

PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Acacia mangium* Willd

IN VITRO PROPAGATION OF *Acacia mangium* Willd

PROPAGAÇÃO IN VITRO DE *Acacia mangium* Willd

LUZ ANGELA TORRES¹, ISIDRO ELIAS SUAREZ², KELLEN GATTI³

RESUMEN

Acacia (*Acacia mangium* Willd) es una de las especies forestales más plantadas por la calidad de su madera y rápido crecimiento; sin embargo, los estudios de propagación clonal son pocos. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de micropropagación a partir de explantes con meristemas preexistentes. Los explantes consistieron de brotes de plantas de tres meses de edad mantenidas en invernadero. La desinfección se realizó con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y antibióticos, y fueron establecidos en medio MS con diferentes concentraciones (0; 0,44; 0,88 y 2,22 μM) de BAP. Los brotes micropropagados fueron enraizados con diferentes dosis de ANA y AIB, finalmente los brotes, con o sin raíces, fueron transferidos a condiciones ex vitro para evaluar el porcentaje de supervivencia. Los datos mostraron que 1,0% NaOCl y cefalexina (2 mg L⁻¹) permitieron obtener el mayor porcentaje de explantes libres de contaminación (67%). El mayor número promedio de brotes ocurrió con 2,22 μM de BAP y el mayor número promedio de raíces se observó al utilizar 2,69 μM de ANA. La adaptación de las plantas en condiciones ex vitro fue exitoso lográndose obtener un 87% de supervivencia.

ABSTRACT

Acacia (*Acacia mangium* Willd) is one of the most planted forest species because of the quality of its wood; however, and despite its importance is not easy to find

Recibido para evaluación: 25/08/2011. Aprobado para publicación: 14/12/2012.

1 Bióloga, M.Sc. Investigadora, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Córdoba – Montería.

2 Ingeniero Agrónomo, Ph.D. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba – Montería.

3 Ingeniera Forestal, M.Sc. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba – Montería.

Correspondencia: luz_torres23@hotmail.com.

juvenile plant material in adult trees to be used as a source for vegetative propagation. The present research had as objective to develop a micropropagation protocol for acacia from preexisting meristems. The explants consisted of stem section isolated from three months old plants maintained in under greenhouse condition and shoots from in vitro germinated seeds. Surface disinfection was done with different sodium hypochlorite (NaOCl) concentrations plus antibiotics. Disinfected shoots were established in semisolid MS with different BAP concentrations (0; 0,44; 0,88 and 2,22 μM). Multiplied shoots were rooted using different NAA and IBA amounts and finally shoots with, or without, roots were transferred to ex vitro conditions to evaluate field adaptation. The data showed that 1,0% NaOCl and cefalexina (2 mg L⁻¹) allowed the highest percentage of non-contaminated explants (67%). Explants cultured with 2,22 μM BAP produced the highest number of new shoots, while 2,69 μM ANA induced more roots per shoot. An 87% survival was observed.

RESUMO

Acácia (*Acacia mangium* Willd) é uma das espécies florestais mais plantadas pela qualidade de sua madeira e crescimento rápido; no entanto, os estudos de propagação clonal são poucos. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação a partir de explantes com meristemas pré-existentes. Os explantes consistiram de miniestacas de plantas de três meses de idade mantidas em casa de vegetação. A desinfecção se realizou com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e antibióticos, e foram estabelecidos em meio MS com diferentes concentrações (0; 0,44; 0,88 e 2,22 μM) de BAP. As brotações micropropagadas foram enraizadas com diferentes doses de ANA e AIB, finalmente as brotações, com ou sem raízes, foram transferidos a condições ex vitro para avaliar a percentagem de sobrevivência. Os dados mostraram que 1,0% NaOCl e cefalexina (2 mg L⁻¹) permitiram obter a maior percentagem de explantes livres de contaminação (67%). O maior número média de surtos ocorreu com 2,22 μM de BAP e o maior número média de raízes se observou ao utilizar 2,69 μM de ANA. A adaptação das plantas em condições ex vitro foi exitoso conseguindo-se obter um 87% de sobrevivência.

