la utilización de la metodología del cultivo de tejidos. Su principal ventaja es su enorme y potencialmente ilimitada capacidad de multiplicación vegetativa a partir de un fragmento de tejido u órgano de la planta madre. Permite, después de la selección de un árbol con características deseables, que se propague en forma masiva.

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

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

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Generalidades

El inicio del cultivo de tejidos vegetales se remonta a principios del presente siglo. Haberlandt fue el primero que intentó regenerar plantas a partir de células. A pesar de no tener éxito, estableció las bases teóricas al asegurar que cada célula vegetal, cualquiera que fuera su especialización y si estaba viva y poseía núcleo, tenía la capacidad de producir una planta entera (concepto de totipotencia) (22).

Desde entonces se han logrado notables progresos. Esta metodología comprende el cultivo aséptico de protoplastos, células, tejidos y órganos en un medio nutritivo (25, 30). Se le denomina explante al fragmento o tejido excisado del material parental para iniciar un cultivo in vitro (30).

El papel del medio nutritivo es el de proveer las condiciones óptimas para el crecimiento del explante. Estas condiciones están determinadas principalmente por factores físicos, tales como la concentración de los nutrimentos y reguladores de crecimiento, el pH, el estado del medio (líquido o semisólido) y la temperatura (1). No existe un medio universal. Cada género, especie o cultivar, e, inclusive, cada segmento proveniente de diferentes partes de una misma planta, tienen distintos requerimientos para alcanzar un buen crecimiento y desarrollo (1, 25).

El cultivo de tejidos se ha utilizado en muchas áreas de investigación. En la agricultura tiene diversas aplicaciones: obtención de plantas libres de virus, hibridación de especies mediante fusión de protoplastos, conservación de germoplasma, inducción y selección de mutantes y multiplicación clonal rápida (20, 25, 32).

2.2. Propagación clonal in vitro

De acuerdo con Kester (21), un clon es la regeneración de un solo genotipo, representado por una planta, un ápice, un meristema o cualquier fragmento vegetal.

Es importante que las especies hortícolas o forestales tengan un tipo uniforme para asegurar altos rendimientos. Esto se consigue solo si los propágulos son genéticamente idénticos. El cultivo in vitro se ha empleado con éxito para satisfacer esta necesidad (36).

En la actualidad se reconoce que la multiplicación clonal in vitro o micropropagación, tiene su mayor aplicabilidad en plantas arbóreas (21, 45). Sin embargo las investigaciones efectuadas en este campo con árboles tropicales, especialmente aquellos de la familia Leguminosae, son pocas, si se compara con las hechas en especies de clima templado (36, 37).

Las ventajas de este método son varias:

- a- Se pueden multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio pequeño (13, 52).
- b- La propagación se hace en condiciones asépticas. Las plántulas obtenidas están libres de hongos y bacterios (13, 25).
- c- Se puede generar un mayor número de plantas en un tiempo dado, hecho importante en el fitomejoramiento, porque se reduce el período entre la obtención y la difusión de un nuevo cultivar (1, 25, 52).
- d- El proceso puede hacerse durante todo el año, independientemente de cambios estacionales (13, 25).
- e- Los cultivos solo requieren de cuidados durante las transferencias (13).

Lógicamente, también existen algunas desventajas que puedan limitar su uso:

- a- Se necesita de personas hábiles para que las operaciones tengan éxito (13, 25).
- b- El procedimiento puede ser costoso, especialmente si se compara con la propagación por estacas (25).

- c- A pesar de que la multiplicación es rápida, el establecimiento aséptico puede requerir de un largo tiempo (25).
- d- Las plantas obtenidas en corto tiempo son muy pequeñas y es necesario un período de aclimatación para poder transplantarlas al campo (13).
- e- Por su estrecha base genética, las poblaciones clonales son susceptibles a cambios climáticos, a plagas y enfermedades. Esto provoca su degeneración con el paso del tiempo (6, 21).
- f- Se corre el riesgo de que aparezcan variaciones y que éstas se multipliquen, sin que se note que no son iguales al genotipo seleccionado (21). Este fenómeno recibe el nombre de variación somaclonal (30). Estas variaciones pueden originarse por mutaciones genéticas espontáneas, por formación de quimeras, por cambios epigenéticos (variación en la expresión fenotípica que se perpetúa durante la propagación pero que no involucra cambios permanentes en el genotipo) o por infección sistémica de patógenos, por ejemplo, virus (21).
- g- Pérdida de la capacidad morfogénica de los explantes, luego de muchos subcultivos (19).

2.2.1. Fases de la propagación clonal in vitro

Murashige (32) estableció tres pasos o fases fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: a) el establecimiento aséptico del cultivo, b) su multiplicación y c) el enraizamiento y preparación de la planta para su trasplante al suelo.

Debergh y Maene (10) propusieron que el tratamiento y preparación de las plantas madre deberían incluirse en una fase aparte.

Otra modificación hecha al procedimiento de Murashige consistió en separar la Fase III en dos etapas: preparación para el crecimiento en el ambiente (enraizamiento) y transferencia de las plántulas a condiciones climáticas normales (aclimatación o endurecimiento) (13).

FASE 0: Selección y preparación de la planta madre

El estado fisiológico de la planta donadora de los explantes influye en su capacidad morfogénica. Además, debe considerarse la edad de la planta y su genotipo, el tipo de explante y su tamaño, y la época en que se obtuvo el explante (36, 52, 54).

Rao y Lee (36) mencionaron que entre más joven sea el tejido de un árbol, mejor será su crecimiento al cultivarse in vitro. Biondi y Thorpe (3) concluyeron que los tejidos u

órganos provenientes de árboles adultos tienen un potencial morfogénico limitado.

Skirvin (43) y Zimmerman (56) reconocieron que las plantas leñosas son difíciles de manipular in vitro. En general, los árboles se multiplican lentamente, tienen ciclos de latencia complicados y con frecuencia se dan formas adultas y juveniles al mismo tiempo. De importancia es también su crecimiento y desarrollo en el campo por varios años. Esto provoca infecciones externas e internas con microorganismos difíciles de controlar en el medio de cultivo.

Una vez que se ha escogido la planta madre, ésta debe desinfectarse. La esterilización se logra al sumergir el explante en una solución desinfectante fuerte por un tiempo determinado. Luego se enjuaga con agua estéril para eliminar los residuos tóxicos (13, 54).

FASE I: Establecimiento del cultivo aséptico

Su principal objetivo es que el explante seleccionado se transfiera al medio de cultivo en forma aséptica y que inicie su desarrollo. Se puede decir que esta fase se completó si se obtuvo un número adecuado de cultivos que sobrevivieron sin contaminarse y que iniciaron el proceso de crecimiento (13, 54).

Es importante considerar que la excisión del tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de tensión

que altera su metabolismo celular y su balance de reguladores de crecimiento (52).

También puede notarse a veces una coloración oscura en el fragmento vegetal y en el medio, luego de la excisión. Esto se debe a la oxidación de fenoles o polifenoles que se liberan cuando los tejidos sufren heridas. El explante deja de crecer y generalmente muere. Este problema se puede solucionar si los explantes aislados se enjuagan en una solución antioxidante estéril (cisteína-HCl, ácido ascórbico, ácido cítrico, etc.), si se añaden los antioxidantes al medio de cultivo y si se efectúan inicialmente subcultivos frecuentes (56).

FASE II: Multiplicación

En esta fase se pretende la reproducción de órganos y estructuras que sean capaces de diferenciar nuevas plántulas.

El verdadero valor de la propagación clonal in vitro consiste en la frecuencia con que pueda repetirse este proceso, razón por la cual se debe encontrar la mejor manera de dividir y subcultivar el propágulo (54).

Krikorian (23) indicó que la reproducción vegetativa in vitro puede hacerse a partir de células, protoplastos, ápices vegetativos, yemas axilares y nudos de tallos o ramas. En el último caso se persigue la formación de un eje caulinar, el cual puede dividirse en nudos o bien colocarse

en posición horizontal sobre medio fresco ("in vitro layering"), lo que permite el desarrollo de yemas axilares múltiples (13, 25, 54).

Por otra parte, de acuerdo con las condiciones del cultivo, puede presentarse un callo. Para los fines de la micropropagación debe evitarse la formación de callo. Existe evidencia de que las plantas obtenidas a partir de esta masa indiferenciada de células presentan diferentes grados de variación somaclonal (52).

FASE III: Preparación para el crecimiento en ambientes naturales

Los propágulos provenientes de la fase anterior son pequeños y no toleran una transferencia inmediata al suelo. Es todavía necesario que las plántulas se desarrollen y comiencen a fotosintetizar para poder sobrevivir sin ninguna fuente externa de carbohidratos (13, 54).

Al mismo tiempo se estimula el crecimiento en longitud de las yemas hasta vástagos bien diferenciados. Luego, estos se enraizan in vitro o in vivo (13).

Generalmente para favorecer el enraizamiento, se transfieren los vástagos primero a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Sin embargo, en la micropropagación en gran escala la diferenciación del sistema radical bajo condiciones asépticas no es rentable,

por lo que se sustituyó normalmente por el enraizamiento en cámaras de humidificación (52).

FASE IV: Aclimatación o endurecimiento

La alta humedad y baja iluminancia que prevalecen durante el cultivo in vitro provocan que la cutícula de las hojas sea delgada y que haya poco desarrollo de los tejidos vasculares. Esto hace que las plántulas producidas sean susceptibles a la desecación cuando se trasladan a condiciones externas. También se requerirán todavía algunos días para que estén aptas y puedan realizar el proceso de fotosíntesis, es decir, que se tornen completamente autótrofas (13, 54).

Las plántulas se transfieren primeramente a algún medio estéril, por ejemplo arena, o arena más turba. Se colocan en cámaras con nebulización y riego intermitente (de ser necesario), lo que proporciona una alta humedad relativa. A intervalos de varios días se reduce la humedad relativa paulatinamente, para que las plántulas se adapten a condiciones de menor humedad y alta iluminancia.

Existe la posibilidad de eliminar la Fase III, es decir, pasar de la fase de multiplicación a la de aclimatación directamente. El enraizamiento y el endurecimiento ocurren entonces al mismo tiempo (13, 52, 54).

2.2.2. Importancia de los reguladores de crecimiento

El crecimiento y la morfogénesis en el cultivo de tejidos están controlados por la interacción y el balance entre los diferentes reguladores de crecimiento presentes en el medio. Se debe tomar en cuenta que estas sustancias pueden reaccionar de forma diferente en plantas intactas y en fragmentos cultivados asépticamente (13).

Los reguladores más importantes en el cultivo in vitro son las auxinas y las citocininas.

Las auxinas causan el alargamiento celular, pero también pueden estimular la división celular, es decir, son las responsables del aumento en tamaño y volumen de los tejidos. Además estimulan la formación y crecimiento de las raíces e inhiben el desarrollo de las yemas laterales, o sea, que controlan la dominancia apical. En general, en bajas concentraciones provocan la diferenciación de raíces, y en altas concentraciones inducen callos (1, 40).

Las auxinas más empleadas son el ácido indolacético (IAA), que es foto y termosensible, el ácido naftalenácético (NAA), análogo al anterior y resistente a la oxidación, el ácido indolbutírico (IBA), que sustituye eficientemente al IAA en los cultivos asépticos y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que es efectivo en inducir callos, pero también mutaciones (1, 55).

Las citocininas se asocian principalmente con los procesos de división celular. Promueven el crecimiento y la diferenciación, en especial del vástago. Permiten la proliferación de yemas axilares al eliminar la dominancia apical. Estas yemas pueden separarse y someterse a un nuevo subcultivo (propagación rápida). En niveles altos causan la proliferación de yemas e inhiben el enraizamiento (1, 13, 55).

Algunas citocininas que se emplean corrientemente son la furfurilaminopurina o cinetina (K), la bencilaminopurina (BAP), más efectiva y estable que la anterior, la 2-isopenteniladenina (2-IP), y la zeatina. Estas dos últimas se han utilizado poco, a veces con resultados erráticos, en el cultivo de tejidos de plantas leñosas (55).

Cuando los dos tipos de reguladores interactúan, se induce la morfogénesis en explantes de plantas superiores. El balance de auxinas y citocininas se puede expresar así: una concentración alta de auxina, combinada con una baja de citocinina, promueve la iniciación de raíces; la relación inversa conduce al desarrollo de yemas adventicias y laterales; concentraciones intermedias de ambos reguladores estimulan el origen de callos (13, 32, 40).

La relación de concentración óptima entre los dos tipos de hormonas depende de la especie de planta cultivada in vitro, de las condiciones y de los compuestos usados en el cultivo, y de los niveles endógenos de reguladores de los

tejidos en el momento de su incubación. Generalmente las interacciones encontradas son complejas y más de una combinación de las dos clases de sustancias pueden producir óptimos resultados (13, 52).

2.2.3. Trabajos de cultivo in vitro de leguminosas arbóreas

Existen pocos ensayos sobre este tema. En la mayoría de ellos, se consiguió la propagación clonal in vitro con el desarrollo de yemas adventicias a partir de callos. En pocos casos se usaron árboles adultos como plantas madre. Rao y Lee (36) afirmaron que entre más joven sea el tejido excisado, mejor será su crecimiento al cultivarse in vitro. Esta parece ser la principal razón para seleccionar explantes que provengan de plantas jóvenes.

