

**ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA  
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCION AGROPECUARIA**

**Evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Bertol) DC (macuelizo)**

Carlos Fernando Pavón Banegas

**ZAMORANO**  
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Abril, 2002**

**ZAMORANO**  
**Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria**

**Evaluación del uso de ápices meristemáticos y  
explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el  
establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Bertol)  
DC (macuelizo)**

Tesis presentada como requisito parcial  
para optar al título de Ingeniero Agrónomo  
en el grado académico de Licenciatura

**Presentado por:**

Carlos Fernando Pavón Banegas

Honduras: Abril, 2002

El autor concede a Zamorano permiso  
para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para fines educativos. Para otras personas  
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor

---

**Carlos Fernando Pavón Banegas**

Zamorano, Honduras  
Abril, 2002

**Evaluación del uso de ápices meristemáticos y  
explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el  
establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Bertol)  
DC (macuelizo)**

Presentado por:

Carlos Fernando Pavón Banegas

Aprobado:

---

Dinie E. de Rueda, M.Sc.  
Asesor Principal

---

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.  
Coordinador de la Carrera  
de Ciencia y Producción  
Agropecuaria

---

Alfredo Rueda, Ph.D.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph.D.  
Decano Académico

---

Pablo Paz, Ph. D.  
Coordinador PIA  
Fitotecnia/CCPA

---

Keith Andrews, Ph.D.  
Director

---

Alfredo Rueda, Ph. D.  
Coordinador Area Tématica

## **DEDICATORIA**

A Dios por todas sus bendiciones.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por acompañarme siempre.

A toda mi familia por todo su apoyo.

A mi asesora Dinie de Rueda por su ayuda. Al Dr. Jorge A. Christiansen por sus consejos y compartir su experiencia. Al Dr. Alfredo Rueda por toda su ayuda. Al Dr. Raúl Espinal por toda su ayuda.

A mi prima Rosa Emilia le deseo éxito en el tiempo que le queda en Zamorano.

Un agradecimiento especial al personal del Laboratorio de Cultivos de Tejidos de Zamorano: Zoila Sandoval y Ericka Salgado por toda ayuda y amistad.

## **AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES**

Al Fondo Dotal Hondureño por patrocinar parte de mi carrera de agrónomo.

Al Proyecto Zamorano/USAID de Reactivación Agrícola por brindarme la oportunidad de concluir mis estudios de ingeniería en un programa de estudio trabajo.

## RESUMEN

Pavón Banegas, Carlos Fernando. 2001. Evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Bertol) DC (macuelizo). Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 53 p.

La *Tabebuia rosea* es una especie de mucha importancia, que se distribuye por toda Mesoamérica y se usa como: ornamental, madera y medicina natural. La micropropagación no se ha aplicado a esta especie por esto el laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano se realizó un estudio para evaluar el uso de 4 partes tipos de explantes iniciales obtenidos a partir de vitropántulas para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*. El ensayo se dividió en cinco fases: Experimento 1, se evaluó el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares, hipocotiledonares y de hojas verdaderas en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con 8  $\mu\text{M}$  de Bencilaminopurina (BAP). Para los explantes cotiledonares y de hojas verdaderas, se evaluó el efecto del método de siembra (polar y apolar) y la presencia o ausencia de corte. El experimento tuvo un arreglo factorial incompleto de 9 tratamientos en total. Se obtuvo mayor Porcentaje de Tejido Callogénico (PC) en los explantes cotiledonares con siembra apolar. La realización de corte no se recomienda. Las hojas verdaderas mostraron alto Porcentaje de Oxidación (PO) lo que afecta su regeneración. Experimento 2a, se evaluó el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos con utilización de cinco niveles de BAP (0, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{M}$ ) en un medio de cultivo Gamborg (B5). Se encontró mayor Número de Brotes por Explante (NBE) y con una Altura por Brote (APB) adecuada en los ápices sembrados en el medio de cultivo con 10  $\mu\text{M}$  de BAP. Experimento 2b, se evaluó el enraizamiento *in vitro* de las porciones apicales y rebrotes de los ápices sembrados en el 2a con utilización de 15  $\mu\text{M}$  de Acido Indolebutírico (AIB) en un medio de cultivo B5. El nivel de AIB utilizado no estimuló la diferenciación radical en los explantes. Experimento 3a, se evaluó el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocótilonares con utilización de tres niveles de Acido 2,4-diclorofenoxyacetico (2,4-D) (0, 0.9, 1.8  $\mu\text{M}$ ) y cuatro niveles de BAP (0, 5, 10, 15  $\mu\text{M}$ ) en un medio de cultivo B5. El experimento tuvo un arreglo factorial completo de 24 tratamientos en total. Los dos tratamientos con mayor PC fueron: Cotiledones con 2,4-D a razón de 0.9  $\mu\text{M}$  e hipocótilos con 2,4-D y BAP a razón de 0.9  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente. Experimento 3b, se evaluó la multiplicación *in vitro* del tejido callogénico de los dos tratamientos de mayor PC del 3a con la utilización de cinco niveles (0, 2.25, 4.5, 6.75, 9  $\mu\text{M}$ ) de 2,4-D en un medio de cultivo B5. El experimento tuvo un arreglo factorial completo de 10 tratamientos. Los dos tratamiento sin presencia de 2,4-D mostraron las mayores tasas de multiplicación. En conclusión, el cultivo de ápices meristemáticos es una alternativa factible para propagar la especie, ya que se obtuvo proliferación de brotes basales y nudos que aumentan el material vegetal disponible para la multiplicación masiva. Los explantes cotiledonares e hipocotiledonares mostraron adecuada formación de tejido callogénico y se puede utilizar como explante para la inducción de morfogenética.

**Palabras claves:** AIB, BAP, callogénico, micropropagación, morfogenética, oxidación, 2,4-D.

## NOTA DE PRENSA

### **Micropropagación de Macuelizo (*Tabebuia rosea*) Arbol Nacional de República El Salvador**

La micropropagación o cultivo de tejidos representa una nueva alternativa muy productiva para obtener una producción masiva de macuelizo, especie que habita toda Mesoamérica. Es un árbol de gran importancia y con múltiples usos: ornamental, por tener una flor rosada muy llamativa; forestal, por poseer madera con buenas características físicas y de trabajabilidad, útil en la construcción y ebanistería; además, puede utilizarse como medicina natural.

La especie recibe diferentes nombres según la zona geográfica, donde se encuentre: Flor de mayo, flor rosada, maquilisguath, san juan, roble, macuelizo. La forma tradicional de su propagación es por medio de semillas, pero la micropropagación permite el uso de partes pequeñas del árbol para obtener plantas completas. El Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano realizó una evaluación del uso partes de vitroplántulas de macuelizo para identificar cuales secciones se adaptan al proceso de micropropagación, entre ellas: los ápices meristemáticos, cotiledones, hipocótilos y las hojas verdaderas.

Los ápices meristemáticos demostraron buen establecimiento *in vitro* pues desarrollaron brotes basales y mayor número nudos, material que sirve para la multiplicación masiva. Los cotiledones e hipocótilos presentaron una alta formación de tejido callogénico que se puede utilizar para la fase de inducción morfogénica. Las hojas verdaderas presentaron alto porcentaje de oxidación y no representan un buen explante para el establecimiento *in vitro* de la especie.

