

1. INTRODUCCIÓN

Existen muy pocas investigaciones sobre propagación *in vitro* de especies forestales y de las existentes muy pocas son ahora utilizadas comercialmente. Hay varias razones por las que se hace necesario encontrar un método de propagación efectivo para estas especies. Algunas especies son importantes por su uso maderero, otras por su pulpa y otras son utilizadas como ornamentales. Además, debido a la deforestación y al impacto negativo del hombre sobre diferentes ecosistemas, hay varias especies forestales que están en peligro de extinción, algunas de alto valor económico, otras con alto valor biológico. Muy poco se ha hecho por recuperar estas especies y por proteger los ecosistemas. Para esto es necesario encontrar una técnica que nos permita propagar masivamente especies con poblaciones limitadas y al mismo tiempo que se mantenga la diversidad genética. Esto como proyección a nuevas investigaciones enfocadas a la conservación de especies forestales en peligro de extinción y hacia la protección de nuestros bosques.

La limitante que se tiene con la propagación de especies forestales es el tiempo que demoran éstas en crecer; esto implica tiempo invertido sin ganancia hasta poder cosechar. Se necesita buscar medios de propagación rápidos y a mayor escala para poder propagar especies de interés comercial, así como para disminuir la extinción de importantes especies. Al propagar especies forestales en extinción, el propósito no es simplemente clonar y plantar árboles con las mismas características genéticas, sino buscar métodos de propagación que nos permitan mantener la variabilidad genética.

Con este estudio se pretende encontrar una técnica para establecer *in vitro* la *Tabebuia guayacan*, germinando las semillas *in vitro* y utilizando los ápices meristemáticos, hipocotilos y cotiledones como fuentes de explante. Específicamente este estudio será una contribución a la posibilidad de propagar de manera eficiente la especie mencionada para aumentar sus poblaciones sin perder toda su variabilidad genética.

1.1 LÍMITES DEL ESTUDIO

Entre los límites del estudio está el poco tiempo disponible considerando que las especies forestales son especies de ciclos largos y no se logrará ver todo el ciclo de producción *in vitro*. Otra limitante es que, considerando que existen varias técnicas, múltiples tipos de explantes y diferentes tipos y niveles de hormonas que se podrían probar, debido a que el estudio se realizará en 6 meses, solo se utilizarán ápices meristemáticos, segmentos cotiledonares e hipocotiledonares y tres tipos de hormonas.

1.2 HIPÓTESIS

- Se inducirá la formación de tejido callogénico para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan* a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares procedentes de plántulas germinadas *in vitro*.
- Se inducirá la elongación de ápices meristemáticos producidos *in vitro*, para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Generales

- Inducir la formación de tejido callogénico para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan* a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares procedentes de plántulas germinadas *in vitro*.
- Inducir la elongación de ápices meristemáticos producidos *in vitro*, para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan*.

1.3.2 Específicos

- Evaluar procedimientos de desinfección de la semilla de *Tabebuia guayacan* para su posterior germinación.
- Evaluar la germinación *in vitro* de semilla genética de *T. guayacan*
- Evaluar el efecto de el tipo de explante, el tipo de hormona, el nivel de hormona y la interacción entre éstas en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan*.

1.3.2.1 Apices meristemáticos:

- Comparar el efecto de diferentes concentraciones de BAP en el establecimiento *in vitro* de *T. guayacan*.
- Evaluar el efecto de la transferencia de los ápices meristemáticos a un medio de cultivo inductivo para brotación.

1.3.2.2 Explantes cotiledonares y hipocotiledonares

- Comparar el efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) en el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *T. guayacan*.
- Evaluar el efecto del ácido indoleacético (AIA) y BAP en la multiplicación de tejido calloso e inducción morfogénica a partir de tejido calloso.
- Evaluar el efecto de transferir tejido calloso a un medio sin reguladores de crecimiento.
- Evaluar el efecto de cultivar tejido calloso bajo condiciones de luz y oscuridad.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Principales características de la *Tabebuia guayacan*

Su nombre científico es *Tabebuia guayacan* o *Tecoma guayacan*, su nombre común es cortés ó guayacan. Pertenece a la familia de las Bignoniaceae y su hábitat son los bosques húmedos y muy húmedos subtropicales y en zonas abiertas de bosques secos. Se encuentra a una altura de 1200 m o menos. Su distribución natural va desde México hasta Panamá resaltando el Petèn, Verapaz, Izabal, Veracruz, Chiapas. En Honduras se le encuentra en los departamentos de Colón, Olancho, Cortés, Gracias a Dios y Comayagua. En América del Sur se encuentra en Venezuela, Colombia y Ecuador (Benítez,1988).

Es un árbol grande, alcanza los 40 m de alto y diámetros de 60 cm o más. Presenta pequeñas gambas en la base, el fuste es recto y cilíndrico, la corteza es color café grisáceo, acanalada y con fisuras verticales. La copa es reducida y rala. Las hojas son opuestas y digitadas, con peciolos delgados. La inflorescencia es llamativa con flores amarillas, campanuladas en grupos terminales. Los frutos son cápsulas alargadas, cilíndricas hasta de 50 cm de largo (Benítez,1988).

El duramen de la madera del guayacan es de color verdoso y la albura es castaño amarillento y tiene un hilo entrecruzado. Su textura es mediana a fina, un brillo bajo y tiene un veteado suave. Se caracteriza por tener una frecuencia muy escasa (0.4 m³/ha). Es una madera extremadamente pesada y muy resistente al ataque de insectos y ataque de hongos. Debido a su dureza es moderadamente difícil de trabajar. Es utilizada para construcciones marinas, estructuras de embarcaciones, pisos, parquet, mangos para herramientas, implementos agrícolas, muebles finos y rústicos, tornería, puertas, ventanas, instrumentos científicos de precisión y muy utilizada como un árbol ornamental en jardines y áreas publicas (Standley,1970).

2.2 Micropropagación en especies forestales

Debido a una gran variedad de propiedades intrínsecas a su biología, las plantas leñosas y los árboles forestales en particular, han sido un reto en la propagación *in vitro* comparadas a especies agronómicas y otras especies herbáceas. A pesar de que se han realizado pocas investigaciones en cultivo de tejidos para especies forestales y que se encuentra poca evidencia de especies que se estén propagando comercialmente, existen varias investigaciones que han tenido éxito (Trigiano, 1996).

La propagación *in vitro* de especies forestales es generalmente difícil. Los explantes provenientes de árboles maduros son generalmente complicados de propagar y diferenciar *in vitro*. El material de tejido juvenil es morfogenéticamente más viable y responde mejor a la propagación *in vitro*. En varias especies forestales el uso de tejido juvenil ha facilitado su propagación clonal, sin embargo, se ha logrado obtener resultados favorables a partir de tejido maduro en la micropropagación de algunas especies forestales (Ahuja, 1985).

En estas últimas décadas se ha considerado la idea de realizar mejoramiento genético en árboles. Para poder alcanzar ganancia genética en especies forestales sería necesario criar árboles por algunas generaciones y cada generación requiere entre 15 y

50 años dependiendo de la especie. Una manera de captar ganancia genética mas eficientemente es reproduciendo genotipos superiores a través de prácticas asexuales como la propagación vegetativa. La limitante que tienen los métodos convencionales de propagación vegetativa es la poca cantidad de plantas que se puede propagar en un tiempo corto. Igualmente, al propagar en gran escala, la limitante que se encuentra es la disponibilidad restringida de plantas de genotipos mejorados al plantar el material, además del espacio que se necesita para estas prácticas. Para contrarrestar estas limitantes y los problemas que trae consigo la propagación vegetativa convencional, las técnicas *in vitro* ofrecen prácticas no solo de clonación masiva de genotipos superiores durante todo el año en un espacio limitado, sino también la posibilidad de poder aplicar técnicas de mejoramiento genético en especies forestales (Ahuja, 1985).

Aproximadamente 55 especies forestales de angiospermas y gimnospermas han sido regeneradas utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. Entre éstas técnicas se destacan la callogénesis, la embriogénesis somática, la regeneración de protoplastos, el cultivo de tejidos y órganos como yemas axilares y adventicias, cotiledones y microestacas. A pesar de que la técnica de cultivo de yemas es la mas común, se considera que la embriogénesis somática es la menos cara y la más productiva. Más especies forestales podrán ser propagadas por medio de técnicas de cultivo *in vitro* una vez que se logre conocer sus características y se haga un análisis económico de la viabilidad del método (Zimmerman, 1985).

Entre las objetivos que se pueden tener para propagar especies forestales a través de la micropropagación podemos mencionar: Producir clones de árboles selectos que puedan servir para evaluación en programas de mejoramiento; reproducir en gran escala árboles genéticamente mejorados utilizados para reforestación; obtener árboles que puedan ser utilizados en plantaciones bioenergéticas y propagar masivamente especies de árboles que se puedan utilizar para jardinería y áreas públicas (George, 1996).

Durante los primeros años en el campo, se ha observado que especies de hoja ancha micropropagadas se comportan mejor y son más vigorosas que las plantas producidas por los métodos convencionales de propagación. Esto se observó en *Eucalyptus tereticornis* y *E. torrelliana* durante los tres primeros años en el campo. Así mismo, con *Betula platyphylla* micropropagada, se observó un mayor crecimiento en invernadero y una mayor producción de nódulos. En *Tectona grandis* se registró datos de una mayor altura y diámetro en plantas micropropagadas que en las plantas propagadas convencionalmente. Por el contrario, en coníferas se ha encontrado un menor o igual índice de crecimiento y vigor en el campo en plantas micropropagadas (George, 1996).