La información completa de estos experimentos se resume en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Investigaciones realizadas en diferentes leguminosas arbóreas cultivadas in vitro.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO					REFERENCIA
			SALES		COMPUUESTOS ORGANICOS (mg.l ⁻¹)	REGULADORES DE CRECIMIENTO		
			Macro elementos	Micro elementos		Auxinas (mg.l ⁻¹)	Citocininas (mg.l ⁻¹)	
<u>Acacia koa</u>	ápices vegetativos	callo	SH	SH	SH		2,4-D (0,2)	
	callo	yemas adventi- cias	MS	MS	MS		BAP (5)	44
<u>Albizia lebbek</u>	hipocótilos	callo	MS	MS	MS		IAA (0,5)	K (0,2)
	callo	yemas adventi- cias	MS	MS	MS		BAP (5)	2
<u>Albizia lebbek</u>	hipocótilos	callo + yemas adventi- cias	B _s	B _s	B _o		NAA (2)	BAP (0,5)
								14
<u>Albizia lebbek</u>	hipocótilos y trozos de raíz	yemas adventi- cias	MS	MS	MS		IAA (1)	K (5)
	trozos de cotilédones	callo	MS	MS	MS		IAA (0,1)	BAP (0,2)
	callo	yemas adventi- cias	MS	MS	MS		IAA (1)	BAP (5)

Cuadro 1. Continuación.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO				REFERENCIA
			SALES		COMPUESTOS ORGANICOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO	
			Macro elementos	Micro elementos			
<u>Albizia amara</u> <u>Albizia lucida</u> <u>Albizia richardiana</u>	hipocótilos	callo + yemas adventicias.	B ₅	B ₆	B ₆	BAP (2,3)	48
<u>Bauhinia blakeana</u>	hipocótilos y segmentos de cotilédones	callo	MS _{1/2}	MS _{1/2}	MS	NAA (5) 0 2,4-D (2-5)	24
<u>Cassia fistula</u>	hipocótilos y segmentos de cotilédones callo	callo yemas adventicias	MS _{1/2}	MS _{1/2}	MS	NAA (5) AS (400) + K (10)	24
<u>Ceratonia siliqua</u>	discos de pericarpo de frutos maduros	callo	W	W	W	TAA (10)	41

Cuadro 1. Continuación.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO				REFERENCIA	
			SALES		COMPUESTOS ORGANICOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO		
			Macro elementos	Micro elementos		Auxinas ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)		Citocininas ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
	hipocótilos	callo + yemas adventicias	MS	MS	Hitsch + glutamina (100)	NAA (1)	BAP (2)	
<u>Ceratonia siliqua</u>	cotilédones	callo + yemas adventicias	MS	MS	Hitsch + glutamina (100)	NAA (1)	K (2)	26
	raíces	callo + raíces	MS	MS	Hitsch + glutamina (100)	2,4-D(2)		
<u>Ceratonia siliqua</u>	nudos de ramas de árboles adultos	callo + yemas adventicias	MS	MS	contenido modificado (?)	NAA (1)	BAP (2)	47
<u>Dalbergia latifolia</u>	trozos de yemas y raíces	yemas adventicias	MS	MS	panatenato de calcio (0,1) biotina (0,1) hidrolisado de caseína (500)		K (0,5) + BAP (1)	28

Cuadro 1. Continuación.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO				REFERENCIA		
			SALES		COMPUESTOS ORGANICOS			REGULADORES DE CRECIMIENTO	
			Macro elementos	Micro elementos	($mg \cdot l^{-1}$)	($mg \cdot l^{-1}$)		Auxinas ($mg \cdot l^{-1}$)	Citocininas ($mg \cdot l^{-1}$)
<u>Dalbergia sissoo</u>	hipocótilos callo	callo yemas adventi- cias	MS MS	MS MS	MS MS	2,4-D (3) IAA (1)	K (0,2) BAP (1-3)	2	
<u>Dalbergia sissoo</u>	nudos de ramas de árboles adultos	callo + yemas adventicias	MS	MS	B ₅		K (1) o BAP (1)	8	
<u>Dalbergia latifolia</u>	trozos de hojas y entrenudos	callo + yemas adventicias	MS	MS	MS	NAA (3)	BAP (1)	38	
<u>Dalbergia sissoo</u>	nudos de ramas de árboles adultos	yemas axilares	B ₅	B ₅	B ₅		BAP (0,22)		
	nudos de ramas de árboles adultos	callo + yemas adventicias	MS	MS	MS	NAA (0,19)	BAP (1,1)	29	
<u>Dalbergia sissoo</u>	callo	callo + yemas adventicias	B ₅	B ₅	B ₅	NAA (0,48)	BAP (0,03) + K (1)	42	

Cuadro 1. Continuación.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO				REFERENCIA	
			SALES		COMPUESTOS ORGANICOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO		
			Macro elementos	Micro elementos		Auxinas (mg.l ⁻¹)		Citocininas (mg.l ⁻¹)
<u>Enterolobium cyclocephalus</u>	nudos de plántulas callo	callo yemas adventi- cias	MS MS	MS MS	MS MS	IAA (0,5) BAP (1)	53	
<u>Leucaena leucocephala</u>	hipocótilos	callo	LS	LS	LS	2,4-D (0,5) + picloram (0,06)	35	
<u>Leucaena leucocephala</u>	semillas	yemas adventi- cias	MS	MS	MS	tiaina (0,4) inositol (100)	15	
<u>Leucaena leucocephala</u>	hipocótilos y segmentos de cotilédones callo	callo yemas adventi- cias	?	?	?	NAA (0,5) BAP (5-10) BAP (2)	34	

Cuadro 1. Continuación.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO				REFERENCIA	
			SALES		COMPUESTOS ORGANICOS			
			Macro elementos	Micro elementos	(mg.l ⁻¹)	(mg.l ⁻¹)		
<u>Leucaena leucocephala</u>	hipocótilos y trozos de cotilédones	callo	MS o B ₅	MS o B ₉	MS o B ₉	2,4-D (0,5) + NAA (0,5)	BAP (0,5-10)	33
	callo	yemas adventicias.	MS o B ₅	MS o B ₉	MS o B ₉	NAA (0,5)	BAP (2)	
<u>Leucaena diversifolia</u>	hipocótilos y trozos de cotilédones	callo	MS o B ₅	MS o B ₉	MS o B ₉	2,4-D (0,5) + NAA (0,5)	BAP (0,5-10)	33
	callo	yemas adventicias.	MS o B ₅	MS o B ₉	MS o B ₉	NAA (0,5)	BAP (2)	
<u>Leucaena retusa</u>	hipocótilos y trozos de cotilédones	callo	MS o B ₅	MS o B ₉	MS o B ₉	2,4-D (0,5) + NAA (0,5)	BAP (0,5-10)	33
	callo	yemas adventicias.	MS o B ₅	MS o B ₉	MS o B ₉	NAA (0,5)	2-IP (1)	

Cuadro 1. Continuación.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO				REFERENCIA	
			SALES		COMPUESTOS ORGANICOS			
			Macro elementos	Micro elementos	(mg.l ⁻¹)	(mg.l ⁻¹)		
<u>Leucaena leucocephala</u>	nudos cotiledonares y nudos de plántulas	yemas axilares	MS	MS	MS + glutamina (58,4)	Auxinas (mg.l ⁻¹)	BAP (0,68)	12
	nudos de ramas de árboles adultos	yemas axilares	MS	MS	MS	Citocininas (mg.l ⁻¹)	BAP (0,68)	
<u>Leucaena leucocephala</u>	nudos de ramas de árboles adultos	yemas adventicias	MS _{1/2}	MS _{1/2}	myo-inositol (100)	MAA (0,05)	BAP (3)	17
	ápices vegetativos	yemas adventicias	MS	MS	MS		K (5)	39
<u>Leucaena leucocephala</u>	ápices vegetativos y nudos de plántulas	ejes caulinares	MS	MS	MS		BAP (0,68)	11
	hipocótilos	yemas adventicias	MS	MS	MS	MAA (0,25)	K (4,5)	16

Cuadro 1. Continuación.

NOMBRE CIENTIFICO	EXPLANTE	DIFERENCIACION ENCONTRADA	MEDIO				REFERENCIA
			SALES		REGULADORES DE CRECIMIENTO		
			Macro elementos	Micro elementos	ORGANICOS ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Auxinas ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) Citocininas ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	
<u>Taxatindus indica</u>	nudos de ramas de árboles adultos	yemas adventicias	MS	MS	MS	MS	K(0,2) + BAP (0,5) 27

ABREVIATURAS:

Es	: medio de Gamborg, Miller y Ojima	AS	: sulfato de adenina
MS	: medio de Murashige y Skoog	BAP	: benzilaminopurina
LS	: medio de Linsmaier y Skoog	2,4-D	: ácido 2,4-diclorofenoxiacético
MS _{1/2}	: medio de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración normal	IAA	: ácido indolacético
W	: medio de White	2-IP	: 2-isopenteniladenina
		K	: cinetina
		MAA	: ácido naftalenacético

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Localización del experimento

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Producción Vegetal del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

La investigación se efectuó durante el período de julio de 1985 a agosto de 1986.

3.2. Material vegetal

Se usaron plántulas de cuatro especies de Erythrina: E. poeppigiana, E. berteroana, E. costaricensis y E. fusca. Estas plántulas se obtuvieron de semillas germinadas asépticamente.

Las semillas las suministró el Banco Latinoamericano de Semillas Forestales (BLSF) del CATIE (Cuadro 2).

3.3. Manejo y desinfección del material

La desinfección de las semillas se hizo en una campana de flujo laminar bajo condiciones estériles.

Las semillas se sumergieron en etanol al 95 por ciento por dos minutos. Se enjuagaron en agua destilada estéril por cinco minutos, seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio (blanqueador comercial, 5,25 por ciento de NaClO)

por 20 minutos. Luego se hicieron cuatro lavados con agua destilada estéril, cada uno de cinco minutos.

Cuadro 2. Procedencia de las semillas de las especies de Erythrina usadas.

ESPECIE	No. DE LOTE EN BLSF (+)	PROCEDENCIA
<u>E. poeppigiana</u>	1717	Turrialba, Costa Rica
<u>E. berteriana</u>	1351 2443	Turrialba, Costa Rica Zarcero, Costa Rica
<u>E. costaricensis</u>	1380	Turrialba, Costa Rica
<u>E. fusca</u>	1394	Escazú, Costa Rica

(+) Banco Latinoamericano de Semillas Forestales

3.4. Siembra de las semillas

Se colocaron las simientes desinfectadas en tubos de cultivo de 15x2.5 cm. que contenían alícuotas de 10 ml de medio básico semisólido (0.7 por ciento de agar) de Murashige y Skoog (MS, Cuadro 3), sin sacarosa.

3.5. Obtención de los explantes

Dos o tres semanas después de sembrar las semillas ya se habían formado plántulas adecuadas para efectuar la excisión de los explantes. La disección se realizó en la campana de flujo laminar. Los explantes se colocaron en un plato de Petri estéril de 14 cm de diámetro. La operación de disección se efectuó con pinzas y escalpelos previamente

Cuadro 3. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (31).

COMPONENTES	CANTIDAD mg·l ⁻¹
<u>Macroelementos</u>	
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
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
<u>Microelementos</u>	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
<u>Compuestos orgánicos</u>	
Inositol	100
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2

esterilizados con la ayuda de un mechero de gas. De cada plántula se aisló el ápice vegetativo y el nudo cotiledonar.

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

3.6. Medios de cultivo

Los medios utilizados se fundamentan en el medio básico semisólido de Murashige y Skoog (MS, Cuadro 3).

Para las modificaciones de este medio básico se emplearon dos designaciones: (E) para los usados en la fase de establecimiento y (M) para los de la fase de multiplicación y cultivo horizontal ("in vitro layering") (Cuadro 4).

Los medios de cultivo se prepararon con una mezcla comercial de sales minerales del laboratorio KC Biological (EE.UU.).

Para la preparación se usaron balones aforados (volumétricos). En ellos se adicionó, aparte de las sales minerales, alícuotas de las soluciones madre de los compuestos orgánicos del medio MS (Cuadro 3) y de los reguladores de crecimiento, sacarosa y cisteína-HCl. Se mezclaron con la ayuda de un agitador magnético y se aforó al volumen deseado con agua destilada. Una vez incorporados todos los componentes requeridos se ajustó el pH de los

Cuadro 4. Composición de los medios de cultivo utilizados en la propagación clonal in vitro de Erythrina spp.

MEDIO BASICO (+)	REGULADORES DE CRECIMIENTO ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (+)	
	IBA	BAP
<u>Fase de establecimiento</u>		
MS	0	0
MS	1	0
MS	2	0
MS	4	0
MS	0	1
MS	1	1
MS	2	1
MS	4	1
MS	0	2
MS	1	2
MS	2	2
MS	4	2
MS	0	4
MS	1	4
MS	2	4
MS	4	4
MS	0	8
MS	1	8
MS	2	8
MS	4	8
<u>Fase de multiplicación</u>		
MS	0	1
MS	1	0

A todos los medios se adicionó sacarosa al 3 por ciento y $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de cisteína-HCl.

(+) MS: medio de Murashige y Skoog
 IBA: ácido indolbutírico
 BAP: bencilaminopurina

medios a 5,6 con NaOH o HCl 1N. Los medios se esterilizaron en un autoclave a una presión de $1,05 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 20 minutos.

En la fase E se usaron tubos de cultivo de $9,5 \times 2 \text{ cm}$, que contenían alícuotas de 10 ml del medio respectivo semisólido (0,7 por ciento de agar) (Cuadro 4). En esta fase se cultivó un explante por tubo; para cada uno de los medios se sembraron 25 explantes.

En la fase M se emplearon cajitas de plástico marca Magenta (tipo GA 7) que contenían alícuotas de 50 ml del medio MS semisólido (0,15 por ciento de "gelrite") y $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP (Cuadro 4). En esta fase se sembró un eje caulinar en posición horizontal por cada cajita. El número de ejes caulinares cultivado varió con la especie de Erythrina, ya que dependió de la cantidad de material vegetal disponible.

3.7. Condiciones de crecimiento

Los tubos de cultivo inoculados se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas e iluminancia de 2.000 lux a nivel de los estantes. La fuente de luz la proporcionaron lámparas fluorescentes del tipo G.E. Gro & Sho.

La temperatura se ajustó a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.8. Evaluación

3.8.1. Fase de establecimiento (E)

En cada tratamiento y para cada especie de Erythrina se contó:

- a) número de explantes supervivientes, contaminados y oxidados.
- b) número de ápices que formaron callo, ejes caulinares, ejes caulinares con callo, ejes caulinares con raíces, y ejes caulinares con callo y raíces.
- c) número de yemas cotiledonares formadas por nudo cotiledonar cultivado in vitro.

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

3.8.2. Fase de multiplicación y cultivo horizontal (M)

En cada especie de Erythrina sembrada en cultivo horizontal se contó:

- a) número de yemas axilares brotadas por cada eje caulinar cultivado in vitro.
- b) tiempo (en días) transcurrido para que brotaran las yemas axilares del eje caulinar cultivado in vitro.

Se separaron luego las yemas del explante original y se sembraron en medio MS semisólido (0,15 por ciento de "gelrite") y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de IBA (Cuadro 4), para estimular su crecimiento en longitud. Se determinó el tiempo (en días) que tardaron en formar ejes caulinares con tamaño apto para sembrarlos de nuevo horizontalmente.