---

Lic. Sobeyda Alvarez

## CONTENIDO

	Portada .....	i
	Portadilla .....	ii
	Autoría .....	iii
	Página de firmas .....	iv
	Dedicatoria .....	v
	Agradecimientos .....	vi
	Agradecimientos a patrocinadores .....	vii
	Resumen .....	viii
	Nota de prensa .....	ix
	Contenido .....	x
	Índice de cuadros .....	xv
	Índice de figuras .....	xvii
	Índice de anexos .....	xix
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1	DEFINICION DEL PROBLEMA.....	1
1.2	ANTECEDENTES.....	1
1.3	JUSTIFICACION .....	2
1.4	LIMITES.....	2
1.5	OBJETIVOS .....	2
1.5.1	Generales .....	2
1.5.2	Específicos .....	3
1.5.2.1	Siembra de Semilla Sexual.....	3
1.5.2.2	Apices meristemáticos.....	3
1.5.2.3	Cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas.....	3
<b>2.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
2.1	DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.....	5
2.1.1	Taxonomía.....	5
2.1.2	Botánica.....	5
2.1.3	Distribución y Hábitat.....	5
2.1.4	Usos.....	6
2.1.5	Propagación convencional.....	6

2.2	MICROPROPAGACION DE ESPECIES FORESTALES.....	6
2.2.1	Cultivo de ápices meristemáticos.....	6
2.2.2	Cultivo de callos.....	7
2.2.3	Embriogénesis somática.....	8
2.2.3.1	Embriogénesis somática directa.....	8
2.2.3.2	Embriogénesis somática indirecta.....	8
2.2.4	Organogénesis.....	9
2.2.4.1	Organogénesis directa.....	9
2.2.4.2	Organogénesis indirecta.....	9
2.2.5	Daños biológicos del cultivos .....	9
2.2.5.1	Oxidación .....	9
2.2.5.2	Vitrificación.....	10
3	<b>SIEMBRA <i>IN VITRO</i> DE SEMILLAS SEXUAL DE <i>Tabebuia rosea</i> PARA LA OBTENCION DE VITROPLANTULAS .....</b>	11
3.1	INTRODUCCION .....	11
3.2	MATERIALES Y METODOS .....	11
3.2.1	Localización.....	11
3.2.2	Area de preparación de medios.....	11
3.2.3	Cuarto de transferencias .....	12
3.2.4	Cámara de crecimiento.....	12
3.2.5	Material vegetal.....	12
3.2.6	Desinfección.....	12
3.2.7	Medio de cultivo.....	13
3.2.8	Tomas de datos.....	14
3.3	RESULTADO Y DISCUSION.....	14
3.3.1	Presencia de contaminantes.....	14
3.4	CONCLUSIONES.....	14
3.5	RECOMENDACIONES.....	14
4	<b>EFFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE, METODO DE SIEMBRA Y LA PRESENCIA O AUSENCIA DE CORTE EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i>, INDUCCIÓN CALLOGÉNICA Y MORFOGENETICA DE <i>Tabebuia rosea</i>.....</b>	15
4.1	INTRODUCCION .....	15
4.2	MATERIALES Y METODOS .....	15
4.2.1	Material Vegetal.....	15
4.2.2	Medio de cultivo.....	16

4.2.3	Diseño experimental.....	17
4.2.4	Toma de Datos.....	18
4.2.5	Análisis Estadístico.....	19
4.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
4.3.1	Porcentaje de formación de tejido callogénico (PC).....	19
4.3.2	Porcentaje de oxidación. (PO).....	20
4.3.3	Porcentaje de Vitrificación (PV).....	21
4.4	CONCLUSIONES.....	21
4.5	RECOMENDACIONES.....	22
<b>5</b>	<b>EFECTO DE LA BENCILAMINOPURINA (BAP) EN EL ESTABLECIMIENTO IN VITRO, LA ELONGACION Y LA BROTAÇÃO DE APICES MERISTEMATICOS OBTENIDOS A PARTIR DE VITROPLANTULAS DE <i>Tabebuia rosea</i>.</b> .....	<b>23</b>
5.1	OBJETIVOS.....	23
5.2	MATERIALES Y METODOS .....	23
5.2.1	Material vegetal.....	23
5.2.2	Medio de cultivo.....	23
5.2.3	Diseño experimental.....	24
5.2.4	Toma de Datos.....	24
5.2.5	Análisis Estadístico.....	25
5.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
5.3.1	Elongación de los ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> : Número de nudos por explante (NNE) y altura por explante (APE).....	25
5.3.2	Formación de brotes basales de los ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> : Número de brotes basales por explantes (NBE) y altura por brote (APB).....	26
5.3.3	Porcentaje de oxidación (PO).....	27
5.4	CONCLUSIONES.....	27
5.5	RECOMENDACIONES.....	27
<b>6</b>	<b>EFECTO DEL ACIDO INDOLEBUTIRICO (AIB) EN EL ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE <i>Tabebuia rosea</i>.</b> .....	<b>28</b>
6.1	OBJETIVOS.....	28
6.2	MATERIALES Y METODOS .....	28
6.2.1	Material vegetal.....	28
6.2.2	Medio de cultivo.....	28
6.2.3	Toma de datos.....	28
6.2.4	Análisis de datos.....	29

6.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
6.4	CONCLUSIONES.....	29
6.5	RECOMENDACIONES.....	29
<b>7</b>	<b>EFFECTO DEL ACIDO 2,4DICLOFENOXYACETICO (2,4-D) Y DE LA BENCILAMINOPURINA (BAP) EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i>, INDUCCIÓN CALLOGÉNICA Y MORFOGENETICA DE EXPLANTES COTILEDONARES E HIPOCOTILEDONARES DE <i>Tabebuia rosea</i>.....</b>	<b>30</b>
7.1	OBJETIVOS.....	30
7.2	MATERIALES Y METODOS .....	30
7.2.1	Material vegetal.....	30
7.2.2	Medio de cultivo.....	31
7.2.3	Toma de datos.....	31
7.2.4	Análisis estadístico.....	31
7.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
7.3.1	Porcentaje de formación de tejido callogénico (PC).....	32
7.3.2	Porcentaje de oxidación. (PO).....	35
7.4	CONCLUSIONES.....	36
7.5	RECOMENDACIONES.....	37
<b>8</b>	<b>EFFECTO DEL ACIDO 2,4DICLOROFENOXYACETICO (2,4-D) EN LA MULTIPLICACIÓN DE TEJIDO CALLOGENICO OBTENIDO A PARTIR DE EXPLANTES COTILEDONARES E HIPOCOTILEDONARES DE <i>Tabebuia rosea</i>.....</b>	<b>38</b>
8.1	OBJETIVOS.....	38
8.2	MATERIALES Y METODOS .....	38
8.2.1	Material Vegetal.....	38
8.2.2	Medio de cultivo.....	38
8.2.3	Toma de datos.....	38
8.2.4	Análisis de datos.....	39
8.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
8.3.1	Porcentaje de formación de tejido callogénico (PC).....	39
8.3.2	Porcentaje de oxidación. (PO).....	39
8.4	CONCLUSIONES.....	39
8.5	RECOMENDACIONES.....	39

<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>40</b>
<b>10.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>43</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>45</b>

## INDICE DE CUADROS

### Cuadros

1.	Experimentos realizados para la evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares En el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> . Zamorano, Honduras, 2001.....	4
2.	Composición del medio Knop modificado utilizado en la siembra <i>in vitro</i> de semilla sexual de <i>Tabebuia rosea</i> , para la obtención de plántulas. Zamorano Honduras, 2001.....	13
3.	Composición del medio Murashige y Skoog al 50% macroelementos utilizado para evaluar el efecto de tipo de explante, método de siembra y presencia o ausencia de cortes en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....	17
4.	Tratamientos para la evaluación del efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano,Honduras,2001.....	18
5.	Variables estudiadas para evaluar el efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano,Honduras,2001.....	18
6.	Medio Gamborg B5 utilizado en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	24
7.	Variables estudiadas en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	25
8.	Tratamientos para la evaluación del efecto del 2,4-D y del BAP en el establecimiento <i>in vitro</i> , inducción callogénica y morfogénica de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	31

9. Comparación múltiple de medias de la evaluación del efecto del tipo de explante, nivel de BAP y 2,4-D, en el porcentaje de callo (PC) a los a los 33 días después de siembra (dds) durante el establecimiento *in vitro*, inducción callogénica y morfogénica de explantes cotiledonares y hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001..... 34
10. Tratamientos para evaluación del efecto del 2,4-D en la multiplicación de tejido callogénico procedente de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* (Experimento 3b). Zamorano, Honduras, 2001..... 39

## INDICE DE FIGURAS

Figura		
1.	Efecto de las auxinas y citoquininas en las respuestas morfológica <i>in vitro</i> en tejidos callogénico.....	8
2.	Representación esquemática de los explantes cotiledonares y de hojas verdaderas con presencia de corte (a) y ausencia de corte (b) utilizados para evaluar el efecto del tipo de corte en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....	16
3.	Efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte en el porcentaje de formación de tejido callogénico (PC) a los 22 y 33 días después de siembra (dds) en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....	19
4.	Efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 días después de siembra (dds) en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....	20
5.	Efecto de la interacción entre el tipo de explante y el método de siembra en el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 días de siembra (dds) en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....	21
6.	Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) en el número de nudos por explante (NNE) y en la altura por explante (APE) a los 33 días de siembra (dds) de ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> . (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	25
7.	Número de brotes por explante (NBE) y la altura por brotes (AB) formados a partir de ápices meristemáticos en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> a los 33 dds (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	26
8.	Efecto del BAP y 2,4-D; En el porcentaje promedio de callo (PPC) en los explantes cotiledonares y hipocotiledonares de <i>Tabebuia rosea</i> a los 22 y 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	32