2.2.1 Vías de regeneración

Existen cuatro principales vías de regeneración en el cultivo de tejidos: alargamiento de ápices meristemáticos, producción axilar de ramas mediante el uso de puntos directos de crecimiento, iniciación adventicia de brotes mediante organogénesis directa o indirecta, y embriogénesis somática directa e indirecta (Hartmann y Kester, 1997). A continuación se detalla tres de las vías de regeneración que podrían ocurrir en esta investigación.

2.2.1.1 Uso de ápices meristemáticos. Para esta vía de regeneración se utiliza como explante una parte pequeña de la porción superior del tallo, que corresponde al ápice meristemático. El objetivo de esta vía es el elongamiento del explante para producir una planta (Gamborg, 1995). El elongamiento de la punta meristemática se da cuando el meristema apical, luego de haber sido extraído de la planta, continúa creciendo en un medio de cultivo y posteriormente enraíza. La limitante de esta vía es que se regenera una sola planta por cada explante (Hartmann y Kester, 1997).

2.2.1.2 Vías directas de regeneración

2.2.1.2.1 Organogénesis Directa. La organogénesis directa es la formación directa de brotes adventicios y raíces a partir de hojas, cotiledones, hipocotiledones, escamas de bulbos, discos de tejidos de tubérculo, raíces y otros órganos. Esta vía de regeneración puede llevar a altas tasas de multiplicación comparado al uso de ápices meristemáticos.¹ Los dos aspectos más importantes que hay que considerar para la formación de brotes adventicios son: el tipo de explante que se va a utilizar y los niveles de hormonas que se van a aplicar. En leñosas se utiliza con más frecuencia cotiledones e hipocótilos como explantes y citocininas para la formación de brotes (Hartmann y Kester, 1997).

2.2.1.2.2 Embriogénesis Somática Directa. Por medio de esta vía de regeneración se obtienen directamente embriones somáticos o tejido embrionario, a partir de explantes como: embriones cigóticos inmaduros, óvulos, tejido nucelar, microsporas, cotiledones e hipocotiledones de embriones cigóticos de semillas sin germinar. Esta formación de embriones se obtiene sin la formación de una etapa callogénica intermedia. El explante más utilizado es el embrión inmaduro, su eficiencia en la formación de embriones dependerá mucho del estadio en que se encuentre el explante (Gamborg, 1995).

2.2.1.3 Vías indirectas de regeneración

2.2.1.3.1 Callogénesis. Uno de los métodos más eficientes para poder reproducir masivamente material vegetal *in vitro* es a través de la inducción de callogénesis, a partir de la cual se puede obtener una organogénesis indirecta o una embriogénesis somática indirecta. Mediante callogénesis se genera tejido de callo a partir de un explante y eventualmente, con la ayuda de reguladores de crecimiento se estimula la formación de órganos (organogénesis indirecta) ó de embriones somáticos (embriogénesis somática indirecta).

2.2.1.3.2 Cultivo de callo. Una vez incubados los explantes *in vitro*, el callo es producido como resultado de las lesiones y en respuesta a hormonas ya sea endógenas o proporcionadas en el medio de cultivo. Un callo es una masa de células estructuralmente irregular donde varían sus rangos de diferenciación y crecimiento. Aunque exteriormente los cultivos de masas de callos pueden aparecer como masas de células uniformes, en realidad su estructura es relativamente compleja con variaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas dentro del callo (Hartmann y Kester, 1997).

El crecimiento y desarrollo del tejido calloso sigue un patrón: a) período lento de *inducción* de división celular, b) fase de *división* celular rápida que implica síntesis de ADN, ARN y proteína, c) *cesación* gradual de la división celular, d) *diferenciación* en

¹ Clase de Biotecnología. MSc. Dinie Espinal-Rueda. Zamorano.2001

células de parénquima más grandes y en células de tipo vascular. Durante su desarrollo, algunas partes del callo se mantienen meristemáticas mientras otras se esclarifican; esta esclarificación lleva a la muerte de una parte del tejido (Hartmann y Kester, 1997).

El cultivo de callo se puede usar con varios propósitos: Como vía indirecta para la regeneración *in vitro* de material vegetal; para la producción de productos secundarios de plantas y enzimas mediante el cultivo de tejidos; para la síntesis de compuestos que luego serán modificados; como material base para multiplicar masivamente cultivares de alto rendimiento. Así mismo, su capacidad de revertirse a cultivo de tejido permite la conservación de líneas resistentes a virus y hongos (**www.uni-hamburg**).

Para la regeneración de órganos a partir de callo, es necesario que el callo pase por tres etapas: La de-diferenciación que es donde se desprograma el tejido para crear células más competentes que puedan responder a un estímulo organogénico y en este caso formar el callo, la inducción morfogenética que es la etapa intermedia y la diferenciación que ocurre por lo general cuando se mueve el cultivo de callo a un medio sin reguladores de crecimiento.² En la diferenciación del tejido callogénico empieza la inducción de raíces, tallos o embriones. Antes de que se les pueda identificar como órganos o embriones propiamente, en el caso de la organogénesis se les denomina meristemoides y en el caso de la embriogénesis somática se les conoce como masas preembriónicas. El que ocurra organogénesis o embriogénesis somática depende en gran parte de la fuente del explante pero los procesos puede ser dirigidos en cierto grado mediante la manipulación de los medios de cultivo. Para cualquier especie o cultivar es necesario hacer experimentos con el fin de conocer el mejor tipo de explante y la mejor formulación nutritiva (Hartmann y Kester, 1997).

2.2.1.3.3 Organogénesis Indirecta. Es la iniciación de tallos y raíces adventicias dentro de masas de células de callo. Estos callos contienen células muy vacuoladas y por lo general parenquimatosas que pueden desarrollar meristemoides, mismos que eventualmente darán inicio a órganos (Hartmann y Kester, 1997).

Los brotes adventicios y raíces que se generan a partir de la organogénesis indirecta se pueden obtener por dos vías: directamente en el callo primario originado del explante y en el callo donde se ha inducido una capacidad de morfogénesis pero que no muestra presencia de órganos hasta que es transferido a otro medio de cultivo y/o bajo otras condiciones de cultivo (Gamborg, 1995).

2.2.1.3.3 Embriogénesis Indirecta. Se refiere a la formación de embriones somáticos o embrioides a partir de masas de células (Hartmann y Kester, 1997). En la práctica los explantes utilizados para inducir callo embriónico son generalmente extraídos de órganos como óvulos zigóticos, embriones o partes de plántulas tiernas en donde la determinación embriónica todavía persiste (Gamborg, 1995).

2.3 Investigaciones realizadas en especies forestales

La mayoría de las prácticas de cultivo de tejidos pueden ser utilizadas en varias especies de cultivos anuales, ornamentales o forestales. Es importante conocer el comportamiento y resultados obtenidos en otras especies para probar en nuevas

² Clase de Biotecnología. MSc. Dinie Espinal-Rueda. Zamorano.2001

especies. Hay que tomar en cuenta que no todos los explantes de la misma planta poseen el mismo potencial de regeneración. Por esto es necesario identificar la mejor región de la planta o de la parte de la planta para regenerar el cultivo *in vitro*. El genotipo de la planta es uno de los factores más importantes en determinar que tan competente es el explante para la regeneración de órganos. Normalmente hay uno o más genotipos dentro de una especie que responden rápidamente a protocolos de regeneración *in vitro* mientras que otros no presentan respuesta alguna (Trigiano, 2000).

Se conoce que existe una influencia de la obscuridad en la regeneración de brotes provenientes de cotiledones, hojas y peciolos. No se conoce con exactitud su rol en estos procesos, pero se cree que la obscuridad preserva los reguladores de crecimiento endógenos que son sensibles a la luz y reduce la cantidad de almidón y compuestos polifenólicos oxidativos. Además, los tejidos incubados bajo obscuridad tienen menor cantidad de depósitos de pared celular, paredes más pequeñas, y menos tejido vascular. La reducción del grosor y de la cantidad de depósitos de pared celular pueden promover la regeneración de órganos facilitando el movimiento de reguladores de crecimiento exógenos hacia los puntos de regeneración (Trigiano, 2000)

2.3.1 Coníferas

2.3.1.1 Embriogénesis Somática. Por medio de la técnica de embriogénesis somática se han realizado investigaciones en pino (*Pinus* spp) principalmente. En Nueva Zelanda árboles de *Pinus radiata* han sido propagados en pequeña escala por medio de embriogénesis somática (Zimmerman, 1985).

2.3.1.2 Organogénesis Directa. En el caso de *Pinus sylvestris* se logró regenerar vitroplantas por medio de cultivo de tejidos. Después de germinada la semilla y de cultivados cuatro semanas los cotiledones e hipocotiledones en un medio MS modificado, directamente de los explantes, se formaron los brotes adventicios los cuales posteriormente fueron multiplicados con intervalos de uno o dos meses (Huang, 1985).

Las especies *Cedrus libani* y *Cedrus atlantica*, especies originarias de Líbano, maderables y ornamentales en peligro de extinción han sido micropropagadas con éxito a través de explantes hipocotiledonares, cotiledonares y plúmulas. Los explantes se extrajeron de plántulas de 15 días de edad, las cuales fueron germinadas *in vitro* en vermiculita con solución Knop. Se sembró los explantes en un medio MS sólido con 9 $\mu\text{M/l}$ de BA y 0.5 $\mu\text{M/l}$ de ANA. La inducción de las yemas adventicias ocurrió directamente a partir de los explantes a los dos meses de inoculados los explantes (Piola, 1996).