INTRODUCCIÓN

Acacia (*Acacia mangium* Willd - Fabaceae) es una de las especies forestales más plantadas a nivel mundial, siendo la más utilizada en la recuperación de áreas degradadas [1, 2]. En Colombia fue introducida como una especie mejoradora de suelos en alto grado de desgaste o erosión, siendo adicionalmente apreciada por su rápido crecimiento y por producir una madera exótica con gran potencial para la industria del mueble y la madera. Actualmente, está jugando un rol cada vez más importante en los esfuerzos por sostener el abastecimiento comercial de los productos forestales y al mismo tiempo reducir la presión en los ecosistemas de bosques naturales [3, 4].

PALABRAS CLAVE:

Micropropagación,
Benzilaminopurina, Meristemas pre
existentes, Forestal.

KEYWORDS:

Micropropagation,
Benzilaminopurine, Preexisting
meristems, Forest tree.

PALAVRAS CHAVE:

Antibióticos, Citocinina,
Meristemas pré-existentes.

La propagación asexual de acacia ha sido estudiada; sin embargo, persisten aún muchas dificultades, lo cual representa un limitante para la implementación de una silvicultura de precisión en el cultivo de esta especie. La brotación de árboles decapitados, incluso en estados juveniles, es difícil y no es frecuente encontrar en la naturaleza estados juveniles en árboles adultos como fuente de material para propagación vegetativa para el establecimiento de clones, la micropropagación ha sido utilizada como un mecanismo para multiplicar masivamente clones de especies forestales de alto valor económico, [5]. El Departamento de Córdoba tiene un alto potencial para el cultivo de especies forestales; sin embargo, para aumentar la eficiencia de estas producciones es necesario desarrollar tecnologías que permitan una mayor productividad, como es la producción asexual a gran escala de material de siembra para el establecimiento de plantaciones clonales. En el presente trabajo se reporta el desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* de acacia a partir de meristemos pre existentes, con el fin de producir plantas asexuales para evaluar sistemas clonales de producción.

MÉTODO

Material vegetal y establecimiento *in vitro*

Secciones de tallo fueron aislados de plantas de acacia propagadas a partir de semillas de las familias 21089, 21079 y 21102) de aproximadamente tres meses de edad mantenidas en casamalla con una polisombra de 50% de penetración de luz y tres riegos diarios. Explantes de aproximadamente 2 cm de longitud conteniendo meristemos pre-existentes fueron lavados con detergente, sumergidos en una solución de benomil (2 g L^{-1}) y desinfectados superficialmente con una solución de NaOCl a diferentes concentraciones (0,5; 1,0 y 1,5%) y Tween 20® ($5 \mu\text{l l}^{-1}$) durante siete minutos y enjuagados con agua destilada estéril. Debido a la aparición de contaminaciones en explantes presumiblemente desinfectados, fue necesario evaluar el efecto de la inmersión durante 10 minutos en diferentes soluciones de antibióticos (Cefalexina, Amoxicilina y Ambramicina) a una concentración de 2 mg mL^{-1} , como complemento. Finalmente, los explantes fueron establecidos en medio semisólido MS [6] suplido con (en mg L^{-1}) sacarosa (30,000), myo-inositol (100), Tiamina-HCl (0,1) y Agar-Agar (7,000) en ausencia de reguladores de crecimiento.