9.	Interacciones entre los factores tipo de explante, BAP y 2,4-D; En la etapa la multiplicación de tejido callogénico e inducción morfológica de explantes cotiledonares e hipocotiledonares a los 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	33
10.	Influencia en el porcentaje de callo (PC) del tipo de explante, tipo y nivel de hormona en el establecimiento in vitro, inducción callogénica y morfológica de <i>Tabebuia rosea</i> a los 22 y 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	35
11.	Interacciones entre los factores tipo de explante, BAP y 2,4-D para la variable porcentaje promedio de oxidación (PPO) en el establecimiento in vitro, inducción callogénica y morfológica para los explantes cotiledonares e hipocotiledonares a los 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	36

## INDICE DE ANEXOS

Anexo		
1.	<p>Lista de siglas utilizadas para las variables en la evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i>. Zamorano, Honduras, 2001.....</p>	45
2.	<p>Vitroplántula a los 60 días de germinada <i>in vitro</i> con los diferentes tipos de explantes utilizados para su establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i>. Zamorano, Honduras, 2001.....</p>	46
3.	<p>Análisis de varianza para la porcentaje de vitrificación (PC) a los 33 dds según el tipo de explantes (cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas) utilizado en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras. 2001.....</p>	47
4.	<p>Análisis de varianza para el porcentaje formación de tejido de callogénico (PC) a los 33 dds en la evaluación del efecto del tipo de explante (cotiledones y hojas verdaderas), método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....</p>	47
5.	<p>Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 dds según el tipo de explante (cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas) en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....</p>	47
6.	<p>Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 dds en la evaluación del efecto del tipo de explante (cotiledones y hojas verdaderas), método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....</p>	48
7.	<p>Análisis de varianza para la porcentaje de vitrificación (PV) a los 33 dds según el tipo de explantes (cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas) utilizado en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....</p>	48
8.	<p>Análisis de varianza para el porcentaje de vitrificación (PV) a los 33 dds en la evaluación del efecto del tipo de explante (cotiledones y hojas verdaderas), método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.....</p>	48

9.	Análisis de varianza para la variable número de nudos por explante (NNE) a los 33 días de siembra (dds) en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	49
10.	Análisis de varianza para la variable altura por explante (APE) a los 33 días de siembra (dds) en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	49
11.	Análisis de Regresión para la variable altura por explante (APE) vrs. El nivel de Bencilaminopurina (BAP) a los 33 dds en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	49
12.	Apice meristemático con brotes basales, a los 32 dds en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> . Zamorano, Honduras, 2001.....	50
13.	Análisis de varianza para el número de brotes basales por explante (NBE) a los 33 días de siembra (dds) en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	50
14.	Análisis de varianza para la variable altura por brote basal (APB) obtenidos a los 33 días después de siembra en la evaluación del efecto de Bencilaminopurina BAP en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.....	50
15.	Análisis de varianza para la variable porcentaje promedio de callo (PC) a los 33dds en la evaluación del efecto de la bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénica <i>in vitro</i> de explantes de cotiledonares e hipocotiledonares de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	51
16.	Explante hipocotiledonar a los 28 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el ácido 2,4diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento <i>in vitro</i> , inducción callogénica y morfogénica de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 3a). Zamorano,	

	Honduras, 2001 .....	51
17.	Explante cotiledonar a los 27 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el ácido 2,4diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	52
18.	Análisis de varianza para la variable porcentaje promedio de oxidación (PO) a los 22dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 Diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénetica <i>in vitro</i> de explantes de cotiledonares e hipocotiledonares de <i>Tabebuia rosea</i> . (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	52
19.	Análisis de varianza para la variable porcentaje de oxidación (PO) a los 33dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 Diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénetica <i>in vitro</i> de explantes de cotiledonares e hipocotiledonares de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.....	53
20.	Tejido callogénico a los 31 dds en la evaluación del efecto del 2,4-D en la mutiplicación de tejido callogénico en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> (Experimento 3b). Zamorano, Honduras, 2001.....	53

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 DEFINICION DEL PROBLEMA

Debido a las actividades de población mundial se han afectado los ciclos naturales del ambiente, esto afecta las tasas de regeneración de las especies en los ecosistemas y provoca problemas de pérdida de especies y degradación de la base genética. Las especies forestales son bastante afectadas por la presión de la población debido a su alto valor económico.

En las áreas tropicales es donde se concentra la mayor biodiversidad y donde mayor población depende de los recursos forestales para obtener bienes y servicios. En estas áreas existen factores sociales, económicos y políticos que han incentivado la explotación de los recursos y se estima una tasa de deforestación de 17 a 20 millones de hectáreas anuales (FAO, 1997).

La capacidad de regeneración natural en árboles es menor que la de otras especies vegetales, debido a que: la madurez reproductiva de los árboles se logra después de periodos largos de tiempo usualmente de 12 años; las semillas presentan problemas de baja viabilidad y latencia; esto se suma a que pocos estudios han sido realizados en métodos vegetativos de propagación.

El presente estudio de cultivo de tejidos se realizará para la especie *Tabebuia rosea* (Bertol) DC, que pertenece a la familia *Bignonaceae* (Orden: *Scrophulariaceae*). La especie tiene su origen en mesoamérica y es catalogada como madera semipreciosa. Esta madera consta de buenas características físicas y de trabajabilidad, y es una madera con gran variedad de usos. Esta especie también es muy conocida por tener una floración color rosado muy llamativa que se concentra en una época del año por lo que se le conoce como "flor de mayo".

### 1.2 ANTECEDENTES

Anteriormente, los procedimientos de propagación de forestales no eran de gran interés comercial como lo era para otras especies alimenticias u ornamentales, pues existía abundancia en individuos y especies, pero actualmente, debido a la alta explotación del bosque, la aplicación de procedimientos y técnicas de micropropagación esta teniendo gran auge en especies forestales.

Según George (1996), en cultivo de tejidos los forestales más estudiados han sido las coníferas de zonas templadas dentro del grupo de las gimnospermas, comparado a las especies de hoja ancha, que tienen gran importancia en los trópicos y de las cuales no hay muchos estudios realizados. En cuanto a *Tabebuia* es un gimnosperma y no se han reportado estudios anteriores en cultivo de tejidos.

El método de propagación convencionalmente usado para forestales ha sido el de brotes adventicios, pero la embriogénesis somática se vislumbra como el método de propagación a futuro para árboles forestales (Bueno y Manzanera, 1992)

### **1.3 JUSTIFICACION**

La importancia de este trabajo radica en que contribuirá a:

- Propagar masivamente de genotipos con buenas características, que pueden ser de interés para la producción de artículos de madera semipreciosa.
- Facilitar el traslado de germoplasma de la especie entre zonas geográficas o entre países.
- Proveer un suministro continuo de plantas en cualquier época del año.
- Contribuir a conservar material vegetal *in vitro*.
- Contribuir de base para continuar estudios en la misma especie.

### **1.4 LIMITES**

En el estudio se evaluó material proveniente de plántulas germinadas *in vitro*. Para la introducción de semillas al laboratorio y su posterior germinación *in vitro* se realizaron pruebas preliminares de desinfección.

Entre los factores que se consideraron para este estudio: tipo de explante, tratamientos al explante, el tipo y la concentración de hormonas en los medios de cultivo.

La micropropagación es una actividad que requiere instalaciones y equipos específicos, también alto uso de mano de obra comparado con la propagación convencional, por lo cual es necesario determinar el costo de su aplicación a las especies para conocer su factibilidad económica.

### **1.5 OBJETIVOS**

#### **1.5.1 Generales**

- Evaluar el uso de ápices meristemáticos en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*.

- Evaluar el uso de explantes cotiledonares, hipocotiledonares y hojas verdaderas procedentes de vitroplántulas en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*.

## **1.5.2 Específicos**

### **1.5.2.1 Siembra de semilla sexual**

- Validar un método de desinfección de semilla genética de *Tabebuia rosea* para su germinación *in vitro* y obtención de vitroplántulas.

