

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA PROPAGACION IN VITRO DE ROBLE (*Tabebuia rosea* Bertol DC)

DEVELOPMENT OF AN IN VITRO PROPAGATION PROTOCOL FOR ROBLE (*Tabebuia rosea* Bertol DC)

Isidro E. Suárez¹, Alfredo J. Jarma¹ y Marledis Avila¹

Recibido para evaluación: Septiembre 13 de 2006 - Aceptado para publicación: Noviembre 20 de 2006

RESUMEN

Un avance en el desarrollo de un protocolo de micropropagación para plantas de roble (*Tabebuia rosea*) ha sido logrado con el fin de producir masivamente clones de esta especie. Para determinar el mejor tratamiento de desinfección superficial el efecto de tres concentraciones (1%, 2% y 3%) de hipoclorito de sodio con tres tiempos (5, 10 y 15 min) de exposición de los explantes consistentes de brotes axilares de 2-3 cm de longitud fueron evaluadas después de establecidos en medio ½ MS con (en mg L⁻¹) mio inositol (100), sacarosa (30,000), tiamina HCl (0.4) y TC agar (8,000) (Sigma Co.). Cinco tratamientos (0.00, 2.22, 4.44, 8.88, 17.76 µM BAP) fueron utilizados para determinar las mejores condiciones para la multiplicación, mientras que usando el mismo medio de establecimiento, el efecto de seis tratamientos (0.00, 1.35, 2.69, 4.03 y 5.37 µM ANA) fueron analizados para evaluar el enraizamiento in vitro de los brotes micropropagados. Los tratamientos fueron repetidos 15 veces y se distribuyeron usando un diseño completamente al azar. Brotes micropropagados con y sin enraizamiento in vitro fueron transferidos ex vitro. Hipoclorito de sodio al 3% durante 10 minutos fue el mejor tratamiento de esterilización superficial. La mejor tasa de multiplicación se obtuvo con 17.76 µM BAP mientras que el mayor enraizamiento ocurrió en presencia de 5.37 µM ANA. El enraizamiento in vitro fue necesario para la recuperación de plantas ex vitro donde se debe seguir trabajando para aumentar los porcentajes de recuperación mostrados.

Palabras claves: Micropropagación, enraizamiento in vitro, ex vitro, citocinina, auxinas.

ABSTRACT

A significant advance for oak (*Tabebuia rosea*) micropropagation has been developed in order to massively propagate clones. The effect of three sodium hypochlorite concentration (1%, 2% and 3%) at three times (5, 10 y 15 min) on surface disinfestations were evaluated using explants consisting of 2-3 cm axillary shoots established on ½MS with (in mg L⁻¹) mio inositol (100), sucrose (30,000), thiamine HCl (0.4) and TC agar (8,000) (Sigma Co.). Five BAP (0.00, 2.22, 4.44, 8.88, 17.76 µM) concentration were

¹Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural. Carrera 6 No. 76 – 103, Montería-Colombia. Email: isuarez@sinu.unicordoba.edu.co. Tel: (4) 790 8023. Fax: (4) 786 0255

evaluated for shoot multiplication and ANA at 0.00, 1.35, 2.69, 4.03 y 5.37 μM were evaluated for shoot rooting, both experiments had 15 replicates for treatment distributed in a complete randomized design. In vitro multiplied and rooted shoots were transferred to ex vitro for acclimatization. Ten percent sodium hypochlorite at 10 minutes was the best surface disinfecting treatment. BAP at 17.76 μM induced the higher multiplication rate while rooting was better with 5.37 μM ANA. Only in vitro rooted shoots survived to ex vitro conditions at a low rate indicating the need for further investigation to improve ex vitro acclimatization.

Key words: Micropropagation, in vitro rooting, ex vitro, cytokinins, auxins.

INTRODUCCION

El roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC) es una planta dicotiledónea de la familia Bignoniaceae con una altura de hasta 30 m y diámetro del fuste a la altura del pecho de hasta 1 m, con flores hermafroditas y semillas aladas para favorecer la diseminación por el viento (CONABIO, 2006; USDA-GRIN, 2006). Esta planta es una de las especies forestales nativas de Colombia con mayor potencial para la explotación comercial por su duramen marrón pálido con bandas que van desde los tonos grises hasta los amarillos dorados, y líneas marrón oscuro con bandas del mismo color. Adicionalmente, las condiciones físicas de densidad y mecánicas de flexión, compresión, cizalladura y dureza entre otras permiten catalogarla como la cuarta madera de mejor calidad en el mercado después de la caoba (*Swietenia macrophylla*), el cedro (*Cedrela odorata*) y la ceiba tolúa (*Bombacopsis quinata*) (Colorado, 2003).