2.3.1.3 Organogénesis Indirecta. Investigaciones de organogénesis indirecta para la propagación de pino (*Pinus eldarica*) obtuvieron resultados positivos a partir de explantes hipocotiledonares y cotiledonares. Se indujo callogénesis utilizando ácido naftaleneacético (ANA) o ácido indoleacético (AIA) con benzyladenina (BA) a concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/l respectivamente. En ésta investigación se estudió el efecto de utilizar cantidades menores a las óptimas de los reguladores de crecimiento y se observó que se desarrolló una mayor formación de callo y una menor cantidad de

brotos. Eventualmente al mover el callo a un medio libre de hormonas se estimuló la aparición de brotes adventicios a partir del tejido calloso (Herrera, 1985).

Para propagar masivamente *in vitro* otra especie de pino, *Pinus strobus*, se utilizó la diferenciación de vitroplantas a partir de callo. Para la formación del callo se utilizó segmentos de yemas extraídas de árboles maduros. Las yemas fueron extraídas de árboles de 15 años, desinfectadas, lavadas, cortadas en segmentos de 5 mm y sembradas en un medio MS con 0.2 mg/l de ANA y 2 mg/l de BA. El callo que se produjo se pudo subcultivar varias veces. La cantidad de subcultivos del callo dependió de la edad de la yema de donde se inició el callo (Karan, 1985).

2.3.2 Especies de hoja ancha

2.3.2.1 Embriogénesis Somática Indirecta. Con la especie *Santalum album* (sandalwood) se pudo regenerar plantas por medio de embriogénesis somática. Se formó suspensiones celulares provenientes de tejido calloso originado a partir de segmentos cultivados de yemas obtenidas de árboles de 20 años de edad. Las suspensiones produjeron embrioides cuando fueron plaqueadas en un medio con 2 mg/l de BA (Ozias-Akins, 1985).

El Alcornoque (*Quercus suber*) es una especie que tiene un papel ecológico y forestal muy importante en Europa y es utilizado para la producción de corcho. Esta especie presenta problemas de propagación vegetativa y por semilla. En España se logró inducir embriones somáticos indirectamente a partir de callo originado de embriones inmaduros, porciones de endospermo y óvulos no desarrollados. Se cultivaron en un medio MS con 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/l de 2,4-D, obteniendo un mayor porcentaje de cultivos embriogénicos con las dos concentraciones menores (Bueno y Manzanera 1992).

Un ejemplo de embriogénesis somática a partir de semilla es el Alamo (*Liriodendron tulipifera*). En esta investigación se obtuvo semilla inmadura y se puso a germinar *in vitro*. A las cuatro semanas se indujo la formación de callo utilizando 2,4-D; luego de 6 semanas se formó una masa poliembriónica (PEM). A ésta masa poliembriónica se le disminuyó o eliminó la concentración de auxina lo que produjo la formación de los embriones somáticos (Trigiano, 1996).

2.3.2.2 Organogénesis Indirecta. Se ha logrado propagar *in vitro* *Dalbergia latifolia* por medio de la inducción y regeneración de brotes adventicios a partir de callo obtenido de yemas y segmentos de hojas cultivadas en un medio MS con auxinas y citocininas. Se observó un callo verde y compacto que desarrolló brotes en un medio con 1 mg/l de ANA y 3 mg/l de BA. Posteriormente, con un aumento en la concentración de BA y una disminución de ANA en el medio se desarrollaron entre 10 y 12 brotes nuevos (Sankara, 1985).

En investigaciones realizadas en Chile se probó la propagación *in vitro* de *Drimys winteri*, una especie representativa del bosque siempre verde del sur de Chile. En este estudio se indujo la formación de brotes adventicios a partir de callo obtenido de segmentos de yemas jóvenes de la base de arboles de invernadero de tres años de edad. Se formó callo a los 21 días en un medio con dos fitohormonas, kinetina (Kin) y ANA, a razón de 0.1 mg/l y 1.0 mg/l respectivamente. La diferenciación del callo permitió

observar pequeños meristemoides prominentes verdes y rojos ya sea agrupados o individuales. El color rojo se debe a la síntesis de antocianinas. Luego de dos meses en cultivo se pudo observar los brotes adventicios (Jordan y Cortés, 1981).

2.3.2.3 Organogénesis a través de puntos directos de crecimiento. La dificultad de propagar la especie *Populus tremula* (alamo) por estacas ha hecho imposible clonar buenos ejemplares. Por esto se probó clonar por medio de la propagación *in vitro*, a través del rejuvenecimiento de brotes de raíz y por medio de cultivo de tejidos. Los explantes de brotes de raíz son relativamente fáciles de manipular y ofrecen fiabilidad en la clonación. Para esta investigación se extrajo segmentos nodales y yemas apicales de los brotes de raíz como explantes y se obtuvo resultados positivos en el rebrote de yemas utilizando el medio WPM (Woody Plant Medium) con BAP y ANA como reguladores de crecimiento (Bueno,1992).

Así mismo se pudo regenerar *Quercus suber* utilizando como material inicial porciones apicales y nodales de plántulas de tres meses de edad. Los explantes fueron incubados en cuatro diferentes formulaciones de macronutrientes (Heller, MS, Sommer, Durzan), todos con micronutrientes de MS y los reguladores de crecimiento ANA y BA. A los siete días de ser sembrados los explantes comenzaron a desarrollar sus yemas. No se encontraron diferencias significativas en la brotación y alargamiento entre las diferentes formulaciones de medio (Manzanera, 1990).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación de los experimentos

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de Zamorano, Honduras entre Marzo y Agosto del 2001. Se realizaron cinco experimentos para intentar propagar *Tabebuia guayacan* *in vitro*. Los experimentos se detallan a continuación.

3.2 Material Vegetal

Se utilizó ápices meristemáticos, explantes cotiledonares e hipocotiledonares procedentes de plántulas de *Tabebuia guayacan* de 4 semanas de germinadas *in vitro*. La semilla de *T. guayacan* se consiguió en el banco de semillas de ESNACIFOR. La procedencia de la semilla es Comayagua, Honduras y su porcentaje de germinación era de 71%.

3.3 Germinación *in vitro* de la semilla de *Tabebuia guayacan*

Se realizó pruebas de desinfección de la semilla y se sembró la semilla de *Tabebuia guayacan* *in vitro* para posteriormente extraer los explantes de las vitroplántulas.

3.3.1 Elaboración del medio para germinar la semilla

Para la germinación de la semilla se utilizó el medio Knop modificado (Cuadro 1). Para su propagación se colocó 500 ml de agua bidestilada en un beaker con capacidad de 2000 ml. Se mantuvo en agitación constante mientras se agregaron las soluciones madre correspondientes de macroelementos, microelementos, hierro (FeNaEDTA), compuestos orgánicos, así como la sacarosa. A continuación se aforó con la ayuda de un balón aforado; se colocó nuevamente en el beaker y se midió el pH nivelando el mismo a 5.8.

Seguidamente se agregó el Phytigel al medio, a razón de 3 g/l de medio. Una vez agregado el phytigel, el medio se calentó en un horno microondas durante 10 minutos aproximadamente para poder disolverlo. Durante este proceso de disolución del phytigel se sacó el medio del microondas cada 4 minutos aproximadamente y se colocó en un agitador automático para ayudar a disolver el agente gelatinizante y evitar un sobrecalentamiento del medio. Finalmente se dispensó el medio en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, a razón de 10 ml por contenedor. Los contenedores, previamente identificados, se taparon y colocaron en un autoclave durante 20 minutos a 121°C de temperatura y 15 PSI de presión para proceder a la esterilización.

Cuadro 1. Medio Knop modificado utilizado para la germinación *in vitro* de semilla de *Tabebuia guayacan*. Zamorano, Honduras, 2001.

Macronutrientes	Concentración final en el medio (mg/l)		
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1000.00		
MgSO ₄ .7H ₂ O	250.00		
KNO ₃	250.00		
KH ₂ PO ₄	250.00		
Micronutrientes	Concentración final en el medio (mg/l)	Solución madre 1000X (mg/l)	ml/l de medio
MnSO ₄ . H ₂ O	18.94	18940.0	
H ₃ BO ₃	10.00	10000.0	1.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.50	500.0	
Solución hierro	Concentración final en el medio (mg/l)	Solución madre 200X (mg/l)	ml/l de medio
FeNaEDTA	50.00	1000.00	5.0
Vitaminas	Concentración final en el medio (mg/l)	Dilución	ml/l de medio
Tiamina	1.00	1:1	1.00
Otros	Concentración final en el medio (mg/l)		
Inositol	100.00		
Sucrosa	10,000.00		
Phytigel	3,000.00		
pH= 5.8			

Fuente: Citado en George *et al.*, 1996.

3.3.2 Lavado y pruebas de desinfección de la semilla

Previo a la desinfección de la semilla con hipoclorito de calcio (Ca(OCl)₂), ésta se lavó con agua corriente durante 15 minutos. Luego se colocó en un beaker de 600 ml, se tapó con una gasa y se colocó directamente bajo el chorro de agua de la llave para poder permitir un lavado más eficiente de la semilla bajo presión.

Para realizar las pruebas de desinfección, tres lotes de 200 semillas cada uno, fueron enjuagados durante 30 minutos en tres concentraciones diferentes de hipoclorito de calcio: 0.35%, 0.5% y 1%. Estas concentraciones fueron escogidas en base a experimentos con semillas de otras especies leñosas. Se observó una menor contaminación y una mejor germinación a una concentración de 0.5%.

Después de los tratamientos con hipoclorito de calcio y a nivel de la cámara de flujo laminar las semillas fueron enjuagadas 5 veces con agua bidestilada esterilizada para eliminar por completo los residuos de el hipoclorito de calcio.

3.3.3 Siembra y germinación *in vitro* de la semilla:

Luego de los enjuagues con agua bidestilada esterilizada, la semilla se colocó en un plato de Petri con papel filtro esterilizado para que se eliminara el exceso de agua. Se sembró una semilla por tubo de ensayo. Se colocó parafilm para sellar los tubos y evitar contaminación. Finalmente se marcaron los tubos y se colocaron en el cuarto de crecimiento a 24 °C, con un fotoperíodo de 14-16 horas y 100 pies candelas de intensidad de luz.