### **1.5.2.2 Apices meristemáticos**

- Evaluar el efecto de niveles de la citoquinina BAP en el establecimiento e inducción de brotación en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea*.
- Evaluar la auxina AIB en el enraizamiento de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea*

### **1.5.2.3 Cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas**

- Determinar el tipo de hormona mas apropiado para el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares, hipocotiledonares y de hojas verdaderas procedentes de vitroplántulas de *Tabebuia rosea*.
- Determina los niveles de hormona mas apropiados para el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares, hipocotiledonares y de hojas verdaderas procedentes de vitroplántulas de *Tabebuia rosea*.
- Evaluar la tasa de regeneración según el método de siembra de explantes cotiledonares y de hojas verdaderas.
- Evaluar la tasa de regeneración según la presencia o ausencia de cortes en el tejido para explantes cotiledonares y de hojas verdaderas.
- Evaluar el 2-4,D en la multiplicación *in vitro* de callo de los tratamientos evaluados en la primera etapa.

Para cumplir con los objetivos del estudio fue necesario realizar diferentes experimentos que se presentan estructurados en forma individual (Cuadro 1); al finalizar se dan las conclusiones y recomendaciones generales del estudio.

**Cuadro 1.** Experimentos realizados para la evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*. Zamorano, Honduras, 2001.

No.	Experimento	Material vegetal	Medio	Hormona	Variables
	Siembra <i>in vitro</i> de semilla sexual de <i>Tabebuia rosea</i> para la obtención de vitroplántulas.	Semilla sexual	Knop modificado	---	Contaminación
1	Efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte en el establecimiento <i>in vitro</i> , inducción callogénica y morfogénica de <i>Tabebuia rosea</i> .	Explantes cotiledonares, hipocotiledonares, y de hojas verdaderas	Murashige y Skoog al 50% de macros	BAP (8 µM)	PC, PO, y PV <sup>1</sup>
2a	Efecto de la Becilaminopurina (BAP) en el establecimiento <i>in vitro</i> , la elongación y la brotación de ápices meristemáticos obtenidos a partir de vitroplántulas de <i>Tabebuia rosea</i> .	Apices meristemáticos <sup>2</sup>	Gamborg B5	BAP (0,5,10,15,20 µM)	NNE, APE, NBE, APB <sup>1</sup>
2b	Efecto de ácido indolebutírico (AIB) en el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia rosea</i> .	Regiones apicales y rebrotes de los ápices meristemáticos del 2a.		AIB (3 µM)	
3a	Efecto del ácido 2,4diclorofenoxyacetico (2,4-D) y de la Becilaminopurina (BAP) en el establecimiento <i>in vitro</i> , inducción callogénica y morfogénica de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de <i>Tabebuia rosea</i> .	Explantes cotiledonares e hipocotiledonares <sup>2</sup>		BAP (0,5,10,15 µM) 2,4-D (0, 0.9, 1.8 µM)	PC, PO, y PV <sup>1</sup>
3b	Efecto del ácido 2,4diclofenoxyacetico (2,4-D) en la multiplicación <i>in vitro</i> de tejido callogénico obtenido a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de <i>Tabebuia rosea</i> .	Tejido callogénico del 3a.		2,4-D (0, 2.25, 4.5, 6.75, 9 µM)	

<sup>1</sup> Ver siglas utilizadas (Anexo 1).

<sup>2</sup> Ver foto material vegetal utilizado (Anexo 2).

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 DESCRIPCION DE LA ESPECIE

#### 2.1.1 Taxonomía

Orden: *Scrophulariaceae*

Familia: *Bignonaceae*

Nombre científico: *Tabebuia rosea* (Bertol) DC

Sinónimos: *Tecoma evenia*, *Couralia rosea*, *Tecoma rosea*.

Nombre comercial internacional: Apamate

Nombres comunes: Flor morada (Colombia), guayacán flor rosada, macuelizo (América Central), palo de rosa (México).

La familia *bignonaceae* cuenta con 100 –120 géneros y 650-800 especies, distribuidas en el nuevo continente en su mayor parte. El género más importante es *Tabebuia* con 100 especies todas en los trópicos americanos (Woodland, 1997)

#### 2.1.2 Botánica

Es un árbol de 30 m de altura, con un diámetro de 100 cm que presenta gambas y base acanalada. El fuste es recto y cilíndrico. La corteza es café pálido y tiene fisuras verticales. La copa es redonda y densa. Las hojas digitadas y opuestas. La inflorescencia es atractiva con flores grandes, campanuladas, de color rosado a rosado pálido. La etapa de floración es de diciembre a mayo. El fruto es una cápsula larga, cilíndrica con semillas aladas (Woodland, 1997)

#### 2.1.3 Distribución y hábitat

La especie se caracteriza por adaptarse a una variedad hábitats. Su distribución es desde México hasta el Norte de Sudamérica. Puede hacerse dominante en tierras bajas inundadas, así como en las regiones montañosas con precipitación de 1000 a 1500 mm al año. Se le encuentra hasta los 1200 msnm. Las temperaturas para su desarrollo óptimo oscilan entre 20 y 27 °C (INIA, 1997).

#### 2.1.4 Usos

La especie *Tabebuia rosea*, por ser una de las maderas más importante de Centroamérica, y por su excelente calidad, fue nombrada árbol nacional de la república de El Salvador. Esta especie tiene múltiples propósitos: Construcción, ebanistería, acabado de interiores, construcción de botes y herramientas manuales. También puede usarse como árbol ornamental por su vistosa flor rosada. Hay partes del árbol que se usan como medicina popular, en Costa Rica acostumbran a hervir las flores, hojas y raíces para aliviar efectos de las mordeduras de serpientes y fiebre. En México, la corteza se utiliza contra el cáncer uterino y las úlceras. Existe una droga vegetal conocida como radex, cortex o flos que se obtiene de esta planta (Bernal y Correa, 1989).

#### 2.1.5 Propagación convencional

La especie *Tabebuia rosea* se propaga convencionalmente por semilla, las cuales se deben recolectar directamente de los árboles. También es posible establecer la plantación a través de plántones con raíz y sin hojas (CATIE, 1997). No se han reportado estudios de micropropagación para esta especie.

### 2.2 MICROPROPAGACION DE ESPECIES FORESTALES

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un recipiente donde se puede controlar las condiciones de ambiente y la nutrición (Hartman y Kester, 1997). Tales técnicas y procedimientos no se han podido aplicar con el mismo éxito a las especies leñosas por lo que ha llevado a los investigadores a elucidar el problema (CIAT, 1991).

Según George (1996), las especies de árboles que han sido más estudiadas en cultivo de tejidos son las gimnospermas, en cuanto a número de especies en comparación con las especies de hoja ancha.

Los métodos de micropropagación de especies forestales tradicionalmente empleados son los que usan producción de brotes axilares o adventicios; Esta técnica se deriva de la propagación de plantas herbáceas y no responde a las características de los forestales por tener menor vigor y rebrote. La embriogénesis somática que es en general más productiva, es una técnica prometedora para estos cultivos (Henke *et. al.* 1985). La embriogénesis somática se vislumbra como el método de propagación a futuro para árboles forestales. (Bueno y Manzanera, 1992)

#### 2.2.1 Cultivo de ápices meristemáticos

En este método se aísla un ápice del vástago, a partir del cual se desarrollan las yemas axilares, bajo la influencia de una alta concentración de citoquininas (Pierik, 1987). Se

espera que cada yema axilar pueda separarse y enraizarse. En teoría las ramas axilares pueden producir brotes axilares a perpetuidad.

Los medios nutritivos utilizados para cultivar los ápices meristemáticos varían para cada especie. Pero según George (1996) utilizando este método para especies leñosas se ha encontrado mayor éxito utilizando medios en los cuales el nivel de nitrógeno es  $\frac{1}{4}$  al utilizado en el medio Murashige y Skoog.

En la etapa de establecimiento se combina el uso de citoquininas con auxinas, aunque muchas especies se pueden someter directamente a la etapa de multiplicación donde se usan citoquininas en una alta concentración. Según CIAT (1991), la inducción de sistema radical en angiospermas ha presentado problemas y la tendencia actual es la de enraizar en condiciones no estériles, en sustratos como la agrolita, vermiculita y otros.