Las situaciones actuales como las restricciones impuestas por las autoridades a la explotación de madera proveniente bosques naturales, el incremento de la demanda de madera en el mercado internacional y los incentivos ambientales y económicos por captura de dióxido de carbono han convertido los cultivos forestales en una de las actividades agrícolas con mayor futuro económico, a lo cual nuestro país no ha sido ajeno. En Colombia, la inversión en cultivos forestales vienen siendo estimulada

por políticas estatales diseñadas e implementadas como son los programas de cadenas productivas forestales que buscan establecer una base forestal de 1.5 millones ha, la zonificación de áreas de explotación forestal, la conformación y modernización de empresas forestales y el fomento de condiciones para la exportación de bienes y servicios (Ramírez y Gómez, 1999; DNP, 2003).

El éxito de las explotaciones forestales radica en la producción de maderas de excelente calidad que cumplan con los estándares exigidos por el mercado nacional e internacional, y al igual que toda actividad agrícola, la siembra de un material genético de excelente calidad es el factor más decisivo en los resultados finales del proceso. Dentro de este componente, la tendencia de la forestería moderna está dirigida hacia la siembra y cultivo de clones de alto rendimiento adaptados a ambientes específicos que permitan obtener los mayores rendimientos expresados en términos de calidad, volumen y uniformidad del producto y el tiempo a cosecha (Murillo, 2004). La aplicación de técnicas biotecnológicas en este campo ha favorecido la producción clonal masiva y el establecimiento de plantaciones clonales de especies forestales (Carrizosa *et al.*, 1994; Nadgauda, 1999; Gamboa y Aldenour, 1999; Chalupa, 2002; Ndoye *et al.*, 2003); sin embargo, su aplicación en forestales nativos como el roble ha sido poca (Castro *et al.*, 1999). El presente trabajo ha tenido como objetivo desarrollar un protocolo para establecer, multiplicar y

adaptar plantas micropropagadas en condiciones *in vitro* con miras a la producción clonal masiva de plantas para el establecimiento de cultivos comerciales.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal, desinfección superficial y establecimiento *in vitro*

Plantas de 2 a 3 años de edad fueron establecidas en recipientes con un sustrato (1:1:1, arena:suelo:cascarilla de arroz) y mantenidas en una casa malla cubierta con polisombra del 50%. Con el fin de inducir el crecimiento de yemas axilares, las plantas fueron decapitadas a una altura de 1 m aproximadamente y tratadas cada dos semanas con una solución 1mM de kinetina. Los explantes iniciales consistieron de brotes originados a partir de yemas axilares de aproximadamente 2 cm que fueron aislados, lavados durante 1 h con agua potable directamente de la llave y posteriormente sumergidos en una solución de 3 g L⁻¹ de fungicida Dithane® y Rifampicina® en dosis de 300 mg L⁻¹ durante 20 minutos. Para determinar el mejor método de desinfección superficial, se evaluó el efecto de un tratamiento control absoluto consistente de enjuague con agua destilada estéril por 10 minutos, tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1%, 2% y 3%) y tres tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos), todos los tratamientos fueron suplementados con 5 gotas de Tween 20® L⁻¹ y los tratamientos con hipoclorito fueron finalmente enjuagados con tres cambios de agua estéril en condiciones asépticas en el interior de una cámara de flujo laminar.

Los explantes tratados fueron establecidos en medios de cultivos semi sólido de Murashige y Skoog (MS) (1962) diluido a la mitad (1/2 MS) suplementado con (en mg L⁻¹) mio inositol (100), sacarosa (30,000), tiamina HCl (0.4) y TC agar (8,000) (Sigma Co.). Un explante fue establecido en cada recipiente

de vidrio de 125 cc de capacidad conteniendo aproximadamente 30 ml de medio de cultivo; posteriormente, los frascos fueron cubiertos con una capa de papel aluminio, sellados con Parafilm® y almacenados a una temperatura de 25°C con una intensidad lumínica de 40 μmol m⁻² s⁻¹ por un período de 12 horas diarias suministrada con lámparas de luz blanca fluorescente. Aquellos explantes que no se contaminaron o fallaron fueron transferidos a medios de cultivo fresco cada 3 a 4 semanas hasta que mostraron signos de adaptación.