Se calculó la tasa de multiplicación potencial, para cada especie de Erythrina investigada, con base en el siguiente procedimiento:

Se sumó el número total de días que tardaron los explantes para completar un ciclo de propagación. El número de días de un año (365) se dividió entre el dato anterior para obtener el número de ciclos que se puedan hacer por año. Con estos datos se obtuvo la tasa de multiplicación potencial de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

donde:

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

b = número de ciclos de propagación por año

3.9. Análisis de los datos

Los totales de supervivencia, contaminación y oxidación obtenidos en la fase de establecimiento se expresaron en porcentaje.

La respuesta morfogénica del cultivo in vitro de ápices vegetativos también se expresó en porcentaje.

Para el cultivo in vitro de nudos cotiledonares se utilizó un diseño completamente al azar. Se hicieron análisis de varianza y comparaciones de medias mediante la metodología establecida.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Fase de establecimiento (E)

Según varios autores (3, 7, 43) el establecimiento in vitro de especies arbóreas es difícil de lograr. La obtención de los explantes, a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente, resuelve algunos problemas, como por ejemplo la desinfección complicada del material vegetal y poca respuesta morfogénica en tejidos de árboles adultos. Bonga (5) indicó que entre más joven sea la planta, más sencilla será su micropropagación.

4.1.1. Supervivencia, contaminación y oxidación

Como se observa en la Figura 1 la supervivencia en esta fase, expresada en porcentaje, varió con la especie de Erythrina. Estos datos se basan en la observación de los cultivos que, luego de cuatro semanas de la inoculación, no se contaminaron u oxidaron.

Se esperó que la contaminación fuera mínima por el origen de los explantes. Sin embargo, se encontró un 4 por ciento en E. poeppigiana y E. costaricensis, un 9 por ciento en E. fusca y un 7 por ciento en E. berteriana (Figura 1). Esto se debió principalmente a la presencia de microorganismos endofíticos, en especial bacterias. Al respecto, Sweet y Bolton (46) concluyeron que estos patógenos también están presentes en semillas y por ende, en

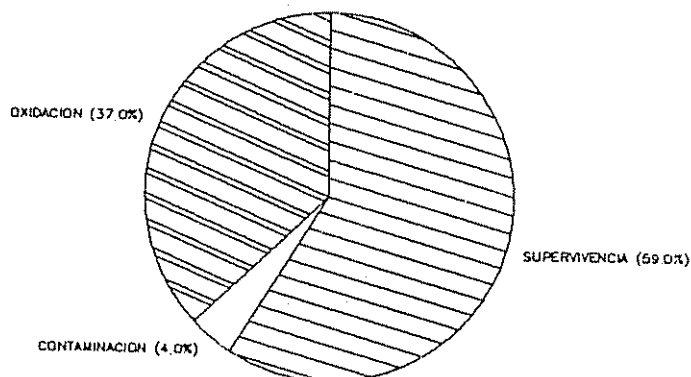
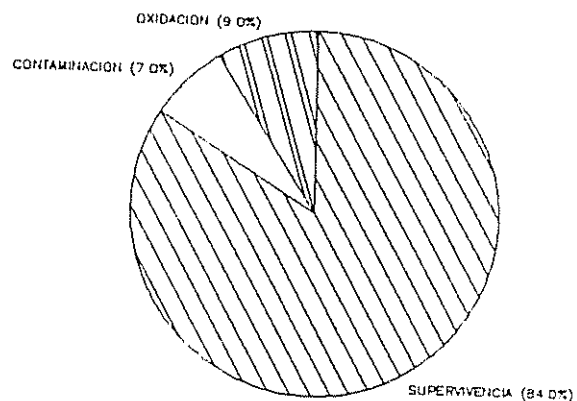
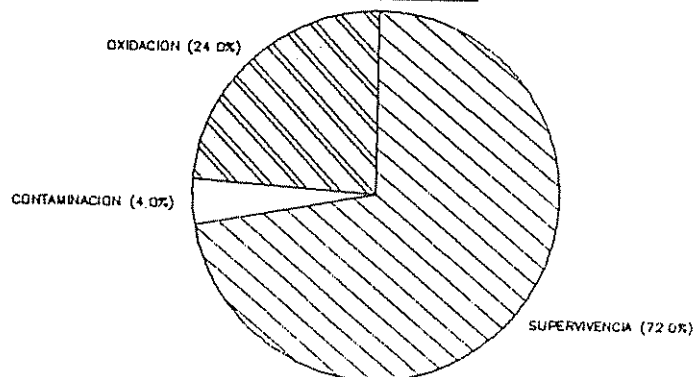
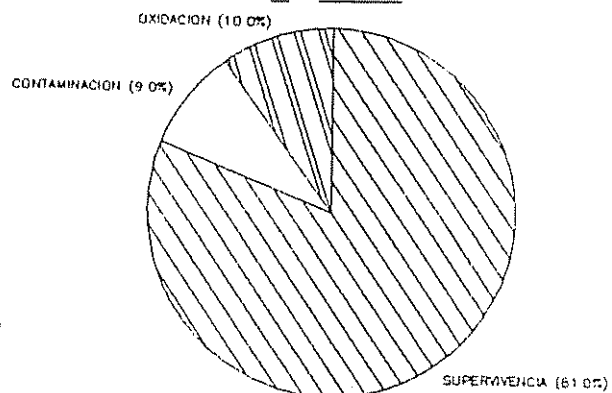
E. poeppigianaE. berterianaE. costaricensisE. fusca

Figura 1. Supervivencia, contaminación y oxidación, en porcentaje, obtenidas del total de explantes cultivados en la fase de establecimiento de la propagación in vitro de Erythrina spp.

las plántulas que de ellas surgen. También señalaron que la incidencia de estos contaminantes cambió con los lotes de semillas empleados y con la duración del almacenamiento de éstas.

Se encontró que la oxidación fue la causa más importante de la pérdida de propágulos. Cuando estos se cortaron, aparecieron coloraciones oscuras en las zonas dañadas. Esto concuerda con lo propuesto por Bonga (4), quien afirmó que la oxidación es un impedimento para la iniciación de un cultivo aséptico.

Este fenómeno ocurre por la acción de las enzimas de los tipos polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas. Actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas. Estas sustancias a su vez pueden polimerizarse y afectar proteínas. De esta forma se inhibe el crecimiento (4, 18).

Para prevenir esta situación se puede tratar de remover los compuestos fenólicos, modificar el potencial de oxidación-reducción e inactivar las enzimas (13).

La remoción superficial se hace con lavados o enjuagues de los explantes, al efectuar subcultivos frecuentes, o al agregar algún adsorbente al medio, como por ejemplo carbón activado. Se debe tener en cuenta que el carbón también puede adsorber otros componentes del medio, como reguladores

de crecimiento, por lo que su empleo requiere ciertos cuidados (4, 13, 19).

La disminución del potencial redox del medio nutritivo se consigue con el uso de agentes reductores o antioxidantes. Estos son, entre otros, el ácido cítrico, el ácido ascórbico y la cisteína-HCl (13).

Durante esta investigación se trató de controlar la oxidación con enjuagues de los explantes en una solución estéril de ácido ascórbico en combinación con ácido cítrico, agregando cisteína-HCl al medio de cultivo y haciendo subcultivos frecuentes. Sin embargo, para E. poeppigiana y E. costaricensis la oxidación alcanzó un 37 por ciento y un 24 por ciento, respectivamente, lo que redujo de manera considerable la supervivencia de estas dos especies en la fase de establecimiento. Estos resultados concuerdan con lo observado por varios autores (8, 35, 39) al cultivar in vitro fragmentos de plántulas de Dalbergia sissoo y Leucaena leucocephala.

4.1.2. Cultivo de ápices vegetativos

Los resultados se muestran en los Cuadros 5 a 8.

La respuesta morfogénica de E. poeppigiana fue un poco diferente a la de las otras tres especies de poró. En ellas únicamente hubo diferenciación de raíces en los tratamientos que carecieron de BAP, mientras que en E. poeppigiana también se manifestó en explantes cultivados en un medio con

Cuadro 5. Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo in vitro de ápices vegetativos de E. poeppigiana.

IBA mg·l ⁻¹	BAP mg·l ⁻¹	CALLO %	EJE CAULINAR %	EJE CAULINAR CON CALLO %	EJE CAULINAR CON RAICES %
0	0	25	25	25	25
1	0	-	-	25	75
2	0	-	57	29	14
4	0	-	78	22	-
0	1	-	60	40	-
1	1	-	33	67	-
2	1	-	100	-	-
4	1	14	14	58	14
0	2	-	55	45	-
1	2	11	-	89	-
2	2	-	33	45	22
4	2	-	29	71	-
0	4	-	50	50	-
1	4	70	20	-	10
2	4	-	86	14	-
4	4	37	27	36	-
0	8	50	50	-	-
1	8	22	33	45	-
2	8	14	29	57	-
4	8	7	57	36	-

Cuadro 6. Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo in vitro de
 ápices vegetativos de E. berteriana.

IBA mg·l ⁻¹	BAP mg·l ⁻¹	CALLO		EJE CAULINAR		EJE CAULINAR CON CALLO		EJE CAULINAR CON CALLO Y RAICES	
		%	%	%	%	%	%		
0	0	-	11	45	22	22	22	22	22
1	0	-	10	40	50	50	50	50	-
2	0	12	50	-	25	25	25	13	13
4	0	-	12	12	12	12	12	64	64
0	1	29	14	57	-	-	-	-	-
1	1	18	18	64	-	-	-	-	-
2	1	44	-	56	-	-	-	-	-
4	1	44	-	56	-	-	-	-	-
0	2	30	10	60	-	-	-	-	-
1	2	-	30	70	-	-	-	-	-
2	2	-	40	60	-	-	-	-	-
4	2	-	50	50	-	-	-	-	-
0	4	-	50	50	-	-	-	-	-
1	4	-	58	42	-	-	-	-	-
2	4	-	62	38	-	-	-	-	-
4	4	-	87	13	-	-	-	-	-
0	8	46	36	18	-	-	-	-	-
1	8	40	40	20	-	-	-	-	-
2	8	-	67	33	-	-	-	-	-
4	8	11	56	33	-	-	-	-	-

Cuadro 7. Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo in vitro de ápices vegetativos de E. costaricensis.

IBA mg·l ⁻¹	BAP mg·l ⁻¹	CALLO		EJE CAULINAR CON CALLO		EJE CAULINAR CON RAICES		EJE CAULINAR CON CALLO Y RAICES	
		%	%	%	%	%	%	%	%
0	0	10	-	10	40	40	40	40	40
1	0	10	-	10	60	60	60	20	20
2	0	-	8	25	17	17	17	50	50
4	0	-	9	18	18	18	18	55	55
0	1	12	75	13	-	-	-	-	-
1	1	-	67	33	-	-	-	-	-
2	1	22	56	22	-	-	-	-	-
4	1	33	33	34	-	-	-	-	-
0	2	-	83	17	-	-	-	-	-
1	2	33	45	22	-	-	-	-	-
2	2	33	56	11	-	-	-	-	-
4	2	25	63	12	-	-	-	-	-
0	4	25	50	25	-	-	-	-	-
1	4	17	50	33	-	-	-	-	-
2	4	29	57	14	-	-	-	-	-
4	4	17	83	-	-	-	-	-	-
0	8	-	64	36	-	-	-	-	-
1	8	40	20	40	-	-	-	-	-
2	8	17	83	-	-	-	-	-	-
4	8	17	66	17	-	-	-	-	-

Cuadro 8. Respuesta morfogénica, expresada en porcentaje, del cultivo in vitro de ápices vegetativos de E. fusca.

IBA mg.l ⁻¹	BAP mg.l ⁻¹	CALLO		EJE CAULINAR		EJE CAULINAR CON CALLO		EJE CAULINAR CON RAICES	
		%	%	%	%	%	%	%	%
0	0	-	37	-	-	-	63	-	-
1	0	-	50	-	-	-	50	-	-
2	0	18	46	-	-	-	36	-	-
4	0	-	30	-	-	-	70	-	-
0	1	-	80	-	20	-	-	-	-
1	1	8	75	-	17	-	-	-	-
2	1	-	60	-	40	-	-	-	-
4	1	-	75	-	25	-	-	-	-
0	2	-	89	-	11	-	-	-	-
1	2	30	60	-	10	-	-	-	-
2	2	-	92	-	8	-	-	-	-
4	2	-	82	-	18	-	-	-	-
0	4	-	33	-	67	-	-	-	-
1	4	-	40	-	60	-	-	-	-
2	4	9	55	-	36	-	-	-	-
4	4	-	86	-	14	-	-	-	-
0	8	22	78	-	-	-	-	-	-
1	8	28	36	-	36	-	-	-	-
2	8	-	44	-	56	-	-	-	-
4	8	17	33	-	50	-	-	-	-

4 mg·l⁻¹ de IBA más 1 mg·l⁻¹ de BAP (14 por ciento), 2 mg·l⁻¹ de IBA más 2 mg·l⁻¹ de BAP (22 por ciento) y 1 mg·l⁻¹ de IBA más 4 mg·l⁻¹ de BAP (10 por ciento) (Figuras 2 a 5).

Cuando no se añadió ningún regulador de crecimiento al medio de cultivo (0 mg·l⁻¹ de IBA y de BAP) se formaron raíces en E. poeppigiana (25 por ciento), E. berteriana (44 por ciento), E. costaricensis (80 por ciento) y E. fusca (63 por ciento). Esto significa que el nivel endógeno de auxinas para este género es alto, lo que concuerda con lo propuesto por Raven, Evert y Curtis (40). Estos autores mencionaron que los tejidos jóvenes presentan contenidos auxínicos elevados que promueven, en el cultivo in vitro, la iniciación de raíces.

Teóricamente concentraciones iguales de auxina y citocinina estimulan la formación de callo. Sin embargo en esta investigación la presencia de esta masa indiferenciada de células fue común en todas las especies de Erythrina y en la mayoría de las combinaciones de IBA y BAP estudiadas.