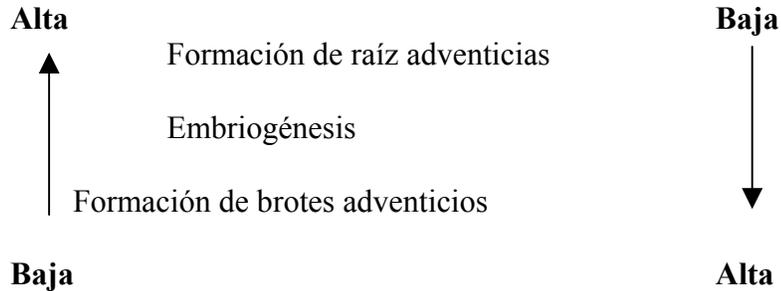
El cultivo de ápices es el método que ha mostrado resultados positivos para la producción masiva de forestales como *Camellia japonica* y *Camellia sasanqua* donde se reportan niveles de 0.5 y 1 mg/L de BAP como los mas adecuados para la etapa de multiplicación y de 1 mg/L de AIB para la etapa de enraizamiento (Samartin, 1990). En *Eucalyptus spp.* se reporta el uso de una concentración de 1 mg/L de BAP para la etapa de multiplicación. El rango de niveles de hormona varia ampliamente dependiendo del cultivo y de la etapa en el proceso (George, 1996).

### 2.2.2 Cultivo de callo

Un callo es básicamente un tejido tumoral, mas o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Para inducir la formación de callo es común la adición de reguladores exógenos de crecimiento y se deben de conocer las exigencias de tipo de regulador, concentración y proporción auxina:citoquinina (Pierik, 1987).

La proliferación de callo se puede comenzar de cualquier órgano vegetal o sus partes. En general, los callos derivados de embriones y plántulas tienen un mayor potencial para la morfogénesis. También es importante el estado fisiológico y la edad de la planta donadora de callo, siendo recomendable utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo. (Hurtado y Merino, 1987)

Un balance entre reguladores de crecimiento auxinas y citoquininas es comúnmente requerido para inducir la diferenciación y morfogénesis en el callo (Figura 1). La interacción es compleja y usualmente hay mas una combinación de dos sustancias da óptimo resultados. (Bhojwani y Razdan, 1983).



**Figura 1.** Efecto de las auxinas y citoquininas en las respuestas morfogénica *in vitro* en tejido callogénico (George, 1993).

### 2.2.3 Embriogénesis Somática

Según Pierik (1987), se definen como embriones somáticos los iniciados a partir de células somáticas o vegetativas y que no son el producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales.

**2.2.3.1 Embriogénesis Directa.** En la embriogénesis directa la formación de embriones somáticos ocurre directamente a partir del explante. Según George (1996) la embriogénesis vía directa es poco común; Se ha empleado para propagación de especie leñosas como *Camellia japonica*, usando como explante los cotiledones de vitroplántulas. En *Quercus spp.* se presenta con el uso de embriones cigóticos inmaduros (Manzanera, 1990). En *quercus suber* se presentó embriogénesis directa, con utilización de explantes de embriones cigóticos usando niveles de 2.3 a 4.5  $\mu\text{M}$  de 2-4,D (Manzanera, 1990).

**2.2.3.2 Embriogénesis Indirecta.** En esta vía de regeneración, primero se induce la formación de tejido callogénico y los embriones somáticos se originan a partir de este. Se necesita de una auxina para la iniciación de callo embriogénico. Usualmente se emplea el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la embriogénesis somática en el callo. La maduración y germinación no ocurre en presencia de 2-4,D por lo que esta debe ser removida o reducida una vez que se ha estimulado la formación de los embriones somáticos. La inducción de embriones se da en condiciones de presencia de nitrógeno reducido (CIAT, 1991).

Según George (1996), el intercambio entre periodos de oscuridad con luz provoca reacciones que favorecen la respuesta a producción de los embriones somáticos en el callo. La hormona mas usada para embriogénesis es el 2-4,D, en niveles aproximados a 12.24  $\mu\text{M}$  para la etapa de inducción y de 2.78  $\mu\text{M}$  para la etapa de germinación.

La embriogénesis indirecta se emplea en la propagación de especies forestales como *quercus robur*, empleando embriones sexuales inmaduros como material inicial. Se usa 2,4-D como regulador exógeno inductor en niveles de 0.5 a 1 mg/L (Bueno y Manzanera, 1992). La especie forestal *quercus robur* presentó embriogénesis somática indirecta en embriones cigóticos inmaduros, lo cual no se observó cuando se usó material maduro. Es

importante la sincronización y la individualización de los embriones para obtener buena germinación (Manzanera, 1990).

En *quercus suber* se reportó embriogénesis indirecta con la iniciación de callo a partir de los explantes hipocotiledonares, utilizando niveles de 2.3 a 4.5  $\mu\text{M}$  de 2-4,D (Manzanera, 1990). Para la especie *quercus suber*, los embriones cigóticos produjeron mayor cantidad de callo a partir de partes del hipocótilo que del cotiledón, aunque los cotiledones también produjeron callo (Bueno, 1992).

## 2.2.4 Organogénesis

La organogénesis comprende el desarrollo de yemas adventicias o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callo. La diferenciación de yemas se da cuando el medio tiene alta relación citoquininas: auxinas, y de raíces cuando esta relación es baja (CIAT, 1991).

**2.2.4.1 Organogénesis Directa.** La organogénesis directa comprende el desarrollo de yemas adventicias o de meristemas radicales directamente a partir de los explantes (CIAT, 1991). Se presenta en la especie forestal *populus tremula* en la cual se indujeron brotes directamente del explante; para la etapa I se utilizó 2,4-D y BAP a una concentración promedio de 3.85  $\mu\text{M}$  y 16.16  $\mu\text{M}$  respectivamente, y para la etapa II se utilizó 2-4,D y BAP a razón de 0.45  $\mu\text{M}$  y 1.3  $\mu\text{M}$  respectivamente (George, 1996).

**2.2.4.2 Organogénesis Indirecta.** La organogénesis indirecta comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de tejido callogénico (CIAT, 1991). Las raíces y los vástagos se forman por lo general de forma completamente independiente unos con respecto a los otros, es decir, no existe conexión entre ellos, aunque se originen a partir de un callo al mismo tiempo (Pierik, 1987).

Esta vía de regeneración se reporta para la especie *Albizia lebbbeck* utilizando explantes de hipocótilos, cotiledones y raíces (George, 1996). En la especie *Drimys winteri* se utiliza como material inicial segmentos de entrenudos de 3 mm, de plantas de invernadero de tres años de edad y se obtienen brotes adventicios a partir de callo (Jordán y Cortes, 1981).

## 2.2.5 Daños biológicos del cultivo

**2.2.5.1 Oxidación.** La oxidación es un fenómeno que produce el oscurecimiento y eventualmente la muerte del explante, siendo un problema común en la propagación *in vitro* (CIAT, 1991). La oxidación ocurre a través de la acción de enzimas que contienen cobre, las cuales están presentes o son sintetizadas en los tejidos vegetales. Estas sustancias al estar en el substrato y en condiciones adecuadas son liberadas. La naturaleza de las sustancias es incierta, pero se sabe que usualmente son combinaciones de compuestos fenólicos complejos (George, 1996).

La oxidación en las primeras etapas del cultivo interfiere con el desarrollo adecuado del explante, por lo que es necesario prevenirla. Hay muchas posibilidades de prevención como: Minimizar el daño causado al explante en la siembra, transferencias frecuentes a un medio fresco, bajar la luminosidad, uso de antioxidantes (George, 1996)

**2.2.5.2 Vitrificación.** Se conoce como la hiperhidratación de los tejidos y esta asociada con altos niveles de citoquininas y con el uso de material joven. La vitrificación es fundamentalmente resultado de un exceso de humedad en el tubo de crecimiento o la utilización de un agente gelatinizador no apropiado (Pierik, 1987). La vitrificación puede prevenirse utilizando un medio de cultivo de potencial osmótico apropiado. Esto se logra manejando los niveles de azúcar, citoquininas y el tipo de agar que se utilice (George, 1996).

### **3. SIEMBRA *IN VITRO* DE SEMILLA SEXUAL DE *Tabebuia rosea* PARA LA OBTENCION DE VITROPLANTULAS**

#### **3.1 OBJETIVOS**

- Validar un método de desinfección de semilla genética de *Tabebuia rosea* para su germinación *in vitro* y obtención de vitroplántulas.
- Obtener vitroplántulas de *Tabebuia rosea* por medio de la germinación de semillas bajo condiciones *in vitro*, para utilizarlas como fuente de material vegetal para el establecimiento de experimentos de propagación *in vitro* por vías directas e indirectas.

#### **3.2 MATERIALES Y METODOS**

##### **3.2.1 Localización**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de Zamorano. El laboratorio cuenta con las diferentes áreas requeridas para realizar estas labores: área de desinfección y preparación de medios de cultivo, cuarto de transferencias y cuarto de crecimiento. Cada una de estas áreas esta equipada con los instrumentos de laboratorio adecuados.