Multiplicación *in vitro*

Con el fin de determinar el mejor tratamiento para la producción de nuevos tallos a partir del crecimiento repetido de yemas axilares, explantes consistentes de segmentos nodales de aproximadamente 1.5 cm de longitud con al menos un par de yemas opuestas fueron transferidos a un medio de cultivo similar al de la etapa de establecimiento pero suplementado independientemente con un tratamiento control absoluto y cuatro concentraciones (2.22, 4.44, 8.88 y 17.76 μM) de BAP. Los tratamientos, fueron repetidos 15 veces cada uno y distribuidos utilizando un diseño completamente al azar. Al final de la cuarta semana, se registró el número de nuevos tallos producidos por cada explante y la longitud promedio de los nuevos tallos originados, el experimento fue repetido una vez. Los datos obtenidos se analizaron por medio de un análisis de varianza con base en el modelo estadístico $Y_j = \mu + a_i + e_i$; donde μ correspondió al promedio general, i correspondió al efecto del tratamiento para inducir la multiplicación caulinar y e correspondió efecto del error experimental. Una vez realizado el análisis de varianza, los promedios fueron separados mediante la prueba de Tukey (0.05).

Enraizamiento *in vitro*

Los tallos micropropagados fueron transferidos a condiciones ambientales y un medio semi sólido similar al del estado de

establecimiento pero suplementado independientemente con un tratamiento control absoluto y cuatro concentraciones (1.35, 2.69, 4.03 y 5.37 μM) de ácido naftalenacético (ANA). Los tratamientos fueron distribuidos utilizando un diseño completamente al azar y después de cuatro semanas de cultivo, se registró el número de explantes que produjeron raíces, se calculó el porcentaje de enraizamiento por cada tratamiento, el número promedio de raíces producidas por cada explante y la longitud promedio de las raíces producidas en cada uno de los tratamientos evaluados. El análisis de los datos se realizó con un análisis de varianza con base en el modelo estadístico $Y_j = \mu + a_i + e_i$; donde μ correspondió al promedio general, i correspondió al efecto del tratamiento de enraizamiento y e fue el efecto del error experimental. Los promedios fueron separados utilizando una prueba de separación de medias de Tukey (0.05).

Transferencia a ex vitro

Las plantas micropropagadas directamente de la etapa de multiplicación y otras enraizadas in vitro fueron transferidas en bandejas conteniendo un sustrato desinfectado con proporciones 1:1:1 de arena, cascarilla de arroz y suelo. Para aquellos brotes sin enraizamiento, se evaluó el efecto de un tratamiento control y tres concentraciones (2.69, 5.37 y 10.74 mM) de ANA diluidas en agua destilada para evaluar el efecto en el enraizamiento y la recuperación final de plantas adaptadas, sumergiendo la base de los brotes en la solución de ANA por un minuto. Todas las plantas fueron colocadas en una casa malla con polisombra del 30% de transmisión de luz y riegos intermitentes de 30 segundos cada doce minutos durante las primeras dos semanas. Posteriormente fueron transferidas a otra área de la misma casa malla cubierta con polisombra del 70% de transmisión de luz y 4 riegos de 30 segundos por día. Al final de la octava semana se registró el porcentaje de plantas que sobrevivieron.

Preparación de medios de cultivo y esterilización

El pH de todos los medios fue ajustado a 5.7 – 5.8 con KOH o HCl previo a la adición de agar, posteriormente los medios fueron esterilizados en un autoclave a 121°C y 1.1 kg cm^{-2} por un período de 15 minutos y finalmente vertidos en los recipientes.

RESULTADOS

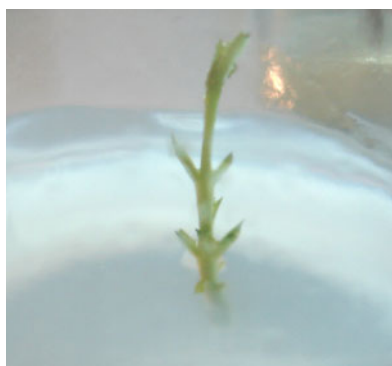
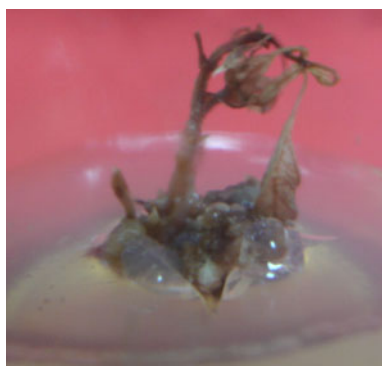
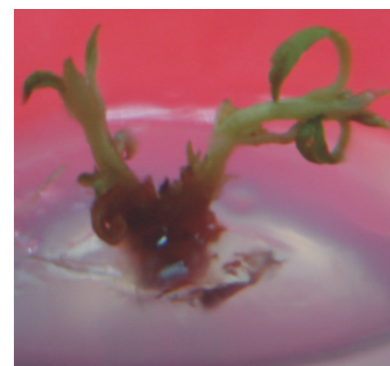
Desinfección superficial y establecimiento in vitro