Multiplicación *in vitro*

Explantes establecidos *in vitro* fueron transferidos a un medio de cultivo similar al de la etapa de establecimiento pero adicionado con cuatro concentraciones (0; 0,44; 0,88 y $2,22 \mu\text{M}$) de BAP; evaluaciones preliminares anteriores demostraron que dosis superiores a las utilizadas tuvieron efectos negativos en la morfología de los brotes producidos (Datos no mostrados). Cada brote fue establecido en recipientes de vidrio de 125 cc de capacidad conteniendo aproximadamente 30 mL de medio de cultivo. Los cultivos fueron cubiertos con una capa de papel aluminio, sellados con Parafilm® y almacenados a una temperatura de 25°C con una radiación fotosintéticamente activa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por un período de 12 horas diarias suministrada con lámparas de luz blanca fluorescente. Los tratamientos fueron repetidos 15 veces cada uno y distribuidos utilizando un diseño completamente al azar. Cuatro semanas después del establecimiento se registraron los datos de las variables número de nuevos brotes por explante, número de nudos y número de hojas producidas por explante.

Enraizamiento *in vitro* y aclimatación *ex vitro*

Tallos de aproximadamente 3,0 cm de longitud multiplicados *in vitro* fueron utilizados para evaluar el efecto de diferentes concentraciones (0; 2,69; 5,37 y $10,74 \mu\text{M}$) de dos tipos de auxinas: (Acido Naftalenacético - ANA y Acido Indolbutírico - AIB) bajo condiciones similares a las indicadas para el estado de multiplicación; ocho semanas después del establecimiento se registraron los datos de las variables número de raíces por tallo, longitud de raíces producidas por tallo y se calculó el porcentaje de enraizamiento. Luego las plantas enraizadas *in vitro*, y brotes micropropagados sin raíces, fueron transferidos a condiciones *ex vitro* en bandejas de 24 alveolos con cubierta plástica transparente con dos tipos de sustrato (turba y arena). Las plantas, un total de 200 por cada tratamiento, fueron ubicadas en una casa malla con 50% de luminosidad y tres riegos diarios durante las primeras dos semanas; posteriormente, las cubiertas fueron removidas y los riegos fueron aplicados una vez al día. Al mes del trasplante se evaluó el número de plantas sobrevivientes para cada tratamiento.

Condiciones experimentales

El pH de todos los medios fue ajustado a $5,7 \pm 0,1$, previo a la adición del agar y posteriormente esterili-

zado en un autoclave a 120 °C y 1,2 PSI. Cada tratamiento de los diferentes experimentos fue repetido 15 veces, donde cada repetición fue considerada como una unidad experimental. Los datos obtenidos se analizaron con un análisis de varianza y, cuando existieron diferencias significativas, las medias fueron separadas con la prueba de separación de Duncan ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

Establecimiento in vitro

El menor porcentaje de contaminación se observó cuando los explantes fueron desinfectados con la solución al 1,5% de NaOCl (13%), mientras que aquellos tratados con la solución al 0,5% NaOCl sufrieron un 100% de contaminación; no obstante los resultados, la solución al 1,5% de NaOCl provocó la muerte de todos los explantes muy probablemente debido a la fitotoxicidad causada por la alta concentración del ión hipoclorito. Al utilizar la dosis de 1.0% de NaOCl se obtuvo un 67% de explantes libres de contaminación, los cuales sobrevivieron en su totalidad (Figura 1A).

Estudios anteriores reportan resultados parecidos: Girijashankar [7] desinfectó superficialmente segmentos