3.4 Experimento 1. Efecto del BAP en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia guayacan*.

3.4.1 Introducción

A las cuatro semanas de germinadas las vitroplántulas de *Tabebuia guayacan* se extrajo 180 ápices meristemáticos y se colocó un ápice por contenedor conteniendo medio de cultivo Gamborg B5 (Cuadro 2). Los ápices se sometieron a 6 tratamientos de BAP (0, 5, 10, 15, 20 μM) con 3 repeticiones por tratamiento y 10 unidades experimentales (UE's) por repetición para un total de 180 UE's, con el objetivo de conocer a cual concentración de BAP se elongaban más los ápices y si había alguna otra respuesta. En el Cuadro 3 se muestran los tratamientos que se llevarán a cabo para el experimento 1. y sus respectivas concentraciones de bencilaminopurina (BAP)

Cuadro 2. Medio Gamborg et al. (1976) B5 utilizado en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia guayacan*. Zamorano, Honduras, 2001.

Macronutrientes	Concentración final en el medio (mg/l)		
(NH ₄) ₂ SO ₄	134.00		
KNO ₃	2500.00		
CaCl ₂ . 2H ₂ O	150.00		
MgSO ₄ . 7H ₂ O	250.00		
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150.00		
Micronutrientes	Concentración final en el medio (mg/l)	Solución madre 1000X (mg/l)	ml/l de medio
MnSO ₄ . H ₂ O	10.00	10000.00	
ZnSO ₄ . H ₂ O	2.00	2000.00	
H ₃ BO ₃	3.00	3000.00	
KI	0.75	750.00	1.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	250.00	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	25.00	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	25.00	
Solución hierro	Concentración final en el medio(mg/l)	Solución madre 200X (mg/l)	ml/l de medio
FeNaEDTA	50.00	1000.00	5.0
Vitaminas	Concentración final en el medio (mg/l)	Dilución	ml/l de medio
Ac. Nicotínico	1.00	1:1	1.0
Piridoxina	1.00	1:1	1.0
Tiamina	1.00	1:1	1.0
Otros	Concentración final en el medio (mg/l)		
Inositol	100.00		
Sucrosa	30,000.00		
Phytigel	3,000.00		
pH= 5.8			

Fuente: Citado en George *et al.*, 1996.

Cuadro 3. Niveles de benzylaminopurina (BAP) utilizados en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia guayacan* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

No. Tratamiento	Tipo de Explante	BAP	
		mg/ l	μM
1	APICE	0.00	0
2	APICE	1.13	5
3	APICE	2.25	10
4	APICE	3.38	15
5	APICE	4.50	20

3.4.2 Elaboración del medio de cultivo Gamborg B5

Se preparó 1800 ml de medio Gamborg B5 siguiendo el mismo procedimiento explicado en el punto 3.3.1 y utilizando los componentes para el medio B5 (Cuadro 2). Una vez aforado el medio se dividió en 6 beakers correspondientes a cada tratamiento hormonal y se continuó con el procedimiento. Finalmente se dispensó el medio de cultivo en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, a razón de 10 ml por contenedor.

3.4.3 Inoculación de los ápices meristemáticos en el medio de cultivo

Se aislaron los ápices meristemáticos de las vitroplántulas y se eliminaron las hojas verdaderas que habían empezado a salir. Se sembró los ápices en el centro de los tubos de ensayo y los contenedores se incubaron en el cuarto de crecimiento.

3.4.3.1 Toma de datos. A los 15 y 21 días de sembrados los ápices, se midió la altura de los mismos en centímetros. Esta medición se llevó a cabo con una regla por fuera de los contenedores. Así mismo, se observó si se encontraba alguna brotación o formación de callo.

3.4.4 Multiplicación e inducción de brotación a partir de los ápices meristemáticos

A las cuatro semanas de sembrados los ápices en el medio de establecimiento, se seleccionó la concentración de BAP que tenía los ápices de mayor tamaño y que indujo a una mayor brotación (10 μM). Todos los ápices fueron transferidos a la misma formulación básica de Gamborg con la adición de 10 μM de BAP. Al transferir de medio, los ápices fueron limpiados y se les eliminó todo el material necrótico existente en la base o alrededor de la base. También se eliminaron las hojas verdaderas que habían empezado a salir para promover la brotación.

3.4.4.1 Toma de Datos. Para la etapa de multiplicación de los ápices meristemáticos no se pudo tomar datos debido a la mortalidad total de los ápices.

3.5 Experimento 2. Efecto del 2,4-D y BAP en el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*.

3.5.1 Introducción

A las cuatro semanas de germinadas las vitroplántulas se extrajeron cotiledones e hipocotiledones. Se inoculó los explantes tanto cotiledonares como hipocotiledonares en un medio Gamborg B5 (Cuadro 2) con el propósito de obtener alguna respuesta morfogénica que implique o no obtener formación de callo y que nos permita posteriormente inducir la formación de brotes o embriones somáticos.

Para este experimento se realizó 24 tratamientos, 3 repeticiones por tratamiento y 10 UE's por repetición para un total de 720 unidades experimentales. Se utilizó dos tipos de explante: cotiledones e hipocotilos; dos hormonas: la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) con tres dosis (0, 0.2, 0.4 mg/l) y la citocinina benzylaminopurina (BAP) con cuatro dosis (0, 5, 10, 15 μ M). En el Cuadro 4 se detalla los tratamientos de los dos explantes y los tipos y niveles de hormonas utilizados.

Cuadro 4. Niveles de Acido 2, 4 dicloro-fenoxiacético(2,4-D) y benzylaminopurina (BAP) utilizados para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan* a partir de segmentos cotiledonares e hipocotiledonares (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

No. Tratamiento	Tipo de Explante	BAP		2,4-D	
		mg/ l	μM/ l	mg/ l	μM/ l
1	COTILEDON	0.00	0	0.0	0.00
2	COTILEDON	0.00	0	0.2	0.90
3	COTILEDON	0.00	0	0.4	1.81
4	COTILEDON	1.13	5	0.0	0.00
5	COTILEDON	1.13	5	0.2	0.90
6	COTILEDON	1.13	5	0.4	1.81
7	COTILEDON	2.25	10	0.0	0.00
8	COTILEDON	2.25	10	0.2	0.90
9	COTILEDON	2.25	10	0.4	1.81
10	COTILEDON	3.38	15	0.0	0.00
11	COTILEDON	3.38	15	0.2	0.90
12	COTILEDON	3.38	15	0.4	1.81
13	HIPOCOTILO	0.00	0	0.0	0.00
14	HIPOCOTILO	0.00	0	0.2	0.90
15	HIPOCOTILO	0.00	0	0.4	1.81
16	HIPOCOTILO	1.13	5	0.0	0.00
17	HIPOCOTILO	1.13	5	0.2	0.90
18	HIPOCOTILO	1.13	5	0.4	1.81
19	HIPOCOTILO	2.25	10	0.0	0.00
20	HIPOCOTILO	2.25	10	0.2	0.90
21	HIPOCOTILO	2.25	10	0.4	1.81
22	HIPOCOTILO	3.38	15	0.0	0.00
23	HIPOCOTILO	3.38	15	0.2	0.90
24	HIPOCOTILO	3.38	15	0.4	1.81

3.5.2 Elaboración del medio de cultivo Gamborg B5

Se preparó 7200 ml de medio Gamborg B5 (Cuadro 2) siguiendo el mismo procedimiento explicado en el punto 3.3.1. Una vez aforado el medio de cultivo se dividió en 12 beakers correspondientes a cada tratamiento hormonal para cada tipo de explante. Finalmente se dispensó el medio de cultivo en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, a razón de 10 ml por contenedor

3.5.3 Inoculación de los explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el medio de cultivo

Los cotiledones se extrajeron y se cortaron por la mitad para obtener cuatro segmentos cotiledonares por vitroplántula de 1 cm cuadrado. Los hipocotilos se extrajeron y se cortaron por la mitad para obtener dos hipocotilos de aproximadamente 1 cm de largo por vitroplántula.

En cada contenedor se sembró un segmento cotiledonar de manera polar en el medio de cultivo, o sea, con el envés tocando el medio de cultivo. Los segmentos hipocotiledonares se colocaron horizontalmente en los contenedores. Se sembró de manera polar por referencia a experimentos previamente realizados en *Tabebuia rosea* por Carlos Pavón, 2001.

3.5.3.1 Toma de datos A los 15 días y 21 días de sembrados los explantes cotiledonares e hipocotiledonares, al obtener formación de tejido callogénico se tomó datos de tamaño en centímetros del callo formado y del porcentaje de callosidad por categorías del 1 al 4, siendo 1 de 0 a 25%, 2 de 26-50%, 3 de 51-75% y 4 de 76-100% .

3.6 Experimento 3. Efecto del AIA y BAP en la inducción morfogénica a partir de tejido calloso de *Tabebuia guayacan*

3.6.1 Introducción

Este experimento se llevó a cabo con el objeto de inducir alguna respuesta en cuanto a diferenciación de callo, aparición de embriones somáticos u órganos. Se elaboró el medio de cultivo Gamborg (Cuadro 2) con la adición de ácido indoleacético (AIA) y BAP como reguladores de crecimiento. Se seleccionó el mejor tratamiento del experimento anterior en cuanto a apariencia y formación de callo tanto de los cotiledones como de los hipocotiledones. Se extrajo estos callos y se los sometió a 12 tratamientos cada uno con 10 unidades experimentales, tanto para el callo proveniente de cotiledones como para el de hipocotiledones para un total de 24 tratamientos y 240 unidades experimentales.