Al respecto puede anotarse lo indicado por George y Sherrington (13), quienes afirmaron que el balance auxina-citocinina es complejo. Villalobos, Thorpe y Yeung (51) explicaron que estas disparidades en el requerimiento

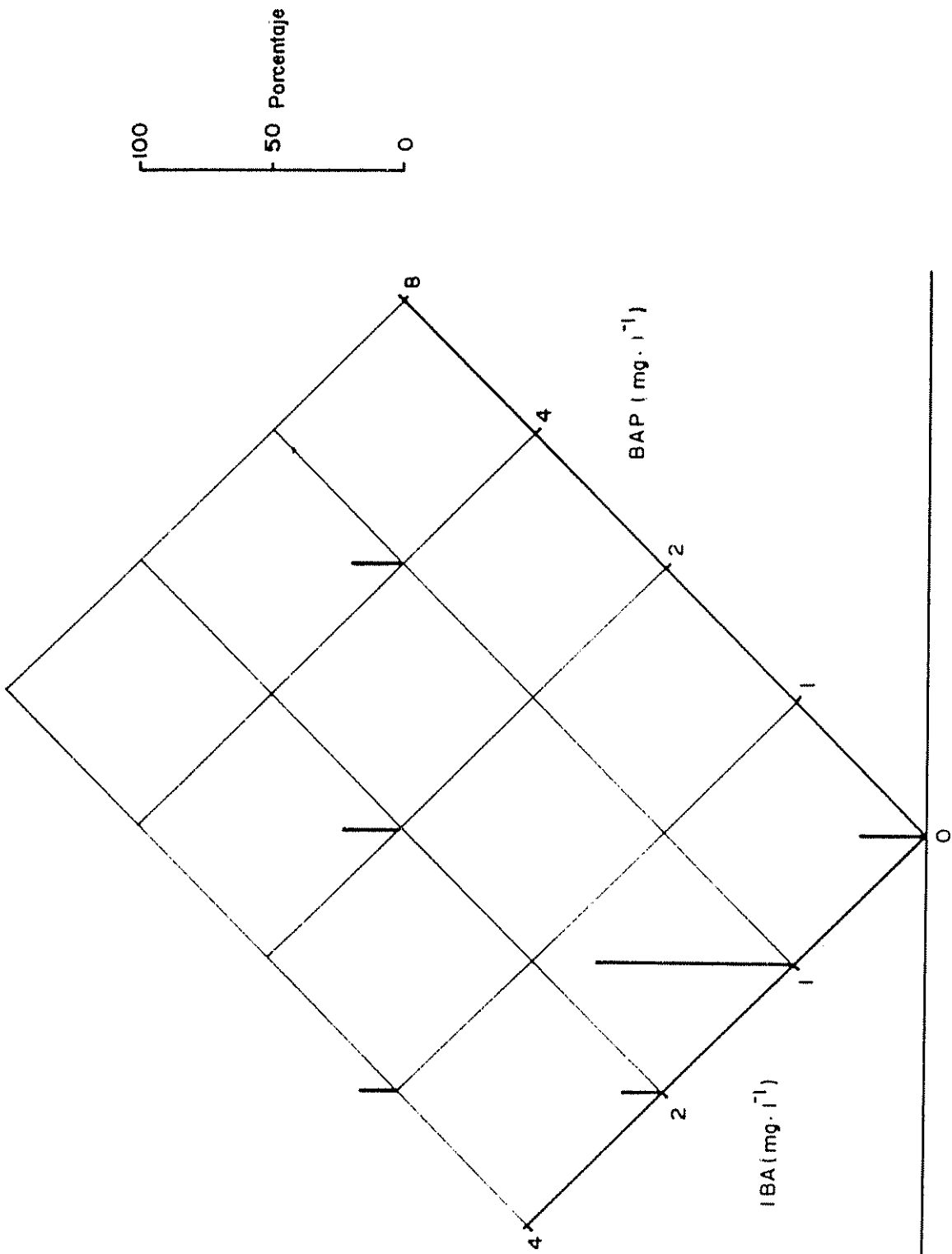


Figura 2. Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de Erythrina poeppigiana

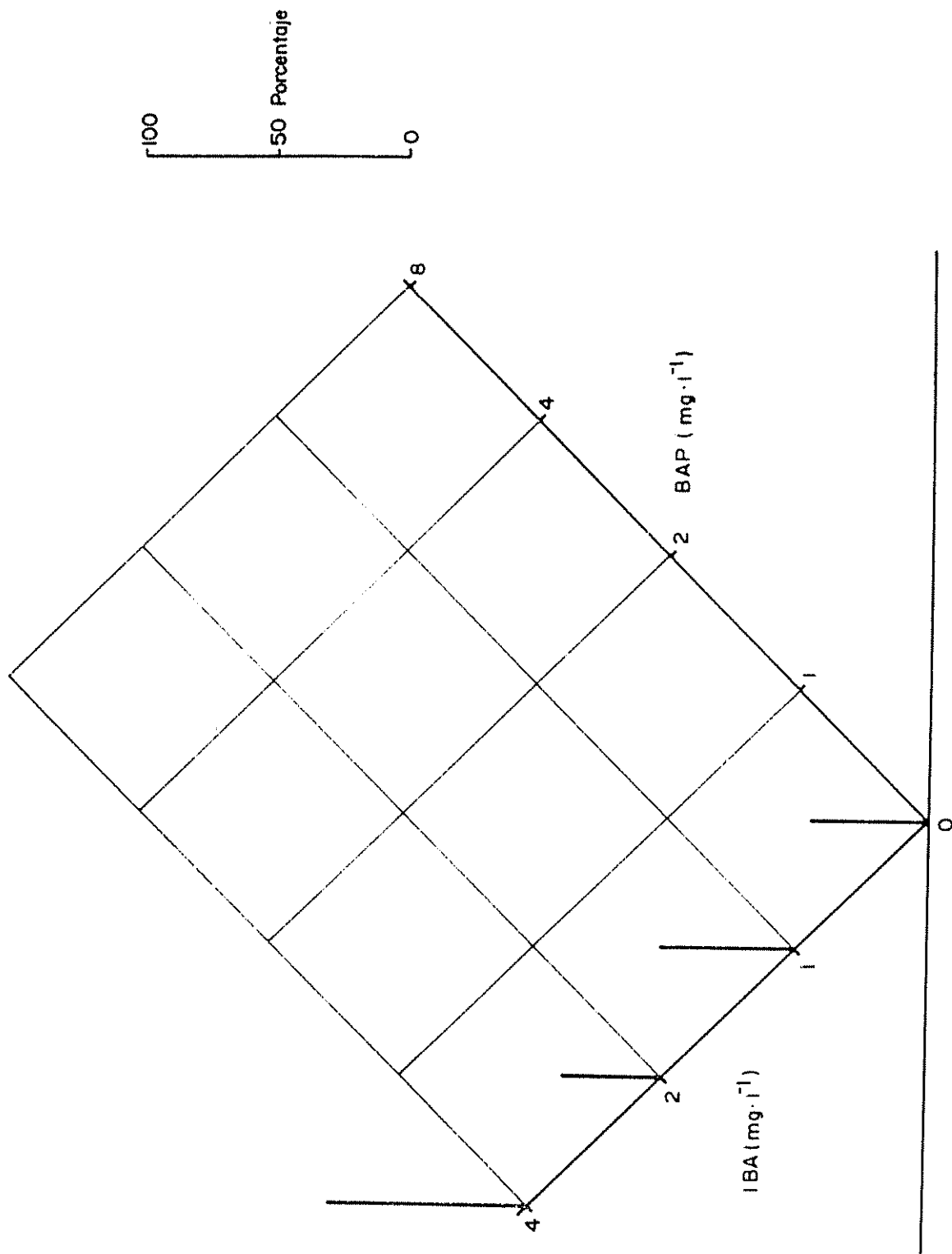


Figura 3. Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de Erythrina berteroana

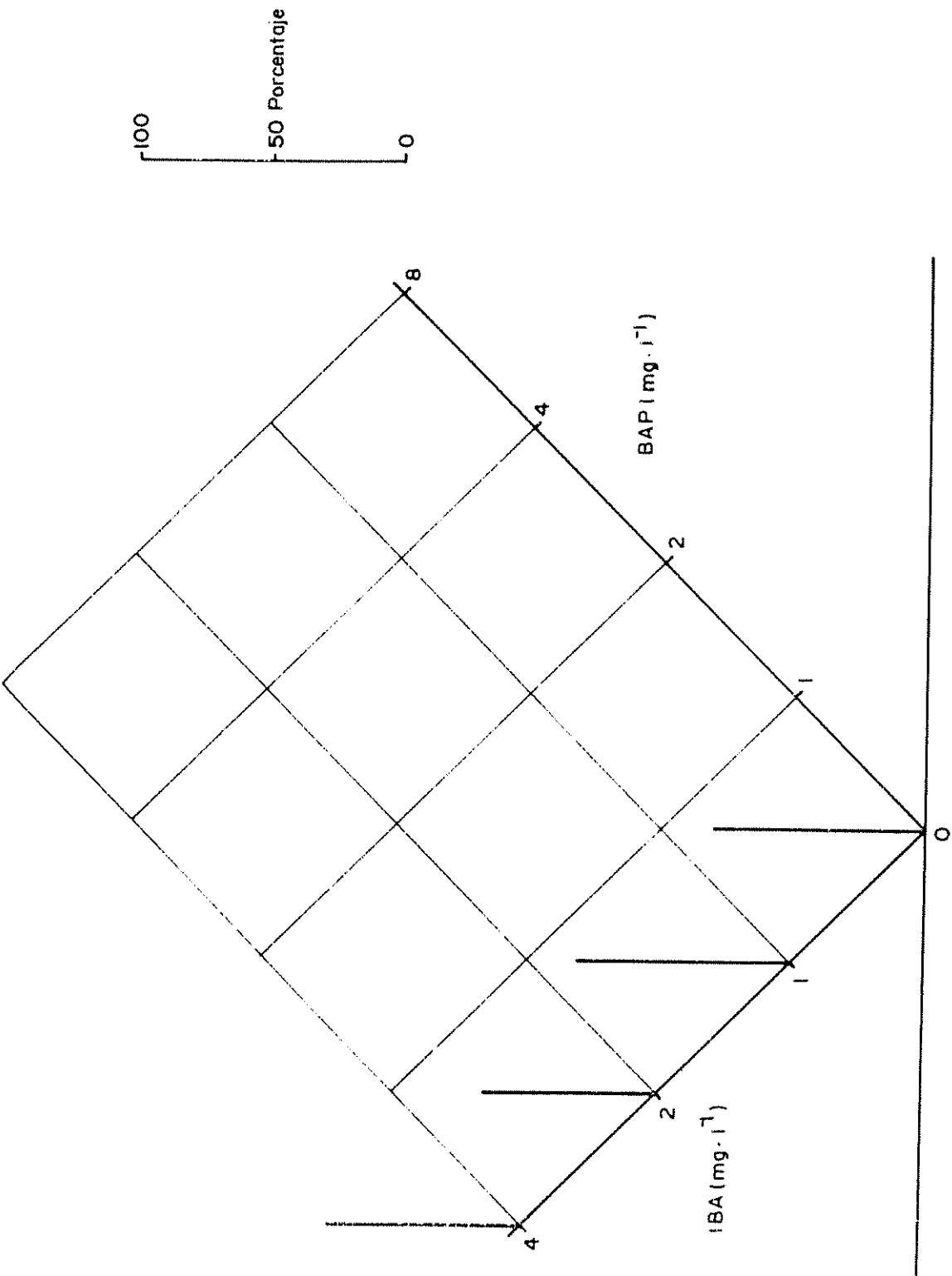


Figura 4. Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de Erythrina costaricensis

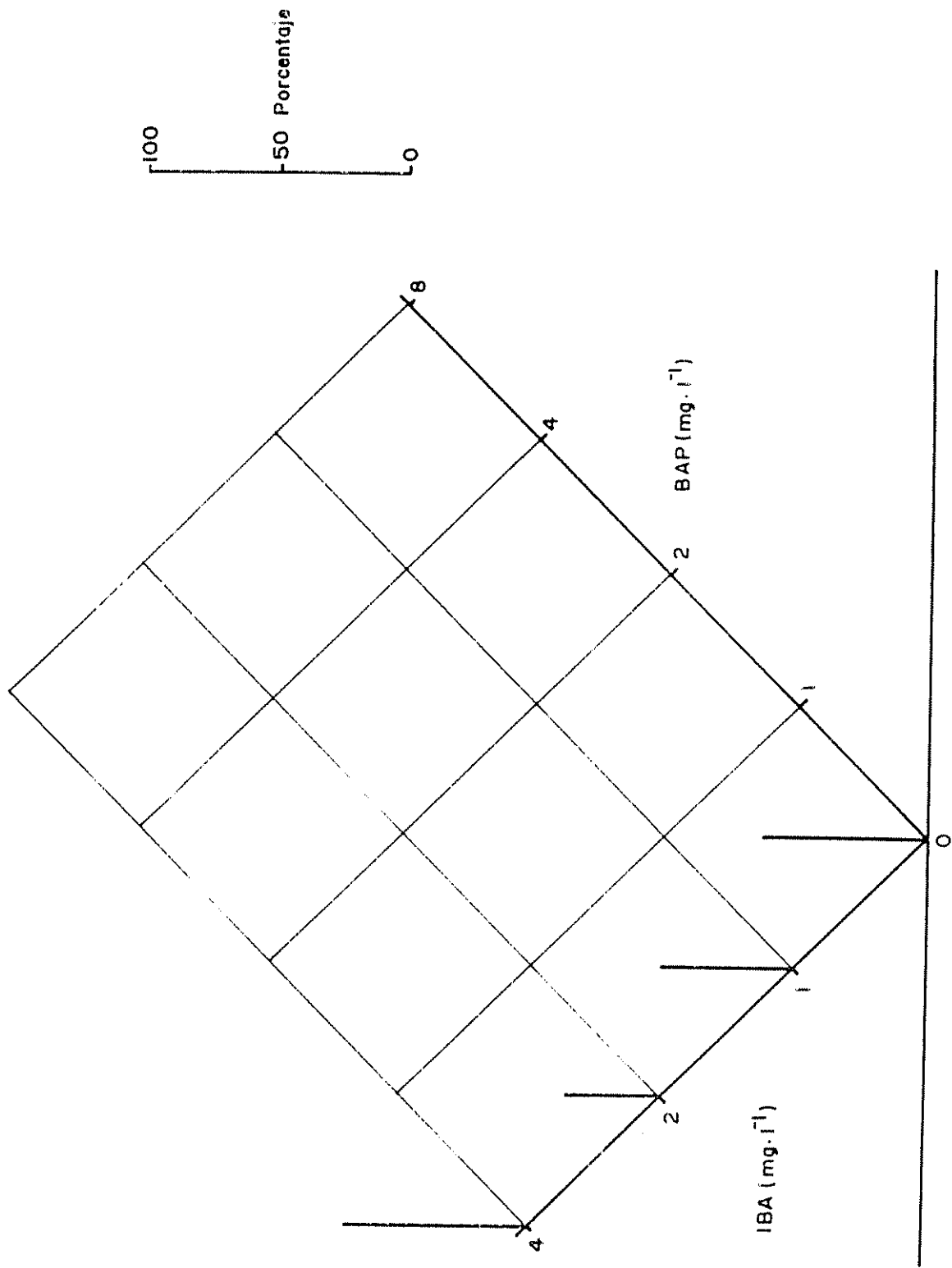


Figura 5. Diferenciación de raíces, expresada en porcentaje, en el cultivo *in vitro* de ápices vegetativos de Erythrina fusca

hormonal reflejan diferencias en los niveles endógenos de reguladores de crecimiento de los tejidos.