##### **3.2.2 Area de preparación de medios de cultivo**

La preparación de los medios es una de las actividades prioritarias pues el medio de cultivo brinda los factores determinantes directos para la regeneración del tejido vegetal. El uso de instrumentos y cristalería en esta área es amplio. Se utilizaron instrumentos de medición como bikers, balones aforados, pipetas para ajustar la concentración de compuestos químicos y la cantidad de agua destilada a agregar.

Para todos los experimentos, una vez que se preparó el medio de cultivo, se vertió en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con la ayuda de jeringas automáticas dosificadoras, colocando 10 ml por contenedor. Los tubos de ensayo fueron previamente rotulados con el fin de llevar a cabo un registro de datos adecuado.

Para asegurar la inocuidad del medio se esterilizaron los tubos con medio en un autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121°C y presión atmosférica de 1.06 kg/cm<sup>2</sup> o 15 psi. Al salir los tubos del autoclave fueron colocados en refrigeración hasta el momento de siembra.

### **3.2.3 Cuarto de transferencias**

Esta es un área crítica para el establecimiento de cultivos estériles. El tipo de cámara de flujo laminar utilizada fue de flujo horizontal. Al momento de la siembra el personal utilizó vestuario adecuado para evitar ser una fuente de contaminación.

Para desinfectar las cámaras de flujo laminar se utilizó como agente desinfectante alcohol etílico al 70%, que se asperjó sobre toda la superficie del área de trabajo. Para la manipulación de los tejidos se usaron pinzas previamente esterilizadas. Al finalizar cada siembra se colocó la fecha a cada contenedor.

### **3.2.4 Cámara de crecimiento**

La cámara de crecimiento donde se mantienen en incubación todos los cultivos tiene las siguientes condiciones: Temperatura de 24 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 54 μM/m<sup>2</sup>/seg. La estantería es de madera y la fuente de luz es fluorescente del tipo "cool white" ubicada a 1.6 pies (50 cm) de los recipientes de cultivo.

### **3.2.5 Material Vegetal**

Como material vegetal inicial se utilizó semillas sexuales provenientes del banco de germoplasma de ESNACIFOR con un porcentaje de germinación de 93%. Esta semilla se mantuvo en condiciones de refrigeración hasta el momento de la siembra.

### **3.2.6 Desinfección**

Para proceder a la desinfección de las semillas, se les cortó la parte alada para reducir el volumen y la probabilidad de contaminación. Posteriormente se sumergieron 250 semillas en 500 mL de una solución de hipoclorito de calcio Ca(OCl)<sub>2</sub> al 0.5% por 30 minutos. Este tratamiento de desinfección fue utilizado por Espinosa (2001) con muy buenos resultados y concuerda con el citado por Thorpe (1981) para desinfección de semillas. Finalmente, a nivel de la cámara de flujo laminar se realizaron tres enjuagues de 1 minuto cada uno con agua destilada estéril.

### 3.2.7 Medio de Cultivo

La siembra de la semilla se realizó en el medio de cultivo Knop modificado (Cuadro 2) sin la adición de reguladores de crecimiento. Este medio de cultivo brinda el sustrato necesario para la germinación de la semilla y los nutrientes básicos para lograr el desarrollo de la vitroplántula.

**Cuadro 2.** Composición del medio Knop modificado utilizado en la siembra *in vitro* de semilla sexual de *Tabebuia rosea*, para la obtención de plántulas. Zamorano Honduras, 2001.

Componentes	Concentración en el medio de cultivo (mg/L)	Procedimiento
<b>Macroelementos</b>		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	1000.00	Se pesó individualmente en la balanza y se agregó directamente a la solución del medio.
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250.00	
KNO <sub>3</sub>	250.00	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250.00	
<b>Microelementos</b>		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	18.94	Se pesó individualmente en la balanza y se agregó directamente a la solución del medio.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.00	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.50	Se preparó una solución madre con una dilución de 1:1 <sup>1</sup> , y se agregó 0.5 ml/L de medio de cultivo.
<b>Hierro</b>		
FeNaEDTA	50.00	Se preparó solución madre 200X, y se agregó 5 ml/L de medio de cultivo.
<b>Vitaminas</b>		
Tiamina	1.00	Se preparó solución madre con una dilución 1:1, y se agregó 1 ml/L de medio de cultivo.
<b>Otros</b>		
Inositol	100.00	Se pesó individualmente en la balanza y se agregó directamente a la solución del medio.
Sucrosa	10.00	
Phytigel	3.00	
PH = 5.8		

<sup>1</sup> Dilución 1:1 se disuelve 1 mg de compuesto por 1 ml de agua destilada.

Fuente: Mejía Amaya, 1998.

### 3.2.8 Toma de datos

Se evaluó y contabilizó los contaminantes que se manifestaban en la semilla sembrada (hongos y bacterias), así como el período en que los contaminantes se manifestaban. Las semillas se pusieron a germinar bajo las condiciones de la cámara de crecimiento y se mantuvieron bajo esas condiciones hasta que las plántulas cumplieron 60 días de siembra.

## 3.3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.3.1 Presencia de Contaminantes

En total se sembraron *in vitro* 450 semillas sexuales de *Tabebuia rosea*. El 43% de las semillas resultaron contaminadas. El 81% de esta contaminación fue causada por hongos y el 19% restante por la presencia de bacterias.

Se presentó diversidad en los tipos de hongos presente, por el tipo de micelio: blanco en su mayoría, también negro, rosado y verde. Los hongos se manifestaron en su mayoría en los primeros 5 días después de siembra. Las bacterias observadas se presentaron como una coloración rosada en el medio de cultivo, y en su mayoría se manifestaron 10 días después de la siembra.

Los resultados son similares a los obtenidos por Espinosa (2001), en donde utilizó semilla sexual de *Tabebuia guayacan* y la sometió a una concentración de hipoclorito de calcio  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  de 0.35%. Se presentó 37% de contaminación causada por hongos en un 70% y por las bacterias en un 30%.

## 3.4 CONCLUSIONES

- El porcentaje de contaminación provocó reducción del 43% en el número de las vitroplántulas de *Tabebuia rosea*.

## 3.5 RECOMEDACIONES

- Realizar pruebas específicas para desinfección de semillas, con diferentes concentraciones de agentes descontaminantes.
- Identificar los contaminantes y sus posibles fuentes, para reducir la contaminación.

## **4. EFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE, METODO DE SIEMBRA Y LA PRESENCIA O AUSENCIA DE CORTE EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*, INDUCCION CALLOGENICA Y MORFOGENETICA DE *Tabebuia rosea*.**

### **4.1 OBJETIVOS**

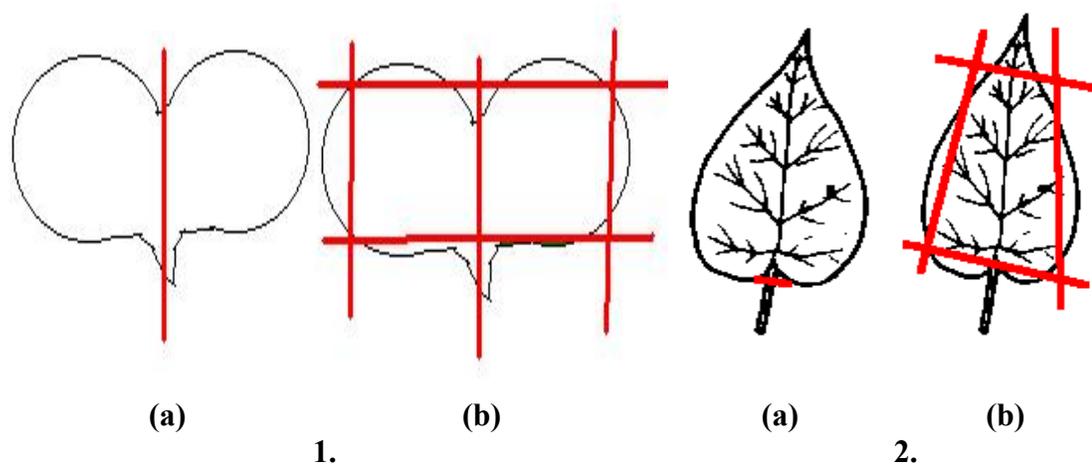
- Evaluar el efecto del tipo de explante (cotiledones, hipocótilos, y de hojas verdaderas) en el establecimiento y la tasa de regeneración *in vitro* de *Tabebuia rosea*.
- Evaluar el efecto del método de siembra (apolar y polar) en explantes cotiledonares y de hojas verdaderas en el establecimiento y la tasa de regeneración *in vitro* de *Tabebuia rosea*.
- Evaluar el efecto de la presencia o ausencia de corte en explantes cotiledonares y de hojas verdaderas en el establecimiento y la tasa de regeneración *in vitro* de *Tabebuia rosea*.