Además se tomó los callos de los otros tratamientos que no fueron seleccionados y se sometieron al azar a los mismos 12 tratamientos siempre manteniendo separados los provenientes de hipocotilos de los provenientes de cotiledones.

Se utilizó concentraciones de 0, 0.5 y 1.0 mg/l de AIA y 0, 1.13, 2.25 y 3.38 mg/l de BAP para estimular la brotación y se eliminó el 2,4-D que se utilizó en el experimento anterior debido a que este regulador solo forma tejido callogénico y no diferenciación de órganos. En el Cuadro 5 se muestran los tratamientos y las concentraciones de hormonas para cada tratamiento.

Cuadro 5. Niveles de Acido indoleacético (AIA) y benzylaminopurina (BAP) utilizados para la inducción morfogénica a partir de tejido calloso de *Tabebuia guayacan* (Experimentos 3 y 4). Zamorano, Honduras, 2001.

No. Tratamiento	Tipo de Explante	BAP		AIA	
		mg/l	μM/l	Mg/l	μM/l
1	COTILEDON	0.00	0	0	0.00
2	COTILEDON	1.13	5	0	0.00
3	COTILEDON	2.25	10	0	0.00
4	COTILEDON	3.38	15	0	0.00
5	COTILEDON	0.00	0	0.5	2.85
6	COTILEDON	1.13	5	0.5	2.85
7	COTILEDON	2.25	10	0.5	2.85
8	COTILEDON	3.38	15	0.5	2.85
9	COTILEDON	0.00	0	1.0	5.70
10	COTILEDON	1.13	5	1.0	5.70
11	COTILEDON	2.25	10	1.0	5.70
12	COTILEDON	3.38	15	1.0	5.70
13	HIPOCOTILO	0.00	0	0	0.00
14	HIPOCOTILO	1.13	5	0	0.00
15	HIPOCOTILO	2.25	10	0	0.00
16	HIPOCOTILO	3.38	15	0	0.00
17	HIPOCOTILO	0.00	0	0.5	2.85
18	HIPOCOTILO	1.13	5	0.5	2.85
19	HIPOCOTILO	2.25	10	0.5	2.85
20	HIPOCOTILO	3.38	15	0.5	2.85
21	HIPOCOTILO	0.00	0	1.0	5.70
22	HIPOCOTILO	1.13	5	1.0	5.70
23	HIPOCOTILO	2.25	10	1.0	5.70
24	HIPOCOTILO	3.38	15	1.0	5.70

3.6.2 Elaboración de medio de cultivo Gamborg B5

Se elaboró 4800 ml de medio Gamborg B5 (Cuadro 2) siguiendo el procedimiento que se explicó en el punto 3.3.1. Una vez preparado el medio de cultivo se dividió en 12 beakers, correspondientes a cada tratamiento con AIA y BAP como reguladores de crecimiento y se continuó con el proceso. Finalmente se dispensó el medio en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, a razón de 10 ml por contenedor.

3.6.3 Inoculación y transferencia de callo

El callo proveniente de los tratamientos seleccionados se extrajo y se dividió en porciones pequeñas de 0.1 gramos aproximadamente. Seguidamente se inoculó en los contenedores, evitando inocular tejido original del cotiledón o del hipocotiledón y material muerto.

3.6.3.1 Toma de datos. A las dos semanas de transplantados los callos se tomó datos de coloración de callo por categorías del 1 al 4 siendo el 1 verde, 2 verde amarillento, 3 café y 4 necrotizado. Nos interesaba obtener una mayor cantidad de callos en la categoría uno, ya que el color verde indica que el callo tenía actividad meristemática, por lo tanto estaba en capacidad de diferenciarse.

3.7 Experimento 4. Iniciación de suspensiones celulares apartir de tejido callogénico obtenido de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*

3.7.1 Introducción

Debido a que el tejido callogénico presentó características de buena friabilidad se elaboró los mismos 12 tratamientos del experimento anterior (Cuadro 5) con las hormonas AIA y BAP para inocular el callo en suspensiones celulares. Se inoculó una unidad experimental por cada tratamiento de callo tanto cotiledonar como hipocotiledonar en los erlenmeyers conteniendo el medio líquido, teniendo un total de 24 unidades experimentales. Esto se hizo con el objetivo de obtener respuestas en cuanto a multiplicación de callo y/o formación de órganos o embriones somáticos.

3.7.2 Elaboración del medio líquido

Se elaboró 600 ml de medio Gamborg B5 (Cuadro 3) siguiendo el mismo procedimiento que se especifica en el punto 3.3.1 pero sin agregar el agente gelatinizante al medio. Se dispensó 25 ml de medio de cultivo en cada uno de 24 erlenmeyers de 250 ml correspondientes a cada tratamiento con las mismas concentraciones de AIA y BAP del experimento anterior.

3.7.3 Inoculación

Se extrajo el callo de los tratamientos seleccionados del experimento 2 tanto de hipocotilos como cotiledones y se inoculó 1 gramo de callo por cada erlenmeyer. La incubación de las suspensiones celulares se realizó en una plataforma agitadora en el cuarto de crecimiento bajo las mismas condiciones de los experimentos anteriores.

3.7.3.1 Toma de datos. Se evaluó friabilidad, color del callo y se observó si hubo regeneración de tejido calloso y formación de brotes y/o embriones somáticos.

3.8 Experimento 5. Efecto del medio Gamborg B5 sin reguladores de crecimiento en callo obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* incubados bajo condiciones de luz y oscuridad

3.8.1 Introducción

A las cuatro semanas de cultivado el callo del experimento 3, se eliminaron los callos por apariencia, forma y necrosis. Se seleccionó los mejores callos para transferirlos a un medio sin reguladores de crecimiento, con el objetivo de evaluar si la ausencia de reguladores de crecimiento estimula la producción de órganos o embriones somáticos como sucede en la mayoría de especies forestales.

El callo seleccionado del experimento 3 fue aquel que mantuvo su coloración verde, es decir que estaba en la categoría 1, además de que tenía un buena apariencia porque no se había deshidratado ni se había necrotizado.

Se realizó cuatro tratamientos con el mismo medio de cultivo, Gamborg (Cuadro 2) sin reguladores de crecimiento. Los tratamientos se diferenciaron por el tipo de callo que se inoculó, ya sea proveniente de cotiledones o de hipocotilos, y por las condiciones de incubación ya sea luz u oscuridad.

Se sembró 40 unidades experimentales bajo luz, la mitad de callos proveniente de cotiledones y la otra mitad de callo proveniente de hipocotilos. Además se sembró 40 unidades experimentales bajo condiciones de oscuridad las primeras 24 horas de incubación, la mitad con callo proveniente de cotiledones y la otra mitad de hipocotilos.

3.8.2 Elaboración del medio de cultivo

Se elaboró 1600 ml de medio Gamborg B5 (Cuadro 2) siguiendo el mismo procedimiento que se especifica en el punto 3.3.1 pero sin reguladores de crecimiento. Finalmente se dispensó el medio en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, a razón de 10 ml por contenedor.

3.8.3 Siembra, transferencia e inoculación

Se extrajo los callos seleccionados provenientes de explantes cotiledonares e hipocotiledonares, se dividió en porciones de 0.1 gramos aproximadamente y se inocularon en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

Se separó 20 contenedores con callo provenientes de explantes cotiledonares y 20 contenedores con callo provenientes de explantes hipocotiledonares y se dejaron bajo condiciones de oscuridad durante las primeras 24 horas de incubación. Después de estas 24 horas se expuso los callos a la luz y se mantuvieron bajo las condiciones normales del cuarto de crecimiento durante todo el resto del proceso.

Los otros 20 tubos de cada tratamiento, tanto los provenientes de explantes hipocotiledonares como los provenientes de cotiledonares, se incubaron bajo condiciones de luz en el cuarto de crecimiento durante todo el proceso.

3.8.3.1 Toma de datos. Al no tener respuesta de brotación de órganos o embrioides, se evaluó coloración en cuanto a los callos que mantuvieron su coloración verde y los que se tornaron color café y necróticos.

3.9 Análisis estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para los experimentos 1,2 y 3. En los experimentos 1 y 2 se realizaron 24 tratamientos y 3 réplicas de 10 unidades experimentales por réplica para cada tratamiento. En el experimento 3 se realizaron 24 tratamientos con 10 unidades experimentales por tratamiento.

Se evaluó las siguientes variables: tipo de explante (TE), tipo de hormona (TH), nivel de hormona (NH), la interacción entre ellas y el efecto de las mismas en el porcentaje de callosidad y en el tamaño del callo.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar los tratamientos y una separación de medias Student-Newman-Keuls (SNK) para determinar el mejor tratamiento. La separación de medias se realizó para la interacción de las variables tipo de explante y nivel de hormona.

Se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS®) para el análisis de estos datos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Desinfección y germinación *in vitro* de semilla genética de *Tabebuia guayacan*

Como se muestra en el Cuadro 6, se obtuvo un menor porcentaje de contaminación de hongos y bacterias (5%) en la semilla desinfectada al 1% de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, comparada al 12% y 20% de contaminación que tuvieron las semillas desinfectadas al 0.5% y 0.35% de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ respectivamente. Esto se debió a que era mayor la concentración de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, ya que se expuso el mismo tiempo (30 minutos) la semilla al desinfectante.

Igualmente, en el Cuadro 6 se muestra que las semillas desinfectadas al 0.5% tuvieron un mayor porcentaje de germinación (94%), comparado al 78% y 70% de germinación que tuvieron las semillas desinfectadas al 0.35% y 1% de hipoclorito de calcio respectivamente. Estos resultados hacen suponer que la concentración muy alta (1%) de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ pudo haber afectado la germinación. En el caso de la concentración de 0.35%, la baja germinación pudo deberse a que la contaminación no permitió la germinación de algunas semillas.