Los resultados del experimento de esterilización superficial permitió confirmar que el uso de hipoclorito de sodio fue necesario para obtener explantes libres de contaminantes superficiales al compararse con el tratamiento control donde se observó contaminación en todos los explantes (Tabla 1). El tratamiento que permitió obtener el mayor porcentaje de explantes libres de contaminación fue el que consistió de una concentración de 3% de hipoclorito de sodio con un tiempo de exposición de 10 minutos (Figura 1A). Dentro de los tipos de agentes contaminantes presentes, los más frecuentes fueron los hongos, que de acuerdo con la identificación realizada en el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Córdoba correspondieron a especies de los géneros *Fusarium*, *Verticillium* y *Cladosporium*. Los datos registrados con relación a la fitotoxicidad causada por el tratamiento de desinfección, no muestran una relación consistente con las dosis de desinfectante ni los tiempos utilizados.

La presencia de contaminantes tanto externos como internos afectan el desempeño de los explantes una vez establecidos en condiciones in vitro haciendo indispensable el uso técnicas que permitan la detección de patógenos sistémicos y su desinfección superficial (Leifert y Cassels, 2001; Suárez *et al.*, 2003). La desinfección de explantes aislados de plantas leñosas perennes ha sido siempre una de las limitantes más severas para el establecimiento in vitro de este tipo de especies reportándose

Tabla 1. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección superficial sobre la contaminación in vitro de explantes de roble (*Tabebuia rosea*).

Concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición de los explantes al tratamiento	Contaminación (%)	Fitotoxicidad (%)
Control (Agua estéril durante 10 minutos)	100	0
1% durante 5 minutos	96	10
1% durante 10 minutos	92	0
1% durante 15 minutos	95	5
2% durante 5 minutos	94	25
2% durante 10 minutos	92	5
2% durante 15 minutos	93	20
3% durante 5 minutos	88	5
3% durante 10 minutos	72	5
3% durante 15 minutos	84	5

**A****B****C****D****E****F****Figura 1.** Micropropagación de roble (*Tabebuia rosea*). A = Establecimiento de explantes, B = Contaminación tardía de tejidos, C = Multiplicación de brotes, D = Planta micropropagada y enraizada, E = Formación de raíces adventicia en la base de los brotes micropropagados y F = Plantas micropropagadas adaptadas a condiciones ex vitro.

contaminaciones mayores del 90% en explantes de guayaba dulce (*Psidium guajaba* - Mirtaceae) (Viloria *et al.*, 1993), caoba y cedro (Abdelnour y Muñoz, 1997). Los resultados del presente estudio muestran que las contaminaciones de explantes de roble establecidos en condiciones in vitro tuvieron comportamientos similares a los reportes citados. Adicionalmente, los datos colectados indican claramente que los enjuagues previos con fungicidas y bactericidas complementados con la desinfección superficial con hipoclorito de sodio no son suficientes para eliminar completamente los contaminantes presentes en la superficie de los explantes; incluso, observaciones posteriores (Figura 1B) permitieron detectar la presencia de contaminaciones en explantes sanos después de varios subcultivos debiéndose probablemente a infecciones de expresión tardía. No obstante, nuevos reportes consignan avances en el manejo de la desinfección superficial de explantes de especies leñosas perennes; Avila (2004) reporta una disminución significativa del número de explantes contaminados de abarco (*Cariniana pyriformis* – Lecythidaceae) y cedro tratados con el desinfectante GARHOX 30® comparados con tratamientos con concentraciones de hipoclorito de sodio similares a las usadas en el presente estudio.