Estos resultados también concuerdan con los obtenidos en Ceratonia siliqua (26). Al cultivar segmentos de hipocótilos y de cotilédones se desarrolló callo en un 87 por ciento y en un 100 por ciento, respectivamente. La combinación de reguladores de crecimiento empleados fueron NAA ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) más cinetina (K) ($2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Los autores concluyeron que cada órgano necesita una concentración específica diferente de hormonas para obtener una respuesta morfogénica adecuada.

El principal objetivo del cultivo aséptico de ápices vegetativos fue el de probar su utilidad para la multiplicación in vitro. A pesar del gran número de tratamientos probados, no se logró la inducción de yemas múltiples o adventicias. Únicamente se regeneró un tallo a partir de un ápice vegetativo, es decir, que no se cumplió el principal requisito de esta metodología: obtener un número apropiado de propágulos a partir de un solo explante.

Dhawan y Bhojwani (12) informaron de una situación similar en cultivos de Leucaena leucocephala. Por esta razón, los ejes caulinares que obtuvieron los dividieron en nudos para iniciar la fase de multiplicación.

Para el caso de Erythrina se prefirió el cultivo horizontal con el propósito de estimular el crecimiento y

desarrollo de las yemas axilares y así tener un número adecuado de explantes para comenzar la fase de multiplicación.

Se detectó cierto comportamiento en cuanto al crecimiento en longitud de los ejes caulinares. Para todas las especies, aquellos tratamientos que contenían dosis medias de IBA y dosis bajas de BAP, produjeron tallos de gran altura, por ejemplo, la combinación de $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de IBA más $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP.

La formación de callo en la base de los ejes caulinares fue una respuesta generalizada, tanto para las especies de Erythrina como para los niveles de reguladores de crecimiento estudiados. Varios autores (8, 16, 47) informaron de comportamientos semejantes en Daibergeria sissoc, Prosopis cineraria y Ceratonia siliqua. Se cree que esto pueda deberse al contacto directo de esta parte del explante con el medio, y por lo tanto, con las hormonas. De esta forma, las células de esta zona del tejido responderán a la acción de los reguladores de crecimiento. También se observó la presencia de callo a lo largo de los ejes caulinares, pero este fue friable y se originó a partir de las lenticelas de los vástagos.

Una alternativa posible fue la de transferir los callos formados a un medio favorable para la diferenciación de yemas. Pero este procedimiento se descartó por el riesgo que significa para la reproducción vegetativa in vitro.

Como lo indicó Villalobos (52) se debe evitar la inducción del callo por la posible obtención de plantas diferentes (variación somaclonal).

4.1.3. Cultivo de nudos cotiledonares

Al emplear estos fragmentos de las plántulas se pretendió estimular el crecimiento de las yemas cotiledonares. Sin embargo, esto ocurrió únicamente para los cultivos de E. berteriana y E. costaricensis.

Puesto que se evaluaron muchas combinaciones de IBA más BAP, se descartó la posibilidad de que no se incluyeran los niveles óptimos de reguladores de crecimiento que permitieran la diferenciación de estas yemas en E. poeppigiana y E. fusca. En ellas solamente se consiguió la formación de callo con la mayoría de los tratamientos probados.

Se debe tomar en cuenta que la respuesta morfogénica de un explante puede variar de una especie a otra, e inclusive, dentro de un mismo clon. David (9) sugirió que esto puede relacionarse con características específicas de vigor. Vásquez (50) encontró, en un estudio preliminar de procedencias de E. poeppigiana, una mayor variabilidad genética dentro de ellas que entre ellas. Esto podría aclarar, en parte, esta desigualdad en la respuesta morfogénica del cultivo de nudos cotiledonares de Erythrina. Además se sabe que los lotes de semillas usados se formaron

con grupos aleatorizados de simientes de cada procedencia lo que también influyó en esta variabilidad.

De los análisis de varianza efectuados para los datos obtenidos en E. berteriana y E. costaricensis (Cuadro 1A) se deduce que el efecto del BAP fue más significativo que el del IBA, en relación con el número de yemas cotiledonares diferenciadas. Goyal, Bingham y Felker (17) informaron de un caso similar en Leucaena leucocephala cultivada in vitro.

Se reconoce el efecto favorable que tienen las citocininas sobre el crecimiento y desarrollo de yemas. En los experimentos efectuados se pudo comprobar este hecho por la respuesta positiva al BAP. Zaerr y Mapes (55) manifestaron que las citocininas en altas concentraciones estimulan la diferenciación de yemas e inhiben el enraizamiento en el cultivo in vitro de plantas leñosas.

En el caso de E. berteriana, al considerar en el análisis estadístico sólo el IBA (Cuadro 9), se alcanzó el mayor número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas cuando no se añadió esta auxina al medio de cultivo. Este número se redujo conforme aumentó el nivel del IBA. Aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas entre medias, es interesante destacar la tendencia establecida, pues se sabe que las auxinas normalmente no estimulan la diferenciación de yemas (40).

Cuadro 9. Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo in vitro de nudos cotiledonares de E. berteriana al considerar solo las concentraciones de IBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

CONCENTRACION DE IBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	No. PROMEDIO DE YEMAS (+)
0	1,0323 (a)
1	0,9180 (a)
2	0,8750 (a)
4	0,6923 (a)

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

Cuadro 10. Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo in vitro de nudos cotiledonares de E. berteriana al considerar solo las concentraciones de BAP ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

CONCENTRACION DE BAP ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	No. PROMEDIO DE YEMAS (+)
4	1,1333 (a)
2	1,0244 (a)
8	0,8723 (ab)
0	0,8043 (ab)
1	0,6136 (b)

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

En el Cuadro 10 se anotan los promedios de yemas cotiledonares desarrolladas en E. berteroa, cuando en el análisis estadístico, se consideraron únicamente las dosis de BAP. En estas circunstancias, las cifras más altas se obtuvieron con 2 y 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP.

Este mismo comportamiento se presentó en E. costaricensis (Cuadros 11 y 12), pero fue más evidente. Nótese que para el IBA los promedios mayores ocurrieron con los niveles de 1 y 0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que para el BAP se dieron con los niveles de 8 y 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Todos los trabajos consultados concuerdan con lo anterior. En cultivos de nudos de Tamarindus indica se logró la diferenciación de yemas múltiples al usar 0,2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de K más 0,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP (27).

Dhawan y Bhojwani (11) informaron del crecimiento de yemas axilares en ejes caulinareos de Leucaena leucocephala cultivados in vitro con 0,68 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP. Una situación similar se presentó en Dalbergia sissoo con 0,22 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP (29).

Para E. berteroa no ocurrió la interacción estadísticamente significativa entre el IBA y el BAP.

Cuadro 11. Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo in vitro de nudos cotiledonares de E. costaricensis al considerar solo las concentraciones de IBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

CONCENTRACION DE IBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	No. PROMEDIO DE YEMAS (+)
1	0,7458 <a>
0	0,6610 <a>
4	0,4211
2	0,4074

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

Cuadro 12. Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo in vitro de nudos cotiledonares de E. costaricensis al considerar solo las concentraciones de BAP ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

CONCENTRACION DE BAP ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	No. PROMEDIO DE YEMAS (+)
8	0,9333 <a>
4	0,8913 <a>
2	0,4255
1	0,3261
0	0,2444

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

(Cuadro 1A). Esto indica que para estas condiciones los factores considerados (auxina-citocinina) actuaron independientemente. Conclusiones similares demostró un ensayo de propagación in vitro de Leucaena leucocephala, en el cual se utilizaron NAA y BAP (17).

En la Figura 6 se representa la variación del número promedio de yemas cotiledonares diferenciadas de E. berteriana. La tendencia general fue la de aumentar hasta un nivel que varió entre 2 y 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP, para luego disminuir, sin que la dosis del IBA influyera en esta respuesta.

El mayor número promedio de yemas cotiledonares diferenciadas se logró con los tratamientos 0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA más 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP, 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA más 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP, y 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA más 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP (Figura 6). Esto implica que el nivel óptimo del BAP osciló entre 2 y 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ sin que dependiera del IBA, ya que se obtuvo el mismo resultado en ausencia o en presencia de este regulador.

El único efecto del IBA que se notó en este experimento fue que la dosis más elevada, 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, produjo los menores promedios de yemas cotiledonares diferenciadas (Figura 6). Debe anotarse que esta auxina, a altas concentraciones, inhibe el desarrollo de yemas (1), lo que explica esta situación.

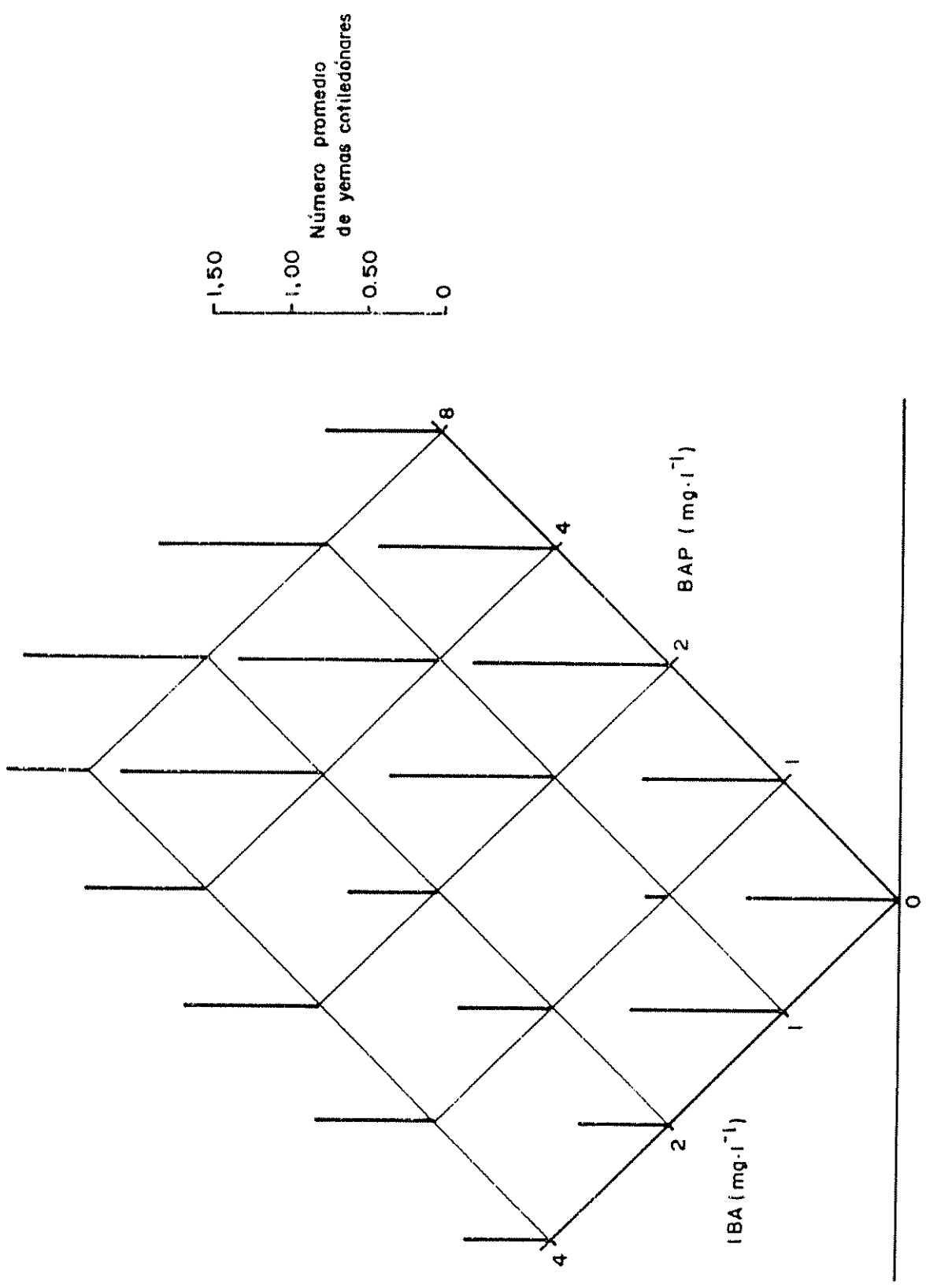


Figura 6. Número promedio de yemas cotiledónares desarrolladas en el cultivo in vitro de nudos cotiledónares de Erythrina berteroana.

Thomas y Mehta (47) informaron que en cultivos de Ceratonia siliqua, el nivel óptimo de BAP para inducir el crecimiento de yemas axilares fue de $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Concentraciones mayores redujeron el desarrollo y formaron callo. Lo mismo sucedió con nudos de Leucaena leucocephala al suplementar el medio con $0,68 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP (11).

Para E. costaricensis se presentó una interacción altamente significativa entre el IBA y el BAP (Cuadro 1A). Puede concluirse que el efecto del BAP fue diferente para cada concentración de IBA empleada. El nivel óptimo del BAP dependió, en este caso, del nivel de IBA utilizado.

En la Figura 7 se presentan las variaciones del número promedio de yemas cotiledonares diferenciadas de E. costaricensis. De acuerdo con la tendencia observada, se puede concluir que este comportamiento coincide con el balance auxina-citocinina: una concentración baja de auxina combinada con una alta de citocinina promueven el crecimiento de yemas (32).