Cuadro 6. Porcentaje de germinación *in vitro* y contaminación según agente causal de semilla de *Tabebuia guayacan* expuesta a varias concentraciones de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Zamorano, Honduras, 2001.

Semillas Sembradas	% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$	% de Germinación	Contaminación %		
			Hongos	Bacterias	Total
50	0.35	78.0	6	14	20
80	0.5	94.0	4	8	12
60	1.0	70.0	5	0	5

La decisión de desinfectar la semilla con 0.5% de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ se tomó en base de que, este tratamiento a pesar de tener mayor contaminación que la semilla desinfectada con 1%, presentó una mayor germinación lo cual compensó la pérdida de semillas por contaminación.

4.2 Experimento 1. Efecto del BAP en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia guayacan*.

En este experimento se midió la elongación de los ápices a los 21 días de sembrado, obteniéndose una media de 1.25 cm (Anexo 1). De acuerdo a los resultados obtenidos, la elongación de los ápices meristemáticos no fue significativamente influenciada por el nivel de hormona (NH), los días después de siembra (DDS) y la relación entre el NH y los DDS. El análisis estadístico muestra que a pesar de que los diferentes niveles de BAP utilizados 0, 5, 10, 15 y 20 μM no fueron significativamente diferentes la media mas alta se dió para el tratamiento con 10 μM (Cuadro 7).

Cuadro 7. Altura promedio de ápices meristemáticos a los 21 días después de la siembra y su nivel de significancia a cada concentración de BAP (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

BAP (μM)	Altura promedio (cm)	Grupo SNK*
0	1.24	A
5	1.15	A
10	1.40	a
15	1.17	a
20	1.26	a

* Promedios en cada columna seguidas por letras iguales, son estadísticamente iguales $P > 0.05$

Para la inducción de brotación se cambió todos los ápices al tratamiento que presentó la media más alta y que tenía mejor apariencia. Este tratamiento correspondió al que contenía una concentración de 10 μM de BAP. Se tomó esta decisión debido a que no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos y a que los ápices de los tratamientos con 0, 5, 15, y 20 μM de BAP presentaron necrosis en las hojas primarias y amarillamiento en el ápice. Esto puede indicar que concentraciones muy altas (15, 20 $\mu\text{M/l}$) y/o muy bajas (0, 5 $\mu\text{M/l}$) de BAP degradaron el material.

Después de 4 semanas de transferidos los ápices al nuevo medio de cultivo con 10 μM de BAP, no se observó ningún desarrollo, por el contrario, ocurrió una necrosis y senescencia total de los ápices. Esto pudo ser debido al estrés que se produjo en los ápices al eliminar todo el material necrótico y las hojas verdaderas que habían empezado a salir.

4.3 Experimento 2. Efecto del 2,4-D y BAP en el establecimiento *in vitro* a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*.

Para los explantes cotiledonares e hipocotiledonares los datos muestran que el tamaño promedio de callo (TPC) fue de 1.26 cm (Anexo 2). Se observó que todas las variables influyeron significativamente, excepto la interacción entre tipo de hormona (TH) y DDS y la interacción entre el tipo de explantes (TE), el TH y el NH. Esto quiere decir que en el tiempo, el tamaño del callo de los dos explantes aumentó, independientemente de que tenga auxinas, citocininas o una combinación de ambas e independientemente del nivel de hormonas.

El porcentaje promedio de callosidad (PPC) estaba en la categoría de 1.8 (50% de callosidad) (Anexo 3). Influyeron significativamente todas las variables, la única interacción que no influyó fue la de TE-DDS. Probablemente esto puede deberse a que el porcentaje de callosidad aumenta en el tiempo independientemente del explante. La media es bastante baja (50%) debido a que se tomó datos cuando recién empezaba la curva de crecimiento del callo y debido a que habían varios tratamientos que tenían 0% de callosidad.

4.3.1 Efecto del tipo de Explante en el tamaño promedio del callo (TPC) y en el porcentaje promedio de callosidad (PPC).

4.3.1.1 TPC. La media de tamaño de callo en los segmentos cotiledonares fue de 1.37 cm y de los segmentos hipocotiledonares fue de 1.14 cm (Cuadro 8). Como se puede apreciar la media de los segmentos cotiledonares fue significativamente mayor que la de los segmentos hipocotiledonares. Este tamaño menor en los hipocotilos pudo deberse a que los explantes iniciales eran más pequeños que los cotiledones al momento de la siembra y que los cotiledones se expandieron horizontalmente más que lo que se expandieron los hipocotilos.

4.3.1.2 PPC. Por el contrario, la media en porcentaje de callosidad de los segmentos hipocotiledonares fue significativamente mayor que en los cotiledonares. En los segmentos hipocotiledonares fue de 2.1% y en los segmentos cotiledonares 1.52% (Cuadro 8). Esto indica que la mayoría de los segmentos hipocotiledonares estaban arriba del 50% de callosidad mientras que los cotiledonares no llegaron al 50%.

Cuadro 8. Efecto del tipo de explante en el tamaño promedio de callo (TPC) y en el porcentaje promedio de callosidad (PPC) obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

	Tipo de Explante	
	Cotiledón*	Hipocotilo*
TPC	1.37 (a)	1.14 (b)
PPC	1.52 (b)	2.10 (a)

* Letras diferentes en cada columna son diferentes estadísticamente. SNK (P<0.05)

Estos resultados nos muestran que no había relación entre el TPC y el PPC. Por lo que puede ser mejor sembrar hipocotilos para obtener mayor callosidad, ya que los cotiledones fueron más grandes en tamaño pero no en porcentaje de callosidad que cubriera el explante.

4.3.2 Efecto de los días después de siembra (DDS) en el TPC y en el PPC

Como se muestra en el Cuadro 9, la media en los dos explantes, tanto en PPC como en TPC fue significativamente mayor a los 21 dds que a los 14 dds. Esto indica que para propósitos de multiplicación de callo es conveniente esperar hasta los 21 días.

Cuadro 9. Efecto del tiempo de incubación en el tamaño promedio de callo (TPC) y en el porcentaje promedio de callosidad (PPC) obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

	Días después de siembra (dds)	
	15 dds	21 dds
TPC*	1.18 (b)	1.33 (a)
PPC*	1.51 (b)	2.07 (a)

* Letras diferentes en cada fila son diferentes estadísticamente. SNK (P<0.05)

4.3.3 Efecto del tipo de Hormona en el tamaño promedio del callo (TPC) y en el porcentaje promedio de callosidad (PPC)

4.3.3.1 TPC. Los tratamientos que contenían solamente la auxina 2,4-D y los tratamientos que contenía la auxina 2,4-D mas la citocinina BAP no fueron significativamente diferentes entre si en el tamaño promedio de callo, pero si fueron diferentes a los tratamientos que solo contenían la citocinina BAP (Cuadro 10). Por lo que se puede decir que para evitar gasto innecesario de hormonas y obtener el mismo resultado en cuanto a tamaño es mejor solo utilizar la auxina 2,4-D.

4.3.3.2 PPC. El Cuadro 10 muestra también que los tratamientos que contenían solamente la auxina 2,4-D fueron significativamente mejores en cuanto a formación de callo (2.66), seguido de los que tenían los dos tipos de hormonas (2,4-D y BAP) (1.84). Los tratamientos que solo contenían la citocinina BAP fueron menos efectivos para la formación de tejido calloso (1.07). Estos resultados concuerdan con el hecho de que la auxina 2,4-D estimula la división celular y la formación de tejido callogénico y no necesita de citocininas para este proceso. Por esto el 2,4-D se utiliza con frecuencia para este propósito en las vías de regeneración indirectas.

Cuadro 10. Efecto del tipo de hormona en el tamaño promedio de callo (TPC) y en el porcentaje promedio de callosidad (PPC) obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

Hormona	PPC*	TPC*
2,4-D	2.66 (a)	1.29 (a)
2,4D/BAP	1.84 (b)	1.27 (a)
BAP	1.07 (c)	1.22 (b)

*Letras diferentes en cada columna son diferentes estadísticamente. SNK (P<0.05)

4.3.4 Efecto de los niveles de hormonas en el tamaño promedio del callo (TPC) y en el porcentaje promedio de callosidad (PPC)

4.3.4.1 TPC. En el Cuadro 11 se observa el efecto de los diferentes niveles de hormonas en el TPC independientemente del tipo de explante. Se observó significativamente un mayor efecto en el tamaño del callo en los tratamientos que contenían niveles de 0.2 mg/l de 2,4-D con 1.13 mg/l de BAP y 0.4 mg/l de BAP con 1.13 mg/l de BAP. Los demás tratamientos no fueron significativamente relevantes.

Cuadro 11. Efecto de los niveles de hormonas en el tamaño promedio de callo (TPC) obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

No. de Trt.	Nivel en mg/l		TPC	Grupo SNK*
	2,4-D	BAP		
6	0.2	1.13	1.43	a
5	0.4	1.13	1.39	a
8	0.2	2.25	1.33	b
2	0.2	0.00	1.31	b
1	0.0	0.00	1.24	c
3	0.4	0.00	1.22	cd
9	0.4	2.25	1.17	dce
10	0.0	3.38	1.17	dce
4	0.0	1.13	1.16	e
7	0.0	2.25	1.15	e
11	0.2	3.38	1.15	e
12	0.4	3.38	1.12	e

*Promedios seguidos por diferente letra son estadísticamente diferentes (P<0.05)

4.3.4.2 PPC En el Cuadro 12 se observa el efecto de los diferentes niveles de hormonas en el PPC. Se observó significativamente un mayor efecto en el porcentaje de callosidad en los tratamientos que contenían niveles de 0.4 mg/l de 2,4-D con 1.13 mg/l de BAP y 0.2 mg/l de 2,4-D con 1.13 mg/l de BAP. Los demás tratamientos no fueron significativamente relevantes.