Multiplicación in vitro

El desarrollo de los nuevos brotes se produjo a partir de las yemas axilares presentes en los explantes (Figura 1B). El análisis de varianza permitió concluir que se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($Pr < 0.0001$) como efecto de los diferentes tratamientos con respecto a la variable número de nuevos brotes producidos por explante, observándose que el mayor número promedio de nuevos brotes ocurrió cuando el medio de cultivo fue suplementado con las dosis más altas de BAP (4.44, 8.88 y 17.76 μM), mientras que los valores más bajos para la misma variable se registraron cuando los explantes fueron cultivados en presencia de la dosis mínima de BAP (2.22 μM) y el tratamiento control (Figura 2). Al analizar los datos correspondientes a la variable longitud promedio de los nuevos brotes

producidos, se concluyó que se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($Pr = 0.0317$), donde los tallos producidos a partir de los explantes cultivados en los medios suplementados con BAP desarrollaron una mayor longitud que aquellos que crecieron a partir de los explantes cultivados en presencia del tratamiento control (Figura 2).

La producción repetida de nuevos tallos a partir de yemas axilares, es uno de los efectos más espectaculares de la adición de citocininas en el medio de cultivo de explantes con meristemas axilares pre-existentes y una de las estrategias biotecnológicas que más ha contribuido a la propagación clonal de especies forestales (Ahuja, 1992; Kane, 1996; Castro, 1999). En el presente estudio, los resultados obtenidos permiten afirmar que el suplemento de citocininas en el medio tuvo un efecto favorable al incrementar de forma significativa el número de nuevos brotes desarrollados, resultados que se presentaron en proporciones comparables a otras especies forestales y leñosas perennes. Por ejemplo, Daquinta *et al.* (2001) utilizando explantes consistentes de yemas obtenidas a partir de brotes enraizados, reportaron que el efecto combinado de kinetina (1.83 μM) con BAP (4.44 o 6.66 μM) indujo una tasa de 2.4 a 2.6 nuevos brotes por explante en un período de 6 semanas. Posteriormente, Castro *et al.* (2002) reportaron que la mayor tasa de multiplicación en teca (*Tectona grandis*) se obtuvo cuando los explantes consistentes de meristemas apicales obtenidos de brotes epicórmicos fueron cultivados en un medio MS suplementado con 2.22 μM de BAP. Biroscikova *et al.* (2004) experimentando con explantes de árboles adultos de olmo (*Ulmus glabra*), aumentaron de 3.05 nuevos brotes por explante con suplemento de BAP a 5.08 nuevos brotes por explante con BAP en combinación con tidiázuron (TDZ). Otros resultados indican que no solamente el suplemento combinado de citocininas sino la combinación de citocininas y auxinas tiene efectos favorables en la multiplicación de