Debe recalcar el hecho de que, para las dosis de 0 y $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA, se notó un aumento en el número promedio de yemas cotiledonares diferenciadas al incrementarse la concentración del BAP. Esto no sucedió con las dosis de 2 y $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA, lo que implica que existe un nivel crítico entre 1 y $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA, en relación con su efecto sobre la diferenciación de yemas cotiledonares (Figura 7). Lo

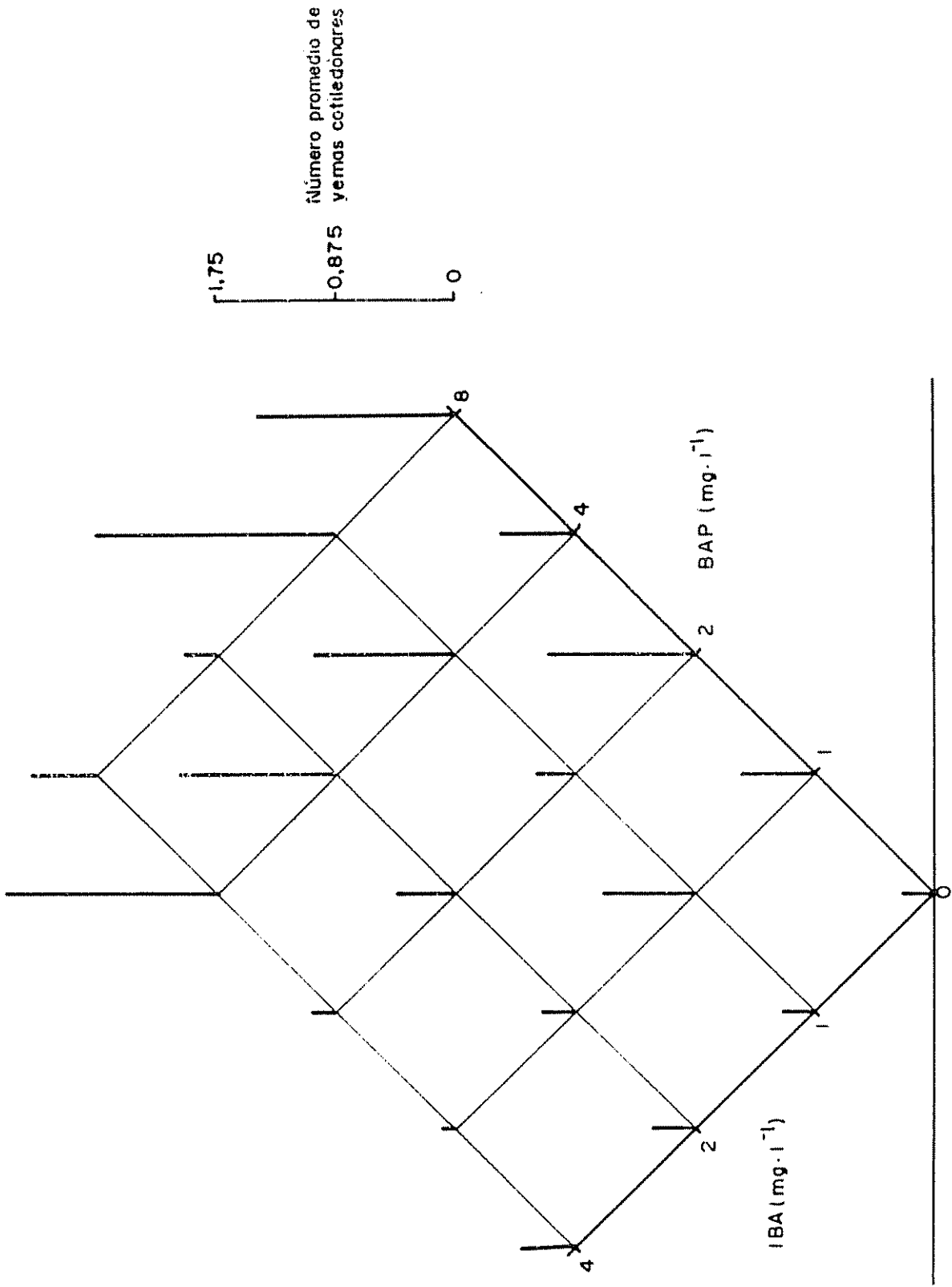


Figura 7. Número promedio de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo *in vitro* de nudos cotiledonares de *Erythrina costaricensis*

anterior corrobora de nuevo la importancia del balance auxina-citocinina ya comentada.

George y Sherrington (13) y Villalobos (52), afirmaron que las interacciones encontradas en estudios de reguladores de crecimiento son complejas y más de una combinación de ambas hormonas pueden tener resultados similares.

El mejor tratamiento fue aquel que contenía $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IBA más $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP (Figura 7). Upadhyaya y Chandra (49) obtuvieron la mayor cantidad de yemas adventicias de Albizia lebbeck al usar $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de IAA más $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de K en el medio de cultivo. En Prosopis cineraria se dio una situación similar al utilizar $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NAA más $4,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de K (16).

4.2. Fase de multiplicación y cultivo horizontal (M)

Como ya se señaló, en esta fase se seleccionó el cultivo horizontal para estimular el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares, al no lograrse la formación de yemas múltiples en el cultivo in vitro de ápices vegetativos. Los ejes caulinares usados para este propósito se obtuvieron de la fase E, formados a partir de un ápice vegetativo o de un nudo cotiledonar.

En el Cuadro 13 se presenta el número promedio de yemas axilares desarrolladas en el cultivo horizontal, cuando se añadió $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP al medio de cultivo.

Cuadro 13. Número promedio de yemas desarrolladas en el cultivo horizontal de ejes caulinares de Erythrina spp.

ESPECIE	No. PROMEDIO DE YEMAS
<u>E. poeppigiana</u>	10,00
<u>E. berteroana</u>	7,26
<u>E. costaricensis</u>	5,92
<u>E. fusca</u>	5,70

Para determinar el número aproximado de ciclos de propagación por año se obtuvo el tiempo (en días) que tardó en desarrollarse una yema axilar. También se contó el tiempo (en días) que tardó una yema axilar en crecer hasta formar un eje caulinar, con altura adecuada para repetir el procedimiento del cultivo horizontal (Cuadro 14).

De la información presentada en el Cuadro 14, se deduce que un ciclo de propagación pudo completarse en un tiempo máximo de dos meses.

En el Cuadro 15 se anotan el número aproximado de ciclos de propagación por año y las tasas de multiplicación potencial alcanzadas para cada especie de Erythrina.

Para que la propagación clonal in vitro sea ventajosa debe obtenerse un número adecuado de propágulos originados por un solo explante. La tasa de multiplicación potencial permite evaluar la eficiencia de este tipo de reproducción

Cuadro 14. Tiempo total en días, para completar un ciclo de propagación clonal in vitro de Erythrina spp.

ESPECIE	TIEMPO PROMEDIO (DIAS) PARA LA DIFERENCIACION DE YEMAS	TIEMPO PROMEDIO (DIAS) PARA EL CRECIMIENTO DE YEMAS HASTA EJES CAULINARES	TIEMPO TOTAL (DIAS)
<u>E. roeppigiana</u>	30,50	36,6	67
<u>E. berteroeana</u>	16,16	30,2	46
<u>E. costaricensis</u>	23,25	22,8	46
<u>E. fusca</u>	13,40	29,6	43

Cuadro 15. Número aproximado de ciclos de propagación por año y tasa de multiplicación potencial para Erythrina spp.

ESPECIE	No. DE CICLOS POR AÑO	TASA DE MULTIPLICACION POTENCIAL (EXPLANTES POR AÑO)
<u>E. poeppigiana</u>	5,4	$2,51 \cdot 10^3$
<u>E. berteriana</u>	7,9	$6,30 \cdot 10^6$
<u>E. costaricensis</u>	7,9	$1,30 \cdot 10^6$
<u>E. fusca</u>	8,5	$2,70 \cdot 10^6$

asexual. De acuerdo con los resultados, este valor varió con la especie de Erythrina. En el caso de E. poeppigiana la tasa fue la más baja (251.000 explantes por año), mientras que para E. berteriana fue la más alta (6.300.000 explantes por año).

De lo anterior se deduce que, en relación con las demás especies investigadas, E. poeppigiana tuvo una respuesta diferente. Sin embargo, si se compara la tasa de multiplicación alcanzada con otras en géneros taxonómicamente afines a Erythrina, se nota que es una cifra elevada. Varios autores (27) mencionaron la posibilidad de regenerar 10.000 plántulas de Tamarindus indica por año. Dhawan y Bhojwani (12) expresaron que para Leucaena leucocephala se pueden producir 80.000 plántulas por año. Trabajos hechos en Dalbergia latifolia permitieron concluir que es posible obtener 100.000 explantes por año (28).

A pesar de esta diversidad encontrada en la tasa de multiplicación potencial, se concluye que es posible efectuar la micropropagación en el género Erythrina. Se debe enfatizar que las tasas calculadas representan números teóricos, que no toman en cuenta algunos factores que puedan afectar el éxito del cultivo in vitro. Entre otros factores, la habilidad del investigador es fundamental; una manipulación inadecuada durante un subcultivo provoca la contaminación del material. El número de personas dedicadas a esta labor también influye sobre la cantidad de explantes producidos.

5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, y bajo las condiciones experimentales en que se llevó a cabo, se concluyó lo siguiente:

- 1- El éxito de la propagación clonal in vitro de Erythrina dependió de la selección adecuada del explante. Esto facilitó el establecimiento de los cultivos, que fue uno de los aspectos más difíciles de lograr, dentro de la metodología aplicada.
- 2- Los tejidos se manipularon cuidadosamente para evitar la oxidación de ellos. El efecto detrimental de esta reacción sobre el fragmento aislado fue considerable, pues inhibió su crecimiento. Esta fue la principal causa de la pérdida de propágulos en la fase de establecimiento para todas las especies investigadas.
- 3- El uso de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente no eliminó el problema de los microorganismos endofíticos, que fue el responsable de los altos porcentajes de contaminación encontrados en este ensayo.
- 4- No se observaron tendencias definidas en la respuesta morfogénica del cultivo in vitro de ápices vegetativos. Se pretendió estimular la diferenciación de yemas axilares múltiples. Sin

- embargo solo se consiguió un tallo a partir de un ápice vegetativo. Esto no permitió la multiplicación vegetativa rápida in vitro.
- 5- Por medio del cultivo horizontal se obtuvo un número adecuado de explantes para proseguir con la fase de multiplicación. De esta manera se comprobó la utilidad de este tipo de cultivo in vitro cuando no fue posible inducir el crecimiento de yemas adventicias múltiples a partir de un explante.
- 6- La diferenciación de yemas cotiledonares solo ocurrió en E. berteriana y E. costaricensis. En este caso se comprobó la existencia de un balance entre los reguladores de crecimiento auxina-citocinina, que pudo alterarse con los niveles endógenos de reguladores de los tejidos. Los mejores tratamientos fueron 2 o 4 mg·l⁻¹ de BAP para E. berteriana, independientemente de la concentración de IBA, y 1 mg·l⁻¹ de IBA más 8 mg·l⁻¹ de BAP para E. costaricensis, donde el efecto del BAP sobre la diferenciación de yemas cotiledonares dependió del nivel de IBA empleado.
- 7- Las tasas de multiplicación potencial indican que el género Erythrina respondió adecuadamente a la propagación clonal in vitro. Además permiten evaluar si este procedimiento se aplica o no a una determinada planta.

- 8- La heterogeneidad encontrada, en las respuestas morfogénicas del cultivo de ápices vegetativos y de nudos cotiledonares de las especies de Erythrina, fue apreciable. Probablemente, la variabilidad genética de los materiales usados influyó en estos resultados.
- 9- La metodología de la propagación clonal rápida in vitro permitirá reproducir vegetativamente aquellos árboles que se seleccionen por sus características sobresalientes. Por esta razón, tiene importancia a nivel comercial.

6. LITERATURA CITADA

1. BEELEN, J. s.f. Introductory course on in vitro culture. Wageningen, International Agricultural Centre. 84 p.
2. BHARGAVA, S.; UPADHYAYA, K; GARG, K.; CHANDRA, N. 1983. Differentiation of shoot buds in hypocotyl explants and callus cultures of some legumes. In Symposium on Plant Cell Culture in Crop Improvement (1981, Calcuta, India). Proceedings. Ed. by S.K. Sen; K.L. Giles. New York, Plenum Press. p. 431-433.
3. BIONDI, S.; THORPE, T.A. 1982. Clonal propagation of forest tree species. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings. Ed. by A.N. Rao. Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 197-204.
4. BONGA, J.M. 1982. Tissue culture techniques. In Tissue culture in forestry. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 4-35.
5. _____. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In Tissue culture in forestry. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 387-412.
6. _____. 1982. Vegetative propagation of mature trees by tissue culture. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings. Ed. by A.N. Rao. Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 191-196.
7. BROWN, C.L; SOMMER, H.E. 1982. Vegetative propagation of dicotyledonous trees. In Tissue culture in forestry. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 109-149.
8. DATTA, S.K.; DATTA, K.; PRAMANIK, T. 1983. In vitro clonal multiplication of mature trees of Dalbergia sissoo Roxb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 2(1):15-20.

9. DAVID, A. 1982. In vitro propagation of gymnosperms. In Tissue culture in forestry. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 87.
10. DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae (Holanda) 14(4):335-345.
Tomado de: Horticultural Abstracts (G.B.) 51(9):620. 1981.
11. DHAWAN, V.; BHOJWANI, S.S. 1984. Reduction in cost of tissue culture of Leucaena leucocephala (Lam) de Wit by replacing AR grade sucrose by sugar cubes. Current Science (India) 53(21):1159-1161.
12. _____; BHOJWANI, S.S. 1985. In vitro vegetative propagation of Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit. Plant Cell Reports (Alemania Occidental) 4:315-318.
13. GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, G.B., Exegetics. 709 p.
14. GHARYAL, P.K.; MAESHWARI, S.C. 1983. In vitro differentiation of plantlets from tissue cultures of Albizia lebeck L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 2(1):49-53.
15. GLOVAK, L.; GREATBATCH, W. 1982. Successful tissue culture of Leucaena. Leucaena Research Reports (Taiwan) 3:81-82.
16. GOYAL, Y.; ARYA, H.C. 1981. Differentiation in cultures of Prosopis cineraria Linn. Current Science (India) 50(10):468-469.
17. _____; BINGHAM, R.L.; FELKER, P. 1985. Propagation of the tropical tree, Leucaena leucocephala K67, by in vitro bud culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 4(1):3-10.
18. HARMS, C.T.; BAKTIR, I.; OERTLI, J.J. 1983. Clonal multiplication in vitro of red beet (Beta vulgaris) by adventitious shoot formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 2(2):93-102.