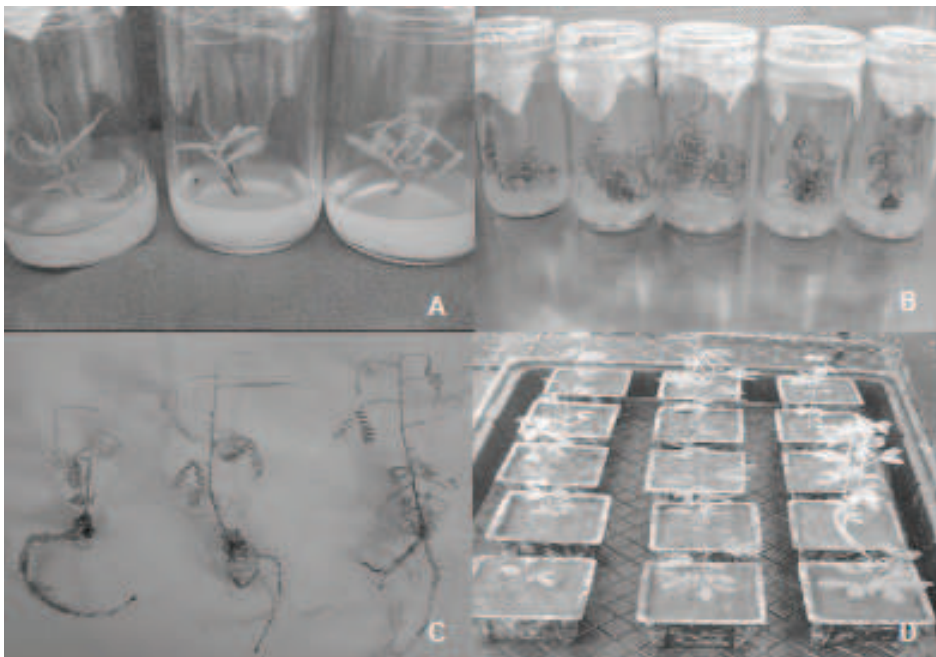
nodales de *Acacia auriculiformis* con 1,0% de NaOCl por 15 minutos obteniendo un 60,5% de los explantes libres de contaminación; Abbas *et al.* [8] utilizaron NaOCl al 1,0% por 20 minutos, logrando un 76% de explantes de *Acacia nilotica* Willd sobrevivientes sin contaminación y Correia *et al.* [9] reportaron que NaOCl al 1,0% por 15 minutos permitió obtener el 80% de explantes de *Acacia meamsii* libre de patógenos. A pesar de los buenos resultados iniciales, la desinfección con hipoclorito mostró ser insuficiente, al observarse que aproximadamente una semana después los explantes mostraron contaminación muy probablemente de tipo bacterial por su consistencia. Al evaluarse el efecto de tres antibióticos (cefalexina, amoxicilina y ambramicina) posterior a la desinfección con NaOCl, se pudo observar que solo la cefalexina permitió obtener explantes libres de contaminación (73,33%), mientras que en los explantes tratados con los otros antibióticos, la contaminación persistió en su totalidad.

Multiplicación in vitro

El desarrollo de nuevos brotes a partir de los meristemos pre-existentes presentes en los explantes establecidos in vitro se observó a partir de la cuarta semana después del establecimiento en la mayoría de los tratamientos evaluados. Inicialmente, los nuevos brotes

Figura 1. Proceso de propagación in vitro de *Acacia mangium*

A) Establecimiento in vitro. **B)** Multiplicación de brotes. **C)** Enraizamiento in vitro. **D)** Aclimatación a condiciones ex vitro.



presentaron hojas con forma simple que al transcurrir las semanas fueron remplazadas por hojas compuestas (Figura 1B). El análisis de varianza demostró que existieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) con relación al efecto de las diferentes concentraciones de BAP sobre la formación de nuevos brotes, nudos y hojas (Cuadro 1). Los resultados mostraron que los explantes cultivados en presencia de $2,22 \mu\text{M}$ de BAP produjeron el mayor número promedio de brotes, nudos y hojas por explante, mientras que aquellos cultivados en ausencia del regulador de crecimiento tuvieron la menor brotación. Estos resultados demuestran que la aplicación de citocininas, en este caso BAP, en el medio es necesaria para incrementar significativamente la multiplicación de brotes a partir de explantes con meristemas pre-existentes en condiciones in vitro.