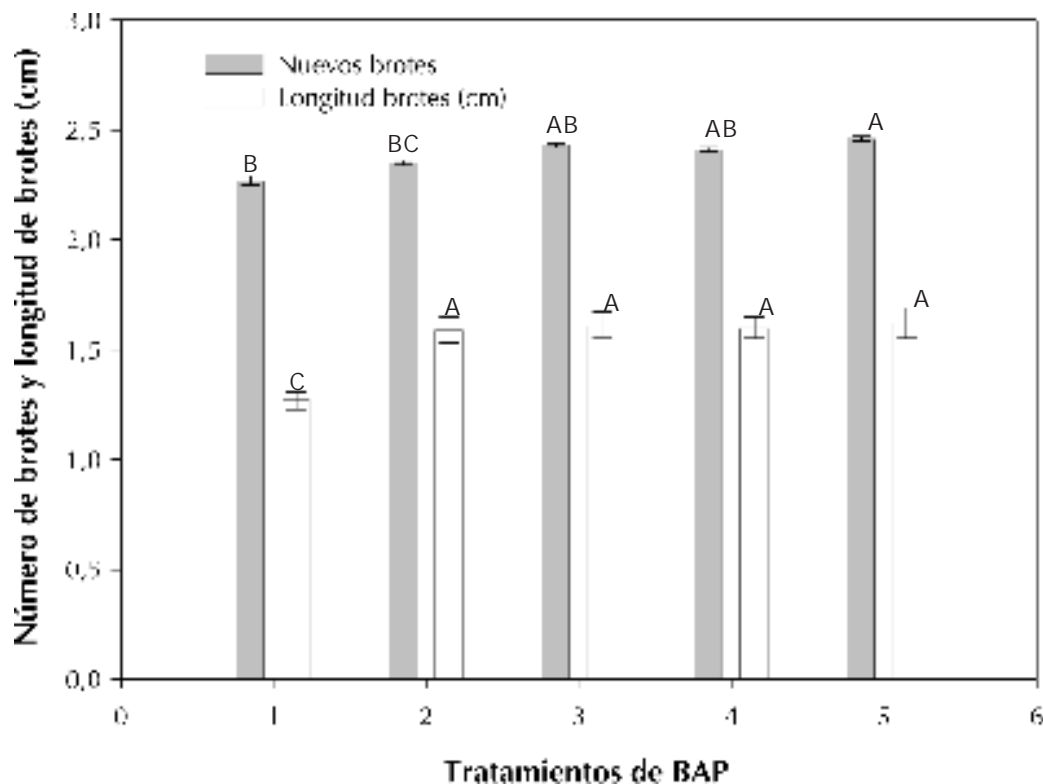


Figura 2. Efecto de diferentes tratamientos (1= Control absoluto, 2= 2.22 μ M BAP, 3= 4.44 μ M BAP, 4= 8.88 μ M BAP y 5= 17.76 μ M BAP) sobre el número y la longitud de nuevos brotes producidos a partir de explantes con meristemos pre-existentes de roble (*Tabebuia rosea*).

algunas de estas especies, como lo reportado por Tiwari *et al.* (2002) quienes observaron la mayor tasa de multiplicación en teca (*Tectona grandis*) cultivando los explantes en medio MS suplementado con 2.22 μ M de BAP y 0.57 μ M de ácido indolacético (AIA). Bunn *et al.* (2005) utilizaron una dosis de 0.57 μ M de AIA en combinación con 0.5 μ M de zeatina para multiplicar meristemos axilares obtenidos de plantas de *Eucalyptus phylacis* regeneradas en condiciones *in vitro*. Los anteriores resultados indican que las tasas de multiplicación obtenidas en el presente trabajo están en concordancia con aquellas reportadas para la mayoría de especies forestales, las cuales por su misma naturaleza recalcitrante al crecimiento en condiciones *in vitro*, son menores a otras plantas especialmente aquellas de consistencia herbácea (Amutha *et al.*, 2006); sin embargo, los trabajos citados en especies con mayor número de investigaciones en el

campo del cultivo de tejidos podrían ser un indicativo de que las combinaciones de citocininas o los suplementos simultáneos de auxinas y citocininas podría aumentar las tasas de multiplicación de roble, lo cual necesita ser validado experimentalmente para esta especie.

Enraizamiento *in vitro* y transferencia a condiciones *ex vitro*

Los datos registrados en la tabla 2 muestran que la presencia de ANA en el medio de cultivo incrementa el porcentaje de enraizamiento al compararse con el tratamiento control; mientras que los tratamientos donde se adicionó ANA permitieron a todos los explantes cultivados desarrollar raíces (Figura 1C y 1D), sólo el 52% de aquellos cultivados en ausencia de este regulador desarrollaron raíces adventicias. El análisis de varianza aplicado a los datos colectados para la variable

número de raíces producidas por explante, permitió concluir que existieron diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) como resultado de los tratamientos aplicados, mostrándose que el mayor número de raíces adventicias fue inducida cuando los brotes micropropagados fueron cultivados en la concentración más alta ($5.37 \mu\text{M}$) de ANA, mientras que el menor número de raíces fue registrado para el tratamiento control. Con respecto a la variable longitud promedio de las raíces producidas en cada tratamiento, el análisis de varianza permitió encontrar diferencias estadísticamente significativas ($Pr = 0.039$), mostrándose igualmente que las raíces inducidas a partir de los explantes cultivados en presencia de ANA tuvieron una mayor longitud que aquellas desarrolladas a partir de los brotes cultivados en el tratamiento control (Tabla 2). Sólo los brotes enraizados lograron sobrevivir a las condiciones ex vitro; el porcentaje de supervivencia de las plantas micropropagadas transferidas a condiciones ex vitro fue del 12% al final de la cuarta semana y aquellas que sobrevivieron mostraron hasta la semana 8 una apariencia normal en términos morfológicos (Figura 1E).

El estado III del proceso de micropropagación tiene como función desarrollar en la planta micropropagada los mecanismos necesarios para subsistir sin suplementos externos de carbohidratos mediante el desarrollo y funcionamiento de un sistema radical