19. HUGHES, K.W. 1981. Ornamental species. In Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Ed. by B.V. Conger. Boca Raton, Fla., CRC Press. p. 20-21.
20. INTRODUCTION. 1981. In Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Ed. by B.V. Conger. Boca Raton, Fla., CRC Press. p. 1-4.
21. KESTER, D.E. 1982. The clone in horticulture. *HortScience* (EE.UU.) 18(6):831-837.
22. KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. 1969. Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. *Botanical Review* (EE.UU.) 35(1):59-88.
23. _____. 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* (G.B.) 57(2):151-218.
24. LEE, S.K.; RAO, A.N. 1980. Tissue culture of certain tropical trees. In International Workshop on Plant Cell Cultures (1979, Pavia, Italia). Proceedings. Ed. by F. Sala; B. Parisi; R. Cella; O. Ciferri. Amsterdam, Holanda, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p. 305-311.
25. LOCY, R.D. 1984. Notes on principles and applications; state of the art. *ATAS Bulletin* (EE.UU.) 1:8-13.
26. MARTINS-LOUÇAO, M.A.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. 1981. Establishment of proliferating callus from roots, cotyledons and hypocotyls of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seedlings. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania Occidental)* 103(4):297-303.
27. MASCARENHAS, A.F.; GUPTA, P.K.; KULKARNI, V.M.; MEHTA, U.; IYER, R.S.; KHUSPE, S.S.; JAGANNATHAN, V. 1982. Propagation of trees by tissue culture. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings. Ed. by A.N. Rao. Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 175-179.

28. MASCARENHAS, A.F.; HAZARA, S.; POTDAR, U.; KULKARNI D.K.; GUPTA, P.K. 1982. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings. Ed. by A.N. Rao. Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 719-720.
29. MUKHOPADYAY, A.; BHOJWANI, S.S. 1986. Clonal multiplication and plant regeneration from stem callus of adult Dalbergia sissoo. In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6., 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 112.
30. MÜLLER, L.; KRIKORIAN, A.D. 1985. Glosario de los términos más frecuentemente empleados en el cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, C.R. CATIE. s.p.
31. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 15(3):473-497.
32. _____. 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* (Taiwan) 18:1-24.
33. NAGMANI, R.; VENKESTESWARAN, S. 1983. In vitro culture of hypocotyl and cotyledon segments of Leucaena. *Leucaena Research Reports* (Taiwan) 4:88-89.
34. _____; VENKESTESWARAN, S. 1983. Morphogenetic responses of cultured hypocotyl and cotyledonary segments of Leucaena. In Vitro (EE.UU.) 19(3) (Parte 2):265.
35. PEASLEY, E.L.; COLLINS, G.B. 1980. Development of an in vitro culture system for Leucaena. *Leucaena Newsletter* (Taiwan) 1:54.
36. RAO, A.N.; LEE, S.K. 1982. Importance of tissue culture in tree propagation. In International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture (5., 1982, Tokyo, Japón). Proceedings. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo, Japón, Japanese Association for Plant Tissue Culture. p. 715-718.

37. RAO, A.N. 1986. In vitro studies on trees of humid tropics. In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6., 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 14.
38. RAO, K.S.; SITA, G.L.; VAIDYANATHAN, C.S. 1985. In vitro cloning of Dalbergia latifolia Roxb. (Indian rosewood). In Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by R.R. Henke; K.W. Hughes; M.J. Constantin; A. Hollaender. New York, Plenum Press. p. 346.
39. RAVISHANKAR, G.A.; AMRITA WALI; GREWAL, S. 1983. Plantlet formation through tissue cultures of Leucaena leucocephala. Leucaena Research Reports (Taiwan) 4:37.
40. REGULATING GROWTH and development: the plant hormones. 1976. In Raven, P.H.; Evert, R.F.; Curtis, H. Biology of plants. 2 ed. New York, Worth Publishers. p. 483-496.
41. SCHROEDER, C.A. 1961. Some morphological aspects of fruit tissues grown in vitro. Botanical Gazette (EE.UU.) 122(3):198-204.
42. SITA, G.L.; CHATOPADHYAY, S. 1986. Regulation of plantlet formation in Dalbergia latifolia and Dalbergia sissoo. In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6., 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 40.
43. SKIRVIN, R.M. 1981. Fruit crops. In Cloning agricultural plants via in vitro techniques. Ed. by B.V. Conger. Boca Raton, Fla., CRC Press. p. 51-139.
44. SKOLMEN, R.G.; MAPES, M.O. 1976. Acacia koa Gray plantlets from somatic callus tissue. Journal of Heredity (EE.UU.) 67(4):114-115.
45. SONDHAL, M.R.; SHARP, W.R.; EVANS, D.A. 1984. Applications for agriculture; the potential for the third world. ATAS Bulletin (EE.UU.) 1:14-20.
46. SWEET, H.C.; BOLTON, W.E. 1979. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. American Journal of Botany (EE.UU.) 66(6):692-698.

47. THOMAS, V.; MEHTA, A.R. 1983. Effect of phloroglucinol on shoot growth and initiation of roots in carob tree cultures grown in vitro. In Symposium on Plant Cell Culture in Crop Improvement (1981, Calcuta, India). Proceedings. Ed. by S.K. Sen; K.L. Giles. New York, Plenum Press. p. 451-457.
48. TOMAR, U.K.; GUPTA, S.C. 1986. Organogenesis and somatic embryogenesis in leguminous trees (Albizia spp.). In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6., 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 41.
49. UPADHAYAYA, S.; CHANDRA, N. 1983. Shoot and plantlet formation in organ and callus cultures of Albizia lebbek Benth. Annals of Botany (G.B.) 52(3):421-424.
50. VASQUEZ RUIZ, M.S. 1986. Estudio preliminar de procedencias de Erythrina poeppigiana (Walpers) O.F. Cook en Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa Universidad de Costa Rica/CATIE. 86 p.
51. VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A.; YEUNG, E.C. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo (Méx.) 51:43-59.
52. _____; THORPE, T.A. 1984. La micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura. Ed. por W. Roca. Cali, Col., CIAT. (en prensa)
53. _____; COLI, D. 1986. Anatomical events during morphogenesis in parota (tropical legume tree). In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6., 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 180.
54. WETHERELL, D.F. 1982. Introduction to in vitro propagation. Wayne, N.J., Avery Publishing Group. 87 p.
55. ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. 1982. Action of growth regulators. In Tissue culture in forestry. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 231-244.

56. ZIMMERMAN, R.H. 1985. Application of tissue culture propagation to woody plants. In Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by R.R. Henke; K.W. Hughes; M.J. Constantin; A. Hollaender. New York, Plenum Press. p. 165-177.

7. APENDICE

Cuadro 1A. Análisis de varianza para la variable número de yemas cotiledonares desarrolladas en el cultivo in vitro de nudos cotiledonares de E. berteriana y E. costaricensis.

ESPECIE	F.V.	g.l.	CM
<u>E. berteriana</u>			
	Tratamientos	19	1,1525***
	IBA	3	1,1149***
	BAP	4	1,8851*
	IBAxBAP	12	0,9177***
	Error	209	0,7995

C.V. (%) = 100,7048

E. costaricensis

	Tratamientos	19	2,5127**
	IBA	3	1,6644*
	BAP	4	4,6278**
	IBAxBAP	12	2,0198**
	Error	209	0,5865

C.V. (%) = 135,9565

n.s. Diferencia no significativa

* Diferencia significativa al 5% de probabilidad

** Diferencia altamente significativa al 1% de probabilidad

Cuadro 2A. Número total y promedio de yemas cotiledonares diferenciadas en el cultivo in vitro de nudos cotiledonares de E. berteriana.

TRATAMIENTO mg·l ⁻¹ IBA - mg·l ⁻¹ BAP	TOTAL	PROMEDIO	±	D.E.
0 - 0	12	1,0000		0,2581
0 - 1	12	0,9231		0,2480
0 - 2	17	1,3077		0,2480
0 - 4	13	1,1818		0,2696
0 - 8	10	0,7692		0,2480
1 - 0	13	1,0000		0,2480
1 - 1	2	0,1538		0,2480
1 - 2	13	1,0833		0,2581
1 - 4	16	1,3333		0,2581
1 - 8	12	1,0909		0,2696
2 - 0	7	0,5833		0,2581
2 - 1	6	0,6667		0,2981
2 - 2	4	0,5714		0,3380
2 - 4	13	1,3000		0,2828
2 - 8	12	1,2000		0,2828
4 - 0	5	0,5556		0,2981
4 - 1	7	0,7778		0,2981
4 - 2	8	0,8889		0,2981
4 - 4	9	0,7500		0,2581
4 - 8	7	0,5385		0,2480

Cuadro 3A. Número total y promedio de yemas cotiledonares diferenciadas en el cultivo in vitro de nudos cotiledonares de E. costaricensis.

TRATAMIENTO mg·l ⁻¹ IBA - mg·l ⁻¹ BAP	TOTAL	PROMEDIO	±	D. E.
0 - 0	2	0,1819		0,2309
0 - 1	5	0,4545		0,2309
0 - 2	11	0,9167		0,2211
0 - 4	6	0,4615		0,2124
0 - 8	15	1,2500		0,2211
1 - 0	2	0,1819		0,2309
1 - 1	7	0,5833		0,2211
1 - 2	3	0,2500		0,2211
1 - 4	11	0,9167		0,2211
1 - 8	21	1,7500		0,2211
2 - 0	3	0,2727		0,2309
2 - 1	2	0,1819		0,2309
2 - 2	4	0,3636		0,2309
2 - 4	11	1,0000		0,2309
2 - 8	2	0,2000		0,2422
4 - 0	4	0,3333		0,2211
4 - 1	1	0,0833		0,2211
4 - 2	2	0,1667		0,2211
4 - 4	13	1,3000		0,2422
4 - 8	4	0,3636		0,2309

Cuadro 4A. Número de yemas diferenciadas en el cultivo horizontal de ejes caulinares de Erythrina spp.

REPETICION	<u>Erythrina</u> <u>poepigiana</u>	<u>Erythrina</u> <u>berteroana</u>	<u>Erythrina</u> <u>costaricensis</u>	<u>Erythrina</u> <u>fusca</u>
1	24	16	14	8
2	17	12	8	7
3	10	10	7	6
4	9	9	6	6
5	9	9	6	6
6	8	8	6	6
7	7	7	5	5
8	7	7	5	5
9	5	7	5	5
10	4	6	4	3
11	-	6	3	-
12	-	6	2	-
13	-	5	-	-
14	-	5	-	-
15	-	5	-	-
16	-	5	-	-
17	-	5	-	-
18	-	5	-	-
19	-	5	-	-
PROMEDIO ± D.E.	10±6,05	7,26±2,92	5,92±3,03	5,7±1,34

Cuadro 5A. Tiempo transcurrido en días, para que se desarrollaran las yemas axilares en el cultivo horizontal de ejes caulinares de Erythrina spp.

REPETICION	<u>Erythrina</u> <u>poepigiana</u>	<u>Erythrina</u> <u>berteroana</u>	<u>Erythrina</u> <u>costaricensis</u>	<u>Erythrina</u> <u>fusca</u>
1	35	25	29	16
2	32	25	27	14
3	31	25	27	14
4	31	25	26	13
5	30	25	26	13
6	30	25	23	13
7	30	25	23	13
8	29	20	22	13
9	29	13	21	13
10	28	13	19	12
11	-	13	18	-
12	-	13	18	-
13	-	13	-	-
14	-	12	-	-
15	-	7	-	-
16	-	7	-	-
17	-	7	-	-
18	-	7	-	-
19	-	7	-	-
PROMEDIO ± D. E.	30,5±1,96	16,16±7,63	23,25±3,77	13,4±1,07

Cuadro 6A. Tiempo transcurrido en días, para que las yemas de Erythrina spp. provenientes del cultivo horizontal, formasen ejes caulinareos.