BAP es un regulador de crecimiento muy utilizado para inducir la brotación de yemas axilares en especies forestales debido a su efectividad, costos y facilidad de manejo [10, 11]. Previamente, diversas investigaciones han reportado los resultados convenientes del uso de BAP y otras citocininas en la multiplicación in vitro de especies forestales. Saito *et al.*, [12] en un estudio de micropropagación de *Acacia mangium*, encontraron que la adición de $10 \mu\text{M}$ de BAP en el medio indujo el mayor promedio de formación de nuevos brotes (2,3 por explante). Darus [13] reportó que la presencia de $2,22 \mu\text{M}$ de BAP indujo una tasa de multiplicación de 1,9 nuevos brotes por cada explante. Nanda *et al.*, [15] reportaron que BAP en una concentración de $4,44 \mu\text{M}$ indujo 2,4 nuevos brotes por explante de *Acacia mangium* Willd. Todos estos trabajos anteriormente descritos, reportan tasas de multiplicación inferiores a las observadas en el presente trabajo.

Enraizamiento

El inicio de la emisión de raíces adventicias a partir de la base de los explantes se observó aproximadamen-

te a las ocho semanas después del establecimiento de los brotes micropropagados en el medio de enraizamiento. En los explantes enraizados de todos los tratamientos en evaluación se pudo observar que la raíces provenían directamente del explante, sin notarse la formación de tejido de callo, y con una morfología aparentemente normal (Figura 1C). El mayor porcentaje de enraizamiento (71%) fue observado cuando los tallos fueron cultivados en presencia de $2,69 \mu\text{M}$ de ANA, mientras que aquellos cultivados en ausencia de ANA o AIB presentaron el menor porcentaje (8%). La adición de ANA en el medio de cultivo permitió en todos los casos que $>50\%$ de los explantes produjeran raíces, mientras que aquellos cultivados en presencia de AIB no superaron el 35% de enraizamiento en ninguno de los casos. Para ambos reguladores de crecimiento se observó que el tratamiento con la dosis mas alta ($10,74 \mu\text{M}$) causó una disminución en el porcentaje d enraizamiento con respecto a las dosis menores (Cuadro 2)

El análisis de varianza aplicado permitió demostrar que existieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) debido al efecto del suministro de ANA en el medio sobre las variables número de raíces por tallo y longitud promedio de raíz. Contrariamente, el mismo análisis determinó que la adición de AIB no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento de las misma variables ($P > 0,05$) (Cuadro 2).

El efecto de las auxinas en la iniciación y crecimiento de raíces adventicias en condiciones in vitro ha sido ampliamente estudiado, y su aplicación en la fase de enraizamiento es de probada conveniencia, aunque existen especies que producen un buen sistema radicular en ausencia de estas o no necesitan de la producción de raíces in vitro para lograr una buena adaptación a las condiciones ex vitro [16]. Con relación al enraizamiento in vitro de *Acacia mangium*, Monteuiis

Cuadro 1. Efecto de diferentes concentraciones de BAP sobre la formación de brotes, nudos y hojas en explantes con meristemas pre existentes de *Acacia mangium* Willd

| BAP (μM) | Variables | | |
|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------|
| | Número de brotes por explante | Número de nudos por explante | Número de hojas |
| 0 | 0,266 C | 0,000 B | 0,000 B |
| 0,44 | 1,800 B | 0,600 B | 1,200 B |
| 0,88 | 2,266 B | 1,066 B | 2,133 B |
| 2,22 | 4,933 A | 2,200 A | 4,400 A |

Promedios con letras diferentes, presentaron diferencia significativa por el test de Duncan ($P < 0,05$).

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de ANA y AIB sobre el enraizamiento tallos micropropagados de *Acacia mangium* Willd

| Regulador de crecimiento | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| AIB/ANA (μM) | ANA | | | AIB | | |
| | Enraizamiento (%) | Número de raíces | Longitud de raíces (cm) | Enraizamiento (%) | Número de raíces | Longitud de raíces (cm) |
| 0 | 8 | 0,600 B | 1,309 B | 8 | 0,600 A | 0,873 A |
| 2,69 | 71 | 1,660 A | 3,803 B | 21 | 0,600 A | 0,838 A |
| 5,37 | 61 | 1,800 A | 3,076 B | 35 | 0,866 A | 1,560 A |
| 10,74 | 50 | 1,933 A | 4,965 A | 14 | 0,533 A | 0,220 A |