Cuadro 12. Efecto de los niveles de hormonas en el porcentaje promedio de callosidad (PPC) obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

No. de Trt	Niveles en mg/l		% de callosidad	Grupo SNK*
	2,4-D	BAP		
6	0.4	1.13	2.85	a
5	0.2	1.13	2.83	a
8	0.2	2.25	2.38	b
2	0.2	0.00	2.09	c
3	0.4	0.00	1.87	cd
9	0.4	2.25	1.74	de
12	0.4	3.38	1.53	ef
11	0.2	3.38	1.33	f
4	0.0	1.13	0.78	g
7	0.0	2.25	0.65	g
10	0.0	3.38	0.60	g
1	0.0	0.00	0.21	h

*Promedios seguidos por diferente letra son estadísticamente diferentes (P<0.05)

4.3.5 Efecto de la interacción de los dos tipos explantes y los diferentes tipos y niveles de hormonas en el tamaño promedio de callo (TPC)

Se observó un mayor tamaño del callo con los tratamientos que tenían 0.2 mg/l 2,4-D con 1.13 mg/l BAP y 0.2 mg/l 2,4-D con 2.25 mg/l BAP con explantes cotiledonares. Estos tratamientos no fueron significativamente diferentes entre si. El menor tamaño se observó en el callo proveniente del segmento hipocotiledonar con 0.4 mg/l 2,4-D con 3.38 mg/l BAP (Cuadro 13)

Cuadro 13. Efecto de la interacción de los dos tipos explantes y los diferentes tipos y niveles de hormonas en el tamaño promedio de callo TPC obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

No. de Trt	Explante	Niveles en mg/l		TPC	Grupo SNK*
		2,4-D	BAP		
17	Cotiledón	0.2	1.13	1.78	a
20	Cotiledón	0.2	2.25	1.76	a
18	Cotiledón	0.4	1.13	1.71	ab
16	Cotiledón	0.0	1.13	1.59	bc
14	Cotiledón	0.2	0.00	1.51	dc
15	Cotiledón	0.4	0.00	1.43	de
21	Cotiledón	0.4	2.25	1.37	def
19	Cotiledón	0.0	2.25	1.36	def
23	Cotiledón	0.2	3.38	1.34	defg
6	Hipocotilo	0.4	1.13	1.34	defg
5	Hipocotilo	0.2	1.13	1.33	defg
24	Cotiledón	0.4	3.38	1.32	defg
3	Hipocotilo	0.4	0.00	1.32	defg
1	Hipocotilo	0.0	0.00	1.27	efgh
22	Cotiledón	0.0	3.38	1.27	efgh
13	Cotiledón	0.0	0.00	1.26	efgh
2	Hipocotilo	0.2	0.00	1.23	efghi
4	Hipocotilo	0.0	1.13	1.18	fghi
10	Hipocotilo	0.0	3.38	1.14	ghi
9	Hipocotilo	0.4	2.25	1.10	hi
7	Hipocotilo	0.0	2.25	1.08	hi
11	Hipocotilo	0.2	3.38	1.05	i
8	Hipocotilo	0.2	2.25	1.05	i
12	Hipocotilo	0.4	3.38	1.04	i

*Promedios seguidos por diferente letra son estadísticamente diferentes (P<0.05)

4.3.6 Efecto de la interacción de los dos tipos explantes y los diferentes tipos y niveles de hormonas en el porcentaje promedio de callosidad (PPC)

Se observó una mejor respuesta en el porcentaje de callosidad con los tratamientos que tenían 0.4 mg/l 2,4-D con 0.00 mg/l BAP con explantes hipocotiledonares. El menor tamaño se observó en el callo proveniente del segmento hipocotiledonar con 0.00 mg/l 2,4-D con 3.38 mg/l BAP (Cuadro 14)

Cuadro 14. Efecto de la interacción de los dos tipos explantes y los diferentes tipos y niveles de hormonas en el porcentaje promedio de callosidad (PPC) obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan* (Experimento 2). Zamorano, Honduras, 2001.

No. de Trt	Explante	Dosis en mg/l		PPC	Grupo SNK*
		2,4-D	BAP		
3	Hipocotilo	0.4	0.00	4	a
5	Hipocotilo	0.2	1.13	3.87	ab
6	Hipocotilo	0.4	1.13	3.58	abc
12	Hipocotilo	0.4	3.38	3.4	abcd
14	Cotiledón	0.2	0.00	3.25	bcde
8	Hipocotilo	0.2	2.25	3.21	bcde
20	Cotiledón	0.2	2.25	3.06	cdef
17	Cotiledón	0.2	1.13	2.92	cdefg
18	Cotiledón	0.4	1.13	2.89	cdefg
11	Hipocotilo	0.2	3.38	2.89	cdefg
9	Hipocotilo	0.4	2.25	2.65	defg
2	Hipocotilo	0.2	0.00	2.48	efg
15	Cotiledón	0.4	0.00	2.34	fg
16	Cotiledón	0.0	1.13	2.26	g
4	Hipocotilo	0.0	1.13	1.64	h
21	Cotiledón	0.4	2.25	1.36	h
19	Cotiledón	0.0	2.25	1.32	h
22	Cotiledón	0.0	3.38	1.06	hi
23	Cotiledón	0.2	3.38	0.60	ij
24	Cotiledón	0.4	3.38	0.44	j
7	Hipocotilo	0.0	2.25	0.26	j
13	Cotiledón	0.0	0.00	0.25	j
1	Hipocotilo	0.0	0.00	0.13	j
10	Hipocotilo	0.0	3.38	0.04	j

*Promedios seguidos por diferente letra son estadísticamente diferentes (P<0.05)

4.4 Experimento 3. Efecto del AIA y BAP en la multiplicación de tejido callogénico e inducción morfogénica a partir de tejido calloso de *Tabebuia guayacan*

4.4.1 Efecto del tipo de Explante en la coloración de tejido callogénico

A los 21 días de sembrado el callo, se tomó datos del color de callo por categorías. El Cuadro 15 muestra que el callo proveniente de segmentos cotiledonares tuvo una media de 2.54, que fue significativamente mayor que la media del callo proveniente de segmentos hipocotiledonares 2.34. Considerando que el color verde (categoría 1) es el más apropiado para la inducción morfogénica se deduce que los callos provenientes de los segmentos hipocotiledonares serán mas apropiados a usar para iniciar suspensiones celulares. Aunque a pesar de ser significativamente diferentes los callos de las dos procedencias, los dos muestran un color verde amarillento.

Cuadro 15. Efecto del tipo de explante en la coloración de tejido callogénico de *Tabebuia guayacan* transferido a medio de inducción morfogénica (Experimento 3) . Zamorano, Honduras, 2001.

Color de callo*	Tipo de Explante	
	COTILEDON	HIPOCOTILO
	2.56 (a)	2.34 (b)

* Letras diferentes en la fila son diferentes estadísticamente. SNK (P<0.05)

4.4.2 Efecto del tipo de Hormona en la coloración del tejido callogénico

Se observo una diferencia significativa en el color del callo entre los tratamientos, independientemente del tipo de explante y de la dosis de hormona utilizadas. Considerando que los mejores callos en cuanto a color fueron los que pertenecían a la categoría 1, podemos observar en el Cuadro 16 que los tratamientos que solo contenían AIA (1.89), fueron significativamente mejores que los que tenían AIA combinado con BAP (2.49) y que los tratamientos que tenían solo BAP (2.54)

Cuadro 16. Efecto del tipo de hormona en la coloración de tejido callogénico de *Tabebuia guayacan* transferido a medio de inducción morfogénica (Experimento 3) . Zamorano, Honduras, 2001.

Hormona	Color de callo	Grupo SNK*
BAP	2.54	a
AIA/BAP	2.49	a
AIA	1.89	b

*Promedios seguidos por diferente letra son estadísticamente diferentes (P<0.05)

4.4.3 Efecto del nivel de hormonas en la coloración del tejido callogénico

En el Cuadro 17 se muestra la influencia de las distintas dosis de BAP y de AIA en el color del tejido calloso independientemente del tipo de explante utilizado. Se encontró que fue significativamente mejor el color del callo proveniente del tratamiento con las concentración más alta de AIA (1 mg/l) y la intermedia de BAP (2.25 mg/l).

Cuadro 17. Efecto de las dosis de hormonas en la coloración de tejido callogénico de *Tabebuia guayacan* transferido a medio de inducción morfogenética (Experimento 3). Zamorano, Honduras, 2001.

No. de Trt	Dosis en mg/l		Color	Grupo SNK*
	AIA	BAP		
1	0.0	0.00	4.00	a
9	1.0	0.00	2.75	b
4	0.0	3.38	2.68	b
7	0.5	2.25	2.61	b
3	0.0	2.25	2.55	b
8	0.5	3.38	2.50	b
2	0.0	1.13	2.40	bc
6	0.5	1.13	2.35	bc
12	1.0	3.38	1.93	bc
10	1.0	0.00	1.89	bc
5	0.5	0.00	1.89	bc
11	1.0	2.25	1.73	d

*Promedios seguidos por diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

4.5 Experimento 4. Iniciación de suspensiones celulares a partir de tejido callogénico obtenido de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*

A las dos semanas de estar en el cuarto de crecimiento las suspensiones celulares fueron eliminadas ya que no se observó multiplicación ni diferenciación del callo. El callo se tornó color café, perdió su friabilidad y se formaron agregados duros. En este experimento no se observó contaminación.