eficiente. Aunque en la mayoría de los casos se busca pasar directamente de la multiplicación a la transferencia ex vitro como una forma de ganar eficiencia, la producción de raíces afecta significativamente las posibilidades de recuperación de especies leñosas perennes en el estado IV de la micropropagación (Lara *et al.*, 2003; Kane, 1996). Los análisis de los resultados del presente estudio mostraron la necesidad y suficiencia del suplemento auxínico para inducir buenos porcentajes de enraizamiento, adecuado número de raíces por explante y la proporcionalidad entre el número de raíces producidas y la concentración de ANA, aunque aumentó el tamaño de las mismas lo cual podría causar estrés por daños de raíces al momento del trasplante a condiciones ex vitro. Efectos similares de ANA en el enraizamiento in vitro de varias especies leñosas y herbáceas tales como *Prunus fruticosa* y *Prunus tormentosa* (Pruski *et al.*, 2003), *Decalepis arayalpatra* (Sudha *et al.*, 2005), *Stevia rebaudiana* (Suárez *et al.*, 2005), *Viburnum odoratissimum* (Schoene y Yeager, 2005) y *Elaeagnus angustifolia* (Iriondo *et al.*, 1995) entre otros ha sido observado.

En algunas especies forestales, el enraizamiento in vitro es reemplazado por la aplicación de impulsos fisiológicos consistentes en la inmersión temporal de la parte basal de los brotes micropropagados en

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) sobre el enraizamiento de brotes micropropagados de roble (*Tabebuia rosea*).

Tratamiento	Enraizamiento (%)	Raíces por brote	Longitud raíces (cm)
Control	52	1.8 C	0.62 B*
1.35 μM ANA	100	7.5 BC	1.55 A
2.69 μM ANA	100	10.5 ABC	1.60 A
4.03 μM ANA	100	15.7 AB	1.55 A
5.37 μM ANA	100	19.8 A	1.65 A
<i>Pr</i>	-	< 0.0001	0.039

*Promedios con las mismas letras no son diferentes de acuerdo con Tukey (0.05%)

una solución de auxinas seguido por el inmediato trasplante de los brotes a un sustrato en condiciones *ex vitro*. Esta metodología ha sido utilizada para enraizar *ex vitro* plantas micropropagadas de teca sumergiendo la base de los tallos en una solución con 9.8 mM de ácido indolbutírico (IBA) logrando un 80% de recuperación de las plantas transplantadas (Tiwari *et al.*, 2002). Castro *et al.* (2000) experimentando la misma técnica con brotes micropropagados de teca usando una solución con 19.6 mM de IBA o la aplicación de productos comerciales en presentaciones de polvo en dosis de combinadas de 4.9 mM de IBA y 10.74 mM de ANA reportaron resultados similares. Sin embargo es necesario realizar más estudios para validar o ajustar la utilidad de esta metodología a la adaptación *ex vitro* de plantas micropropagadas de roble. Las bajas tasas de recuperación en la micropropagación de especies leñosas ha sido una de las grandes limitantes en la aplicación del cultivo de tejidos vegetales en forestales llegando en algunos casos a ser inferior al 10% de recuperación (Castro *et al.*, 1999); resultados que sugieren la necesidad de seguir investigando con el fin de incrementar la eficiencia en la recuperación final de las plantas micropropagadas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los menores niveles de contaminación de

explantes de roble transferidos a condiciones *in vitro* se observaron cuando los explantes fueron tratados con una solución al 3% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos y luego enjuagados con agua destilada estéril.

- Las mayores tasas de multiplicación de brotes se presentaron cuando los explantes fueron cultivados en medio suplementado con las concentraciones más altas de BAP por lo que se recomienda evaluar dosis mayores de este regulador.
- La presencia de ANA en el medio de cultivo es necesaria para aumentar el porcentaje de enraizamiento mientras que el mayor número de raíces por explante se observó cuando los brotes fueron enraizados en presencia de 5.37 μM de ANA.
- El bajo porcentaje de recuperación *ex vitro* de las plantas micropropagadas hace necesario continuar investigando para aumentar la eficiencia en la adaptación de a las condiciones ambientales normales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean expresar sus agradecimientos a la Oficina de Investigación y Extensión de la Universidad de Córdoba por el soporte económico; el apoyo técnico de Irma Quintero, M.Sc., Carmen Polo Tordecilla e Ivan Javier Pastrana Vargas es altamente apreciado.