Promedios con letras diferentes, presentaron diferencia significativa por el test de Duncan ($P < 0.05$).

y Bon [17] estudiaron el efecto de diferentes concentraciones AIA y AIB sobre el enraizamiento de tallos micropropagados, observando que el AIA a $4 \mu\text{M}$ indujo el mayor porcentaje de enraizamiento (67%) y un aumento en la tasa de multiplicación. Huang *et al.*, [19] reportaron un porcentaje de enraizamiento in vitro del 72,5% de brotes micropropagados de *Acacia mearnsii* en medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con $3,22 \mu\text{M}$ de ANA. Toda *et al.*, [18] obtuvieron un 69,2% de enraizamiento en brotes de *Acacia mangium* cultivados en medio MS suplido con $10,74 \mu\text{M}$ de ANA.

Aclimatización

Cuando las plantas fueron enraizadas in vitro y posteriormente trasplantadas a condiciones ex vitro, no sobrevivieron en la fase de aclimatización en ninguno de los dos sustratos evaluados (turba y arena); sus hojas mostraron una decoloración marcada, enrollamiento y marchitez rápidamente una vez fueron establecidos ex vitro. Contrariamente, los tallos micropropagados y transferidos directamente de la fase de multiplicación, sin raíces, mostraron una mayor adaptabilidad a las condiciones ex vitro, alcanzando un 87% de supervivencia cuando fueron establecidos en el sustrato turba, y solo un 12% de los mismos sobrevivieron cuando el trasplante se hizo en arena.

Algunas de las particularidades del cultivo in vitro radica en que las condiciones ambientales dentro del recipiente garantizan un ambiente con alta humedad relativa (100%) y una nutrición heterótrofa por el suministro de fuentes energéticas (sacarosa) en el medio de cultivo. Estas condiciones propician una baja funcionalidad en la raíces producidas en condiciones in vitro, las cuales son por lo tanto poco eficientes en la toma de agua y nutrientes, tor-

nándose, en algunos casos en vías para la pérdida de agua interna una vez la planta es trasplantada a condiciones ex vitro [20, 21]. En los resultados del presente estudio, las plantas micropropagadas sin formación previa de raíces in vitro tuvieron un aceptable porcentaje de supervivencia y adaptación a las condiciones normales de campo, representado en una buena apariencia morfológica, coloración verde de las hojas y formación de filodios aproximadamente a las 16 semanas después de haber sido trasplantadas a condiciones ex vitro (Figura 1D). La transferencia directa de tallos micropropagados del estado II (multiplicación) al estado IV (aclimatización) posibilita el ahorro de recursos (medio de cultivo, hormonas, manipulaciones, etc.) y tiempo para la producción de material vegetal a partir de la micropropagación.

CONCLUSIONES

El menor porcentaje de contaminación se obtuvo cuando los explantes fueron desinfectados superficialmente con 1,0% de hipoclorito de sodio y 2 mg mL^{-1} de cefalexina.

La presencia de $2,22 \mu\text{M}$ de BAP aumentó significativamente la tasa de multiplicación *in vitro* en explantes de acacia.

Las presencia de ANA en el medio de cultivo aumenta la formación de raíces adventicias, aunque estas no son necesarias para la adaptación de los tallos micropropagados a condiciones *ex vitro*.

La mayor supervivencia se obtuvo cuando los tallos micropropagados sin raíces fueron transferidos *ex vitro* en turba.