### **4.2 MATERIALES Y METODOS**

#### **4.2.1 Material Vegetal**

A los 60 días después de la siembra (dds), las vitroplántulas que se encontraban en la cuarto de crecimiento obtenidas de la primera siembra de semilla sexual de *Tabebuia rosea*, fueron llevadas a la cámara de flujo laminar. Seguidamente, a nivel de la cámara de flujo laminar, las vitroplántulas fueron extraídas de los tubos de ensayo con la utilización de pinzas; luego se colocaron en platos petri y con la ayuda de un bisturí se disectaron simultáneamente tres tipos de explantes: hipocótilos, cotiledones y hojas verdaderas.

Los hipocótilos se seccionaron en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud. Para evaluar el efecto de la presencia o ausencia de corte, al 50% de los explantes cotiledonares y de hojas verdaderas se les realizó corte y al 50% no se les realizó corte (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática de los explantes cotiledonares 1. y de hojas verdaderas 2. con ausencia (a) y presencia de corte (b) utilizados para evaluar el efecto del realización de corte en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

#### 4.2.2 Medio de cultivo

Los tres tipos de explantes fueron sembrados en un medio Murashigue y Skoog al 50% de macroelementos (Cuadro 3). Se utilizó una concentración de 8  $\mu\text{M}$  (3 mg/L) de BAP.

Los hipocótilos se colocaron en forma horizontal en el medio de cultivo. Para evaluar el efecto del método de siembra, el 50% de los explantes cotiledonares y de hojas verdaderas se les sembraron con el envés en contacto con el medio de cultivo (apolar) y el 50% con el haz en contacto con el medio de cultivo (polar).

**Cuadro 3.** Composición del medio Murashige y Skoog al 50% macroelementos utilizado para evaluar el efecto de tipo de explante, método de siembra y presencia o ausencia de corte en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Componentes	Concentración (mg/L)		ml/L de medio de cultivo
	Medio de cultivo	Solución madre	
<b>Macroelementos</b>	<b>10X</b>		100.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825.00	8,250.00	
KNO <sub>3</sub>	950.00	9,500.00	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220.00	2,200.00	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185.00	1,850.00	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85.00	850.00	
<b>Micronutrientes</b>	<b>1000X</b>		1.0
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90	16,900.00	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60	8,600.00	
KI	0.83	830.00	
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	250.00	
CuSO <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	25.00	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	25.00	
<b>Solución de Hierro</b>	<b>200X</b>		5.0
FeNaEDTA	50.000	10,000.000	
<b>Vitaminas</b>	<b>Dilución</b>		0.5 0.5 0.4
Acido Nicotínico	0.50	1:1	
Piridoxina HCl	0.50	1:1	
Tiamina	0.40	1:1	
<b>Otros</b>	<b>Procedimiento</b>		
Inositol	100.000	Se pesaron individualmente en la balanza y se agregaron directamente a la solución.	
Sucrosa	30000.000		
Agargel	4.800		
PH = 5.8			

Fuente: Mejía Amaya, 1998.

#### 4.2.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completo al azar, con arreglo factorial incompleto. Este experimento consta de tres tipos de explantes: hipocótilos, cotiledones y hojas verdaderas. Y para los cotiledones y hojas verdaderas se evaluó: el método de siembra y la presencia o ausencia de corte (Cuadro 4) para un total de 9 tratamientos.

Debido al poco material vegetal disponible de cotiledones y hojas verdaderas, el número de repeticiones por tratamiento fue desigual: 40 de hipocótilos (un tratamiento), 80 de cotiledones (cuatro tratamientos) y 60 de hojas verdaderas (cuatro tratamientos). El total de unidades experimentales fue de 180.

**Cuadro 4.** Tratamientos para la evaluación del efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Explante	Siembra			
	Polar		Apolar	
	Sin corte	Con corte	Sin corte	Con corte
<b>Hojas verdaderas</b>	T1	T2	T3	T4
<b>Cotiledones</b>	T5	T6	T7	T8
<b>Hipocótilos</b>				T9

En el caso de los hipocótilos fueron colocados en forma horizontal en el medio de cultivo y no se les realizó corte. Los hipocótilos no tienen influencia al calcular el efecto de presencia o ausencia de corte y del método de siembra.

En el método de siembra polar se coloca el explante de hoja o cotiledón con el envés en contacto directo con el medio. En contraste, la siembra apolar se refiere a la colocación del haz en contacto directo con el medio de cultivo. La realización de corte en los explantes (Figura 2) se realiza con la hipótesis que el tejido con corte tendrá mejor respuesta regenerativa y más rápida que el que no tiene corte.

#### 4.2.4 Tomas de datos

Para las variables estudiadas (Cuadro 5) las tomas de datos se realizaron a los 22 y 33 dds. Los explantes se mantuvieron en el cuarto de crecimiento por un período de 40 días.

**Cuadro 5.** Variables estudiadas para evaluar el efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Variable	Unidad de medición
Callogénesis <sup>1</sup>	
Categorías:	Ausencia (0)
	25%(1)
	50%(2)
	75%(3)
	100%(4)
	Explantes por categoría
Oxidación <sup>2</sup>	
Categorías:	Ausencia (0)
	Presencia (1)
	Explantes por categoría
Vitrificación <sup>3</sup>	
Categorías:	Ausencia (0)
	Presencia (1)
	Explantes por categoría

<sup>1</sup> Porcentaje de callogénesis en relación al tamaño del explante.

<sup>2</sup> se observó el oscurecimiento en el medio de cultivo y la senescencia en los tejidos vegetales.

<sup>3</sup> se observó la hiperhidratación del tejido en base del aumento de tamaño en los explantes.

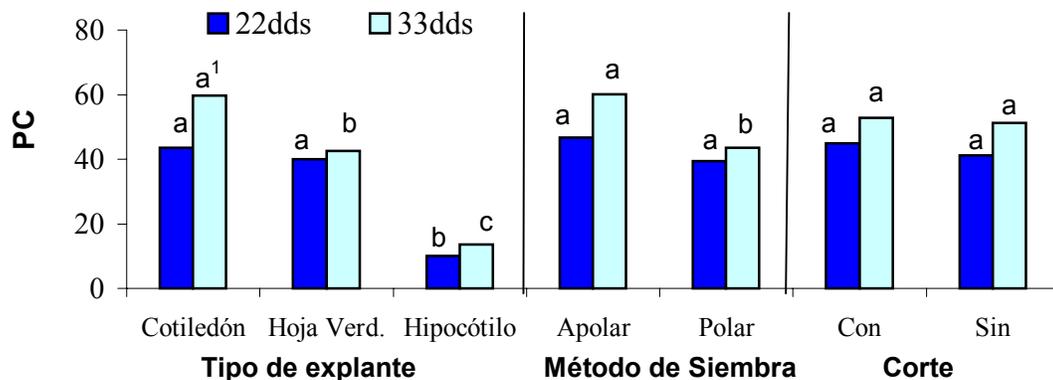
#### 4.2.5 Análisis estadístico

A los datos se analizaron con un ANDEVA con tres criterios de clasificación que fueron: tipo de explante, polaridad en la siembra, realización de corte. Se midió los efectos de interacción entre los factores. Se aplicó prueba de separación de medias por Tukey con alpha de 0.05.

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.3.1 Porcentaje de formación de tejido calogénico (PC)

Se cuantificó la formación de tejido calogénico en forma de porcentaje (PC), mismo que varió en forma significativa según los tratamientos aplicados. Los datos fueron tomados en dos períodos: a los 22 y 33 dds. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza para conocer los efectos de los factores principales que fueron: tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte (Figura 3).



<sup>1</sup>Letras iguales de una misma fecha, no hay diferencia. Tukey  $P < 0.05$ .