REPETICION	<u>Erythrina</u> <u>poeppigiana</u>	<u>Erythrina</u> <u>berteroana</u>	<u>Erythrina</u> <u>costaricensis</u>	<u>Erythrina</u> <u>fusca</u>
1	42	35	30	37
2	42	35	28	34
3	39	35	26	33
4	39	35	25	33
5	38	27	25	28
6	37	27	22	28
7	35	27	20	27
8	35	27	18	26
9	31	27	17	25
10	28	27	17	25
PROMEDIO ± D. E.	36,6±4,5	30,2±4,13	22,8±4,68	29,6±4,27

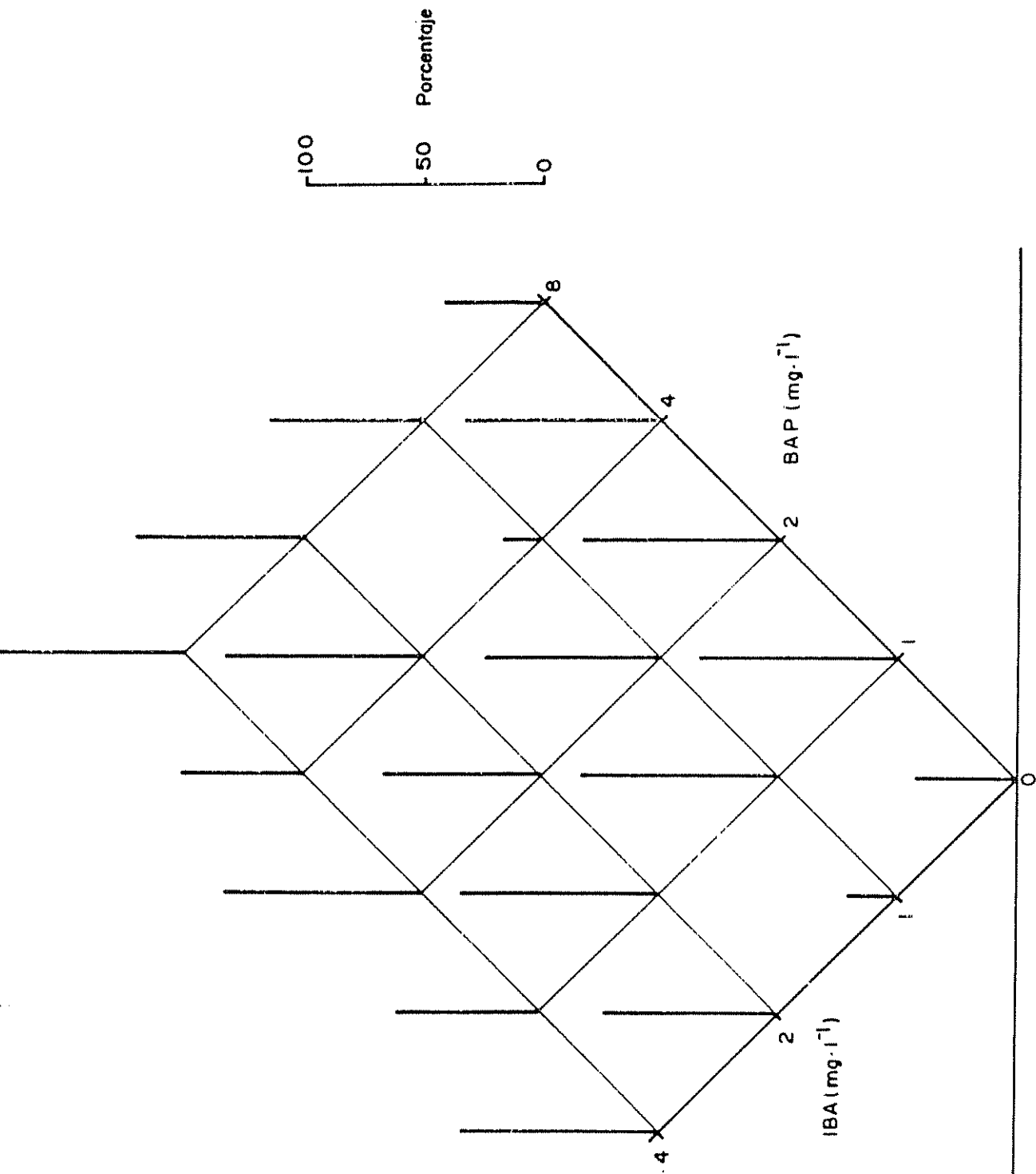


Figura 1A. Desarrollo de ejes caulinares, expresado en porcentaje, en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de Erythrina poeppigiana.

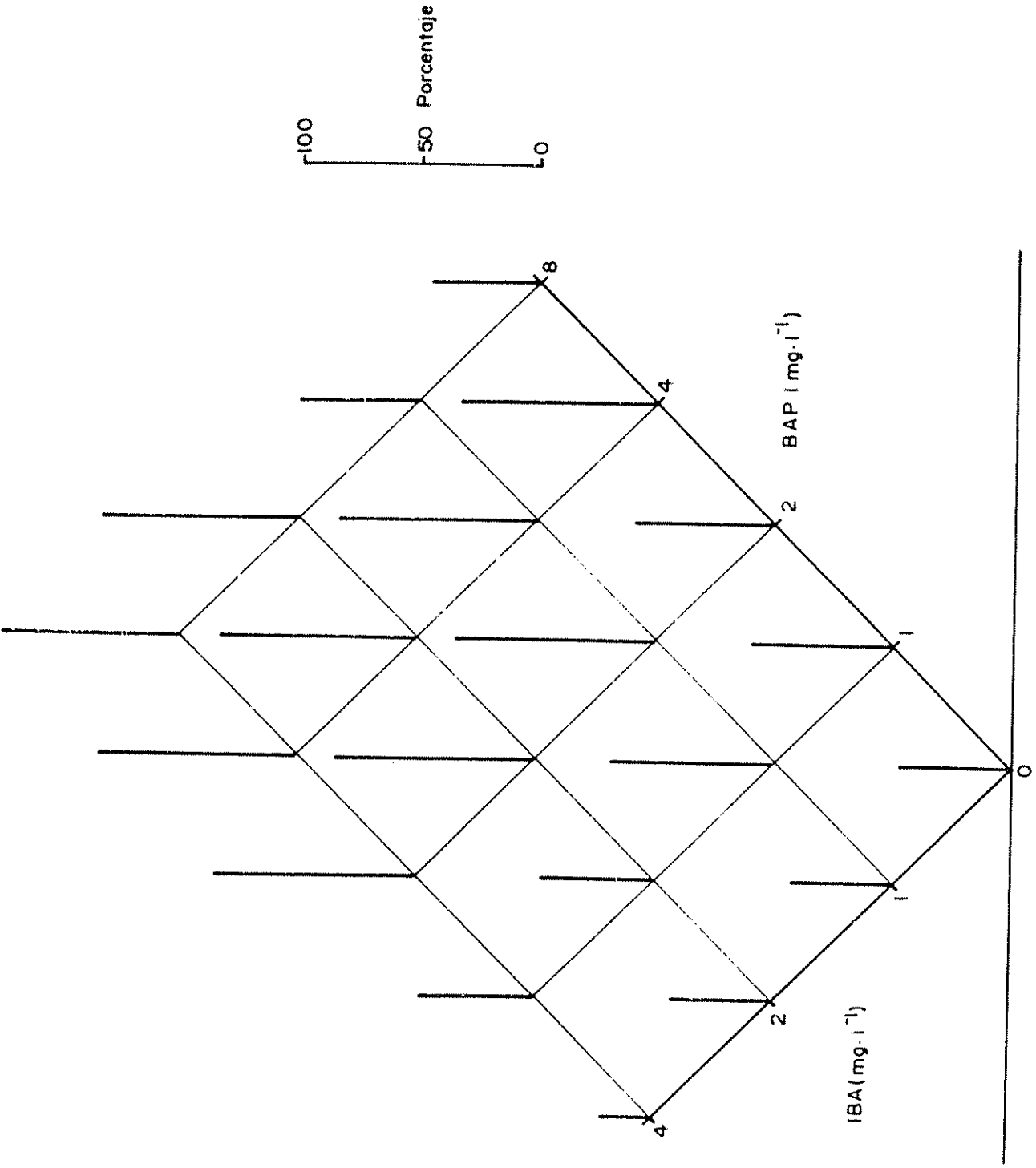


Figura 2A. Desarrollo de ejes caulinares, expresado en porcentaje, en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de Erythrina berteroana

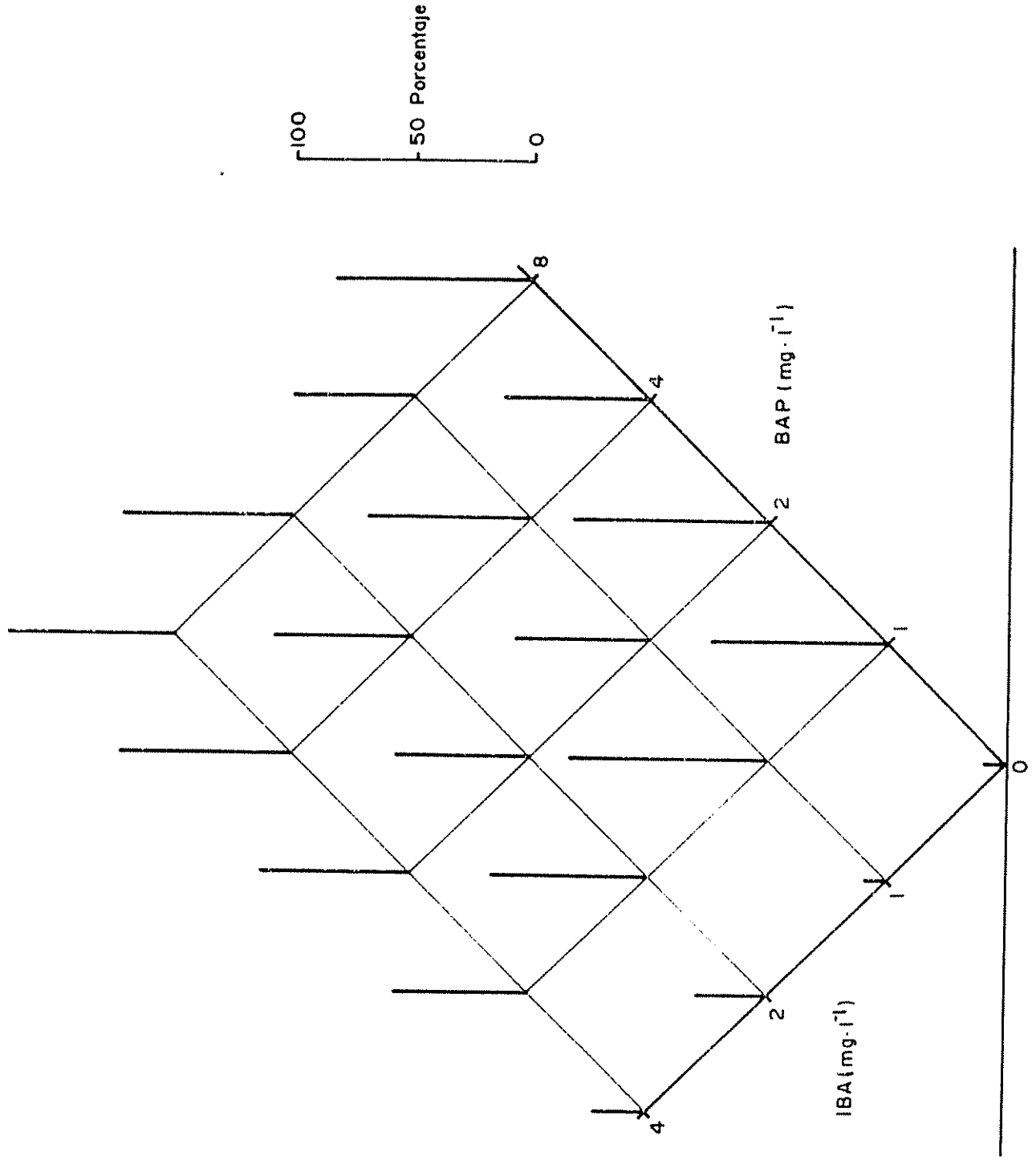


Figura 3A. Desarrollo de ejes caulinares, expresado en porcentaje, en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de Erythrina costaricensis

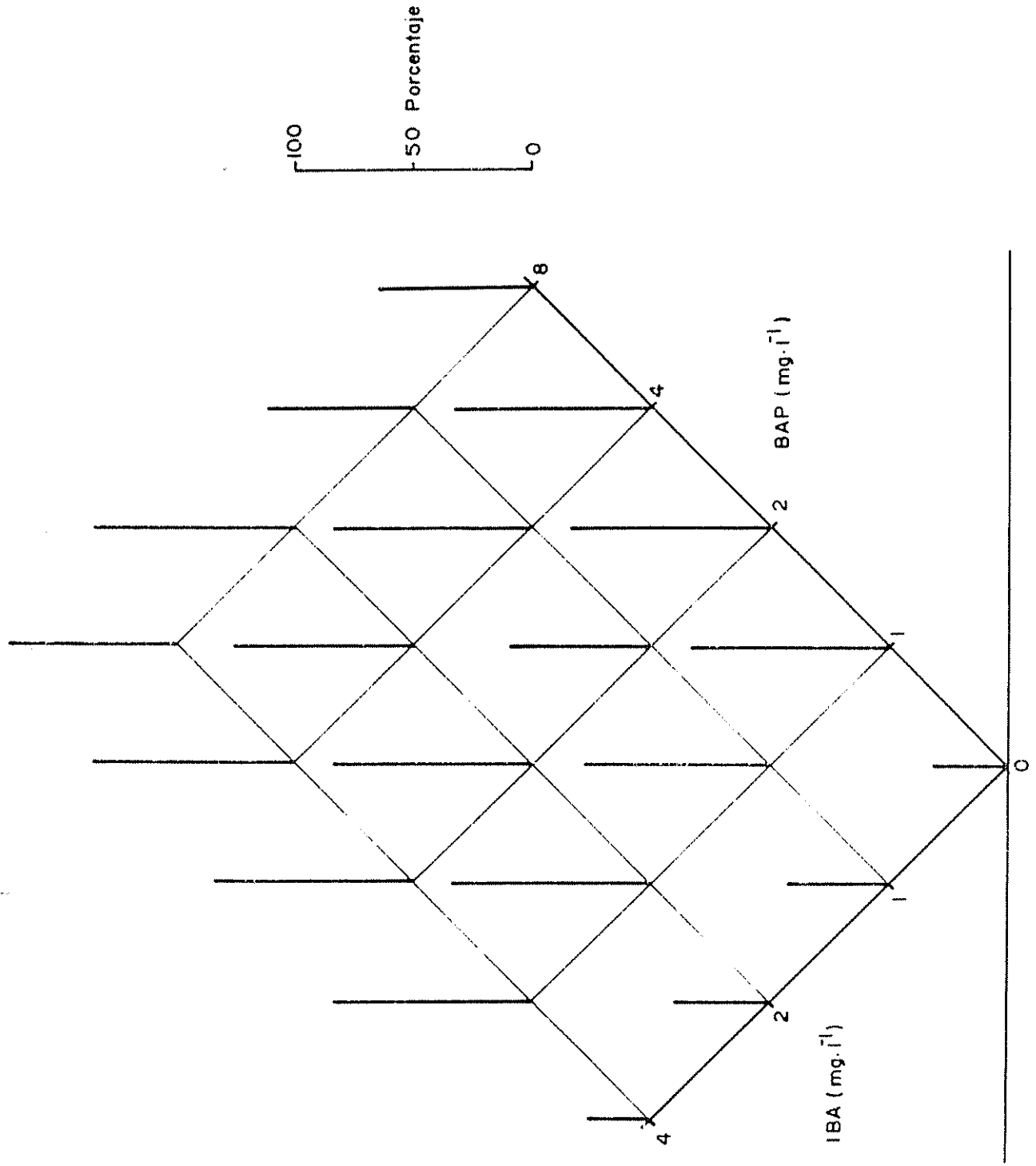


Figura 4A. Desarrollo de ejes caulinares, expresado en porcentaje, en el cultivo in vitro de ápices vegetativos de Erythrina fusca