REFERENCIAS

- [1] GALIANA, A., BALLE, P., GUESSAN KANGA, A. and DOMENACH, A. Nitrogen fixation estimated by the N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd inoculated with Bradyrhizobium sp. and grown in silvicultural conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 34(2), 2002, p. 251-262.
- [2] TONINI, H. e VIEIRA, B. Desrama, crescimento e predisposição à podridão-do-lenho em *Acacia mangium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(7), 2006, p. 1077-1082.
- [3] PREECE, D. y BROOK, R. *Acacia mangium*: Un árbol importante para llanuras tropicales. Hoja Informativa. Una publicación de la Red de Información sobre Árboles para Bosques, Fincas y Comunidades (FACT Net) [online]. Available: www.winrock.org/forestry/factnet.htm (citado febrero 12 de 2012).
- [4] OBREGÓN, C. La *Acacia mangium* una especie promisoría. *Revista M&M* [online]. Available: <http://www.revistam.com/rev49/especies.pdf> (citado 14 marzo 2012).
- [5] CARRIZOSA, M. y SERRANO, C. Sistemas modelo para la micropropagación y conservación de especies forestales. Memorias de IV Congreso "La investigación en la Universidad Javeriana". Bogotá (Colombia): Pontificia Universidad Javeriana, 1996, p. 261-272.
- [6] MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 1962, p. 473-497.
- [7] GIRIJASHANKAR, V. Micropropagation of multipurpose medicinal tree *Acacia auriculiformis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(3), 2011, p. 462- 466.
- [8] ABBAS, H., MUHAMMAD, Q. and BEENA, N. Rapid in vitro multiplication of *Acacia nilotica* subsp. *hemispherica*, a critically endangered endemic taxon. *Pakistan Journal of Botany*, 42(6), 2010, p. 4087-4093.
- [9] CORREIA, D. and CORTEZZI, M. In vitro propagation of blackwattle (*Acacia meamsii* De Wild). National Center of Forest Research, 1995, p. 117-125.
- [10] BONGA, M. and DURZAN, D. *Tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff Publishers, 1985, p. 420.
- [11] BONGA, M. and VON ADERKAS, P. *In vitro culture of trees*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers *Forestry Sciences*, 1992, p. 38, 236.
- [12] SAITO, Y., KOJIMA, K., IDE, Y. and SASAKI, S. In vitro propagation from axillary buds of *Acacia mangium*, a legume tree in the tropics. *Plant tissue culture letters*, 10(2), 1993, p. 163-168.
- [13] DARUS, H. Micropropagation of *Acacia mangium* from aseptically germinated seedlings. *Journal of Tropical Forest Science*, 3(3), 1991, p. 204 – 208.
- [14] IMELDA, M., ERLYANDARI, F. and SUKIMAN, H. Effects of Rhizobial Inoculation on the early growth of *Acacia mangium* in the field. *Berita Biology*, 2006, p. 69-73.
- [15] NANDA, R., DAS, P. and ROUT, G. In vitro clonal propagation of *Acacia mangium* Willd and its evaluation of genetic stability through RAPD marker. *Annals of Forest Science*, 61(4), 2004, p. 381–386.
- [16] SUÁREZ, I., ESPITIA, M. y PERTUZ, I. Efecto de auxinas y citocininas en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Fitotecnia Colombiana*, 6(2), 2006, p. 1-8.
- [17] MONTEUUIS, O. and BON, M. Influence of auxins and darkness on in vitro rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 63, 2000, p.173-177.
- [18] TODA, T., TAJIMA, M. and BRINI, P. Tissue culture of *Acacia auriculiformis* and *Acacia hybrid*. *Bulletin of the National Forest Tree Breeding Center*, 13, 1995. p. 81-94.
- [19] HUANG, F., KHAYRI J. and GRUR, E. Micropropagation of *Acacia mearnsii* In vitro. *Cellular and Developmental Biology*, 30, 1994, p. 70-74.
- [20] SUÁREZ, I., JARMA, A. y ÁVILA, M. Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de Roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Revista Temas Agrarios*, 11(2), 2006, p. 52 - 62.
- [21] AHUJA, M. *Micropropagation á la carte in: Ahuja MR. Micropropagation of woody plants*. Kluwer Academic Publishers, 41, 1993, p. 1-8.