BIBLIOGRAFIA

- Ahuja, M. 1992. Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 536p.
- Abdelnour, E. y Muñoz, A. 1997. Micropropagación de especies forestales. X Congreso Forestal Nacional de Especies Forestales, San José de Costa Rica

- Amutha, S.; Muruganantham, M. y Ganapathi, A. 2006. Thidiazuron-induced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) wilczek. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 42(1):26-30
- Avila, M. 2004. Eficiencia del hipoclorito de sodio como desinfectante superficial en segmentos nodales de roble (*Tabebuia rosea*), cedro (*Cedrela odorata*) y abarco (*Cariniana pyriformis*) a nivel in vitro. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Córdoba, Montería
- Biroscikova, M.; Spisakova, K.; Liptak, S.; Pichler, V. y Durkovic, J. 2004. Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds). Plant Cell reports 22(9):640-644
- Bunn, E.; Senaratna, T.; Sivasithamparam, K. y Dixon, K. 2005. In vitro propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill, a critically endangered relict from Western Australia. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 41(6):812-815
- Carrizosa, M.; Ramírez, C.; Guerrero, E.; Santamaría, L. y Hodson, E. 1994. Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. Memorias III Congreso de Especies Forestales, Bogotá, Universidad Javeriana, p547-559
- Castro, D.; Díaz, G. y Linero, J. 2002. Propagación clonal in vitro de árboles élites de teca (*Tectona grandis* L.). Revista Colombiana de Biotecnología 4(1):49-53
- Castro, D.; Díaz, J. y Murillo, M. 1999. Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal in vitro de árboles adultos de Teca (*Tectona grandis*), Melina (*Gmelina arborea*) y Roble (*Tabebuia rosea*). Universidad Católica de Oriente, Rionegro, p16-51
- Chalupa, V. 2002. In vitro propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. Journal of Forest Science 48:529-535
- Colorado, A. 2003. Roble. Especie que reúne la fuerza y belleza del bosque. Revista M & M - El Mueble y la Madera 41:13-19
- CONABIO (Comisión Nacional Para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad). 2005. *Tabebuia rosea*. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/11-bigno7m.pdf#search=%22Tabebuia%20rosea%22. México, D.F. [Accedido: 08-25-2006]
- Daquinta, M.; Ramos, L.; Capote, I.; Lezcano, Y.; Rodríguez, R.; Trina, D. y Escalona, M. 2001. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.). Revista Forestal Centroamericana 35:23-28
- DNP (Departamento Nacional de Planeación). 2003. Documento CONPES 3237. Política de Estimulo a la Reforestación Comercial en Colombia: 2003-2006. Departamento Nacional de Planeación, Bogotá, 20p.
- Gamboa, J. y Aldenour, A. 1999. Micropropagación de Melina (*Gmelina arborea* ROXB). Agronomía Costarricense 23:69-76

- Iriondo, J.; De La Iglesia, M. y Pérez, C. 1995. Micropropagation of *Eleagnus angustifolia* from mature trees. *Tree Physiology* 15(10):691-693
- Kane, M. 1996. Micropropagation from pre-existing meristems, En: Gray D y Trigiano R (Ed.) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Ratón, p75-86
- Lara, A.; Valverde, R.; Gómez, L. y Hidalgo A. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata* L. *Agronomía Costaricense* 27:7-20
- Leifert, C. y Cassells, A. 2001. Microbial hazards in plant tissues and cell culture. In *Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 367:133-138
- Murillo, O. 2004. Calidad y valoración de plantaciones forestales. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, p7-9
- Nadgauda, R. 1999. Application of tissue culture in clonal forestry programme. *Proceedings International Tree Biotechnology Meeting, India*, p4-8
- Ndoye, M.; Diallo, I. y Gassama/Dia, Y. 2003. In vitro multiplication of the semi-arid forest tree *Balanites aegyptiaca* L. *African Journal of Biotechnology* 2(11):421-424
- Pruski, K.; Astatkie, T. y Nowak J. 2005. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nankin cherry (*Prunus tormentosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82(2):207-211
- Ramírez, O. y Gómez, M. 1999. Estimación y valoración económica del almacenamiento de carbono. *Revista Forestal Centroamericana* 27:8-12
- Schoene, G. y Yeager, T. 2005. Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83(3):271-277
- Suárez, I.; Schnell, R.; Kuhn, D. y Litz, R. 2005. Micrografting of ASBVd-infected avocado (*Persea americana*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80:179-185
- Sudha, C.; Krishnan, P.; Pushpangadan, P. y Seeni, S. 2005. In vitro propagation of *Decalepis arayalpathra*, a critically endangered ethnomedicinal plant. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41(5):648-654
- Tiwari, S.; Tiwari, K. y Siril, E. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:1-6
- USDA-GRIN. 2006. ARS, National Genetic Resources Program, Germplasm Resources Information Network. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?105257>. [Accedido:10-04-2006]
- Viloria, Z. 1993. Cultivo in vitro de nudos de guayaba (*Psidium guajaba* L.). Universidad del Zulia, Maracaibo, 35p.