4.6 Experimento 5. Efecto del medio de cultivo Gamborg B5 sin reguladores de crecimiento en callo obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*

No se observó ninguna diferencia entre los callos que se colocaron bajo obscuridad las primeras 24 horas con los que se colocaron directamente bajo la luz. Ni entre los callos provenientes de segmentos cotiledonares e hipocotiledonares. En los dos tratamientos el callo se necrotizó y no se observó formación de brotes o raíces.

5. CONCLUSIONES

Generales

- Para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan* se logró formar tejido callogénico a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares procedentes de plántulas germinadas *in vitro*.
- Para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan* se logró enlongar los ápices meristemáticos producidos *in vitro* antes de transferirles a medio de cultivo de multiplicación.
- No se logró observar rebrotes a partir de los ápices meristemáticos al transferirles a medio de cultivo de multiplicación.

Específicas

- Se estableció un procedimiento de desinfección de la semilla de *Tabebuia guayacan* utilizando una concentración de hipoclorito de calcio de 0.5% durante 30 minutos, con la que se logró una relación positiva entre % de contaminación y % de germinación *in vitro* de la semilla.

Apices meristemáticos

- Para el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos se observó una mayor elongación de los ápices al utilizar BAP a razón de 10 μ M.
- El estrés causado a los ápices durante la transferencia a medio de multiplicación o inducción de brotación resultó en la muerte de los mismos.

Explantos cotiledonares e hipocotiledonares

- Durante el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *T. guayacan* se observó que los dos niveles menores de 2,4-D y BAP utilizados en conjunto, tuvieron mejor efecto en el tamaño promedio de callo (TPC) y en el porcentaje promedio de callosidad (PPC).
- No se observó un efecto positivo en cuanto a diferenciación del callo al transferir el tejido callogénico a un medio de cultivo con AIA y BAP.
- No se observó respuestas positivas al transferir el tejido callogénico a un medio sin reguladores de crecimiento.
- No se observó respuesta del callo al someterlo a tratamientos de luz y oscuridad.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar otros medios de cultivo para especies leñosas como el Woody Plant Medium (WPM) para las etapas de establecimiento e inducción de brotación *in vitro* de ápices meristemáticos y para la etapa de establecimiento e inducción de callogénesis de cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*.
- Se recomienda no limpiar los ápices ni eliminar el material necrotizado para evitar estresar los ápices al transferir a un medio de inducción de brotación.
- En la etapa de establecimiento con explantes hipocotiledonares, para obtener un mejor porcentaje de callosidad se recomienda utilizar 0.4 mg/l 2,4-D sin BAP.
- En la etapa de establecimiento con explantes cotiledonares, para obtener un mejor tamaño de callo se recomienda utilizar 0.2 mg/l 2,4-D con 1.13 mg/l BAP ó 0.4 mg/l 2,4-D con 1.13 mg/l BAP.
- Se recomienda utilizar el tamaño de callo como criterio para seleccionar los mejores tratamientos y continuar estudios de inducción callogénica de *Tabebuia guayacan*.
- En la etapa de inducción de morfogénesis con explantes cotiledonares e hipocotiledonares, donde se sometió al tejido callogénico a concentraciones de AIA y BAP, se recomienda realizar simultáneamente pruebas de diferentes ciclos de exposición a luz y a oscuridad para ver si hay formación de órganos y/o embriones somáticos.
- Para mantener la coloración verde de tejido callogénico y evitar su degradación durante la etapa de multiplicación del callo se recomienda utilizar 1 mg/l de AIA y 2.25 mg/l de BAP.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, M. 1985. *In vitro* techniques in clonal propagation of forest tree species. In Ed. Schäfer-Menuhr, A. *In vitro* techniques. Dordrecht, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. p 41-48
- Benítez, R. 1988. Catálogo de cien especies forestales de Honduras. Siguatepeque, Honduras. ESNACIFOR. p. 173-174
- Bueno, M. 1992. Propagación clonal de árboles adultos de *Populus tremula* L. de la sierra de Madrid por cultivo de tejidos. Proceedings volumen 1. CIT-INIA. Departamento de sistemas forestales. Madrid, España. p. 523-528
- Bueno, M y Manzanera, J. 1992. Primeros ensayos en inducción de embriones somáticos de *Quercus suber* L.. SCIENTIA gerundensis. Departamento de Sistemas forestales. Universidad Politécnica de Madrid, España. 18:29-37.
- Culture of meristems and calli. 2001. Uni-hamburg.de (on line). Consultado agosto 2001. Disponible en <http://www.biologie.un-hamburg.de>
- Gamborg, O. 1995. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 357 p.
- George, E.F *et al.*, 1996. Plant Culture Media: Formulation and Uses. Volume 1. England. Exegenetics Limited. 420 p.
- Hartmann, H y Kester, D. 1997. Propagación de Plantas. Capítulo 16 Principios de Cultivo de Tejidos para la Micropropagación. México D.F, México. CECSA. p. 549-593.
- Herrera, H. 1985. Tissue Culture of *Pinus eldarica*. In Ed. Henke, R. Tissue culture in Forestry and Agriculture. Vol.32. New York, New York. Plenum Press. p. 322-323
- Huang, F. 1985. *In vitro* regeneration of plantlets from cultured tissues of scotts pine (*Pinus sylvestris*): In Ed. Henke, R. Tissue culture in Forestry and Agriculture. Vol.32. New York, New York. Plenum Press. p. 326
- Karan, K. 1985. Seasonal variation in callus proliferation from explants of mature *Pinus strobus* trees: In Ed. Henke, R. Tissue culture in Forestry and Agriculture. Vol.32. New York, New York. Plenum Press. p. 330
- Jordan, M y Cortés, I. 1981. Shoot organogenesis in tissue culture of *Drymis Winteri*. Plant Science Letters. Universidad Católica de Chile.(23)177-180.

- Manzanera, J. 1990. Propagación vegetativa de plantulas de alcornoque (*Quercus Suber*) por cultivo *In Vitro*. CIT-NIA. p.372-382.
- Ozias-Akins, P. 1985. Plant Regeneration from embryonic suspension-derived protoplasts of sandalwood: *In Ed.* Henke, R. Tissue culture in Forestry and Agriculture. Vol.32. New York, New York. Plenum Press. p. 338-339
- Pavón, C. 2001. Evaluación del uso de ápices meristemáticos y de explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*. Ing. Agrónomo. Zamorano, Honduras, Zamorano.
- Piola, F. 1996. Plant Tissue Culture and Biotechnology. Volume 2 No.4. Université de Lyon.Villeurbanne, France. p.199-201
- Sankara, K. 1985. *In vitro* cloning of *Dalbergia Latifolia*: *In Ed.* Henke, R. Tissue culture in Forestry and Agriculture. Vol.32. New York, New York. Plenum Press. p.346
- Standley, P. 1970. Flora of Guatemala. Botany, Volume 24, Field Museum Press. Washington, USA. p. 224-225
- Trigiano, R. 1996. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Chapter 21,22, CRC Press,Inc. Salem, MA. p.184-187, 191-197.
- Trigiano, R. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Chapter 16, CRC Press,Inc. Boca Raton. p.149-157.
- Zimmerman, R. 1985. Application of tissue culture, Propagation to woody plants. *In Ed.* Henke, R. Tissue culture in forestry and Agriculture. New York, New York. Plenum Press. p. 165-173

8. ANEXOS

Anexo 1. ANDEVA para tamaño de ápices meristemáticos de *Tabebuia guayacan* (Experimento 1) . Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente	DF	Media al Cuadrado	Valor F	Pr > F
Nivel de Hormona (NH)	4	0.53361038	1.77	0.1360
Días despues de siembra (DDS)	1	0.73528279	2.43	0.1200
NH x DDS	4	0.199327	0.66	0.6206
R₂= 0.43		X= 1.25		

Anexo 2. ANDEVA para tamaño promedio de callosidad (TPC) de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*. (Experimento 2) . Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente	DF	Media al Cuadrado	Valor F	Pr > F
Tipo de Explante (TE)	1	13.83875528	237.71	<.0001
Tipo de Hormona (TH)	1	0.26434568	4.54	0.0333
Nivel de Hormnoa (NH)	8	1.53422700	26.35	<.0001
Días despues de siembra(DDS)	1	5.01497903	86.14	<.0001
TE*TH	1	0.78213789	13.43	0.0003
TE*NH	8	1.01640686	17.46	<.0001
TE*DDS	1	1.25395652	21.54	<.0001
TH*NH	1	0.40332775	6.93	0.0086
TH*DDS	1	0.04978409	0.86	0.3553
NH*DDS	8	0.12563498	2.16	0.0282
TE*TH*NH	1	0.00273276	0.05	0.8285
R₂= 0.40		X=1.26		

Anexo 3. ANDEVA para porcentaje promedio de Callosidad (PPC) de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia guayacan*. (Experimento 2) . Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente	DF	Media al Cuadrado	Valor F	Pr > F
Tipo de Explante (TE)	1	53.9502617	49.43	<.0001
Tipo de Hormona (TH)	1	214.4674016	196.50	<.0001
Nivel de Hormnoa (NH)	8	82.497246	75.58	<.0001
Días despues de siembra(DDS)	1	71.7693936	65.76	<.0001
TE*TH	1	61.9989217	56.80	<.0001
TE*NH	8	22.5894979	20.70	<.0001
TE*DDS	1	0.0003701	0.00	0.9853
TH*NH	1	58.3975674	53.50	<.0001
TH*DDS	1	9.3054102	8.53	0.0036
NH*DDS	8	6.0784303	5.57	<.0001
TE*TH*NH	1	66.2691992	60.72	<.0001

R2= 0.55

X= 1.8

•