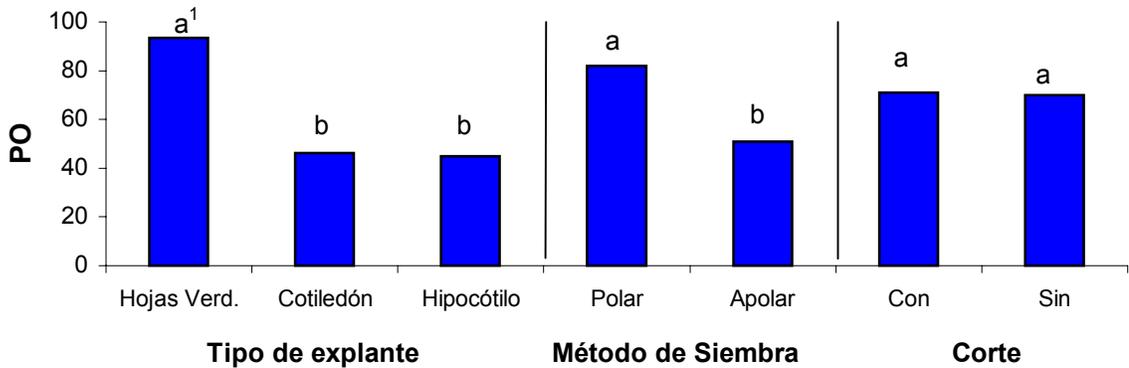
**Figura 3.** Efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte en el porcentaje de formación de tejido calogénico (PC) a los 22 y 33 días después de siembra (dds) en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*. (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Durante la primera etapa de establecimiento *in vitro*, a los 22 dds no se observó diferencia para las variables método de siembra y la presencia o ausencia de corte, pero si para tipo de explante. (Figura 3). Los resultados del análisis a los 33 dds muestran que se presentó diferencias  $P < 0.001$  (Anexo 3 y Anexo 4) para el tipo explante y el método de siembra. En promedio, los cotiledones presentaron 60% de callo, las hojas verdaderas 42.5% y los hipocótilos 12.5%. La siembra apolar y polar presentaron 59% y 42.5% de callo respectivamente (Figura 3). A los 33 dds no hubo diferencias en el porcentaje de calogénesis observado en los explantes entre la presencia o ausencia de corte. No existió interacción significativa entre las tres fuentes de variación.

Se presentó un mayor valor de PC (71%) en el tratamiento de cotiledones en combinación con siembra apolar y sin presencia de corte, aunque estadísticamente no fue diferente del tratamiento con la presencia de corte y misma combinación de los otros factores (69%). Los hipocótilos presentaron el menor valor de PC (12.5%).

### 4.3.2 Porcentaje de oxidación (PO)

En promedio, para todos los tratamientos el PO a los 33 dds fue de 64%. El tipo de explante que presentó mayor PO fueron las hojas verdaderas con 93% (Figura 4). El valor de las hojas verdaderas fue mas del doble de la presentada por los explantes de hipocótilos y cotiledones con 40%, esa diferencia fue real ( $P < 0.001$ ) (Anexo 5).



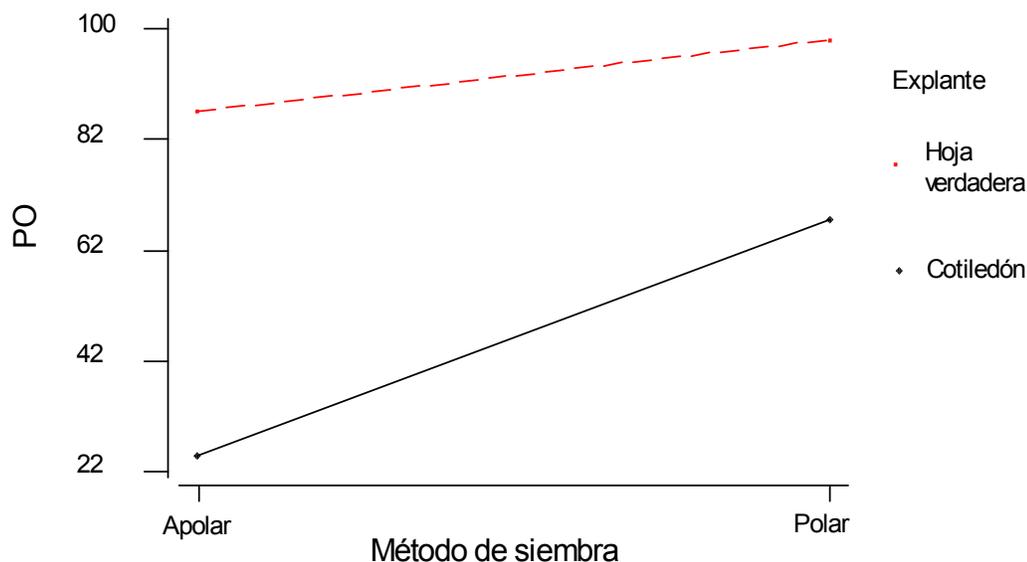
<sup>1</sup>Letras iguales no hay diferencia. Tukey  $P < 0.05$ .

**Figura 4.** Efecto del tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte en el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 días después de siembra (dds) en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

El método de siembra influyó en el PO y en forma significativa. A los 33 dds, se presentó un mayor PO en la siembra polar (81%) que en la siembra apolar (53%). La presencia o ausencia de corte no influyó en el PO (Anexo 6).

Los tratamientos en que se observaron los mayor PO fueron en los de hojas verdaderas, con siembra polar, sin diferenciarse entre presencia o ausencia de corte. Aunque estos dos tratamientos anteriores no se diferenciaron de los tratamientos de hojas verdaderas con siembra apolar y el de cotiledones con siembra polar y presencia de corte.

Para la variable PO se presentó interacción ( $P = 0.023$ ) entre el tipo de explante y el método de siembra (Figura 5). Según lo observado cuando se utiliza siembra polar con cotiledones es mayor el incremento de PO que en las hojas verdaderas.



**Figura 5.** Efecto de la interacción entre el tipo de explante y el método de siembra en el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 días de siembra (dds) en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

#### 4.3.3 Porcentaje de vitrificación (PV)

Según los datos observados, el PV no fue afectado por el factor tipo de explante (Anexo 7), tampoco por los factores método de siembra y la presencia o ausencia de corte (Anexo 8). En promedio fue del PV fue de 47%. Los dos tratamientos de cotiledones con siembra apolar presentaron mayor valor de PV (60%).

#### 4.4 CONCLUSIONES

- Los cotiledones sembrados en forma apolar presentaron el valor mas alto en formación de tejido callogénico.
- La presencia o ausencia de corte no influyó significativamente en la variables observadas: formación de callogénesis, presencia de oxidación y vitrificación.
- Las hojas verdaderas presentaron el valor mas alto de porcentaje de oxidación.
- La siembra polar se relacionó con un aumento de oxidación en los tejidos utilizados.
- El tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de corte no mostraron efecto en la presencia de vitrificación.

- Para las condiciones del ensayo, los hipocótilos presentaron la menor formación de tejido callogénico.

#### **4.5 RECOMENDACIONES**

- Se recomienda utilizar los cotiledones como tipo de explante para la inducción callogénica inicial en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*.
- Utilizar siembra apolar para los cotiledones pues favorece la formación de tejido callogénico, a la vez que se reduce la oxidación.
- No realizar corte a los cotiledones, pues esto no influye en el buen establecimiento *in vitro* de los explantes.
- Buscar alternativas para reducir la oxidación, especialmente si se utilizan hojas verdaderas.

## **5. EFECTO DE LA BENCILAMINOPURINA (BAP) EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*, LA ELONGACION Y LA BROTAION DE APICES MERISTEMATICOS OBTENIDOS A PARTIR DE VITROPLÁNTULAS DE *Tabebuia rosea*.**

### **5.1 OBJETIVOS**

Evaluar cinco niveles de la citoquinina BAP en el establecimiento, elongación e inducción de brotación *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea*

### **5.2 MATERIALES Y METODOS**

#### **5.2.1 Material Vegetal**

Se utilizaron ápices meristemáticos procedentes de vitroplántulas de 60 días de germinadas *in vitro*. La disección de los ápices se llevó a cabo a nivel de una cámara de flujo laminar. Luego de la disección, se procedió a sembrar los ápices en un medio de cultivo Gamborg B5 para su establecimiento *in vitro*, elongación y brotación basal.

#### **5.2.2 Medio de Cultivo**

Los ápices meristemáticos se sembraron en un medio Gamborg B5 (Cuadro 6) conteniendo la citoquinina BAP en cinco niveles: 0, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{M}$  (0, 1.125, 2.250, 3.375, 4.500 mg/L).

**Cuadro 6.** Medio Gamborg B5 utilizado en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Componentes	Concentración (mg/L)		ml/L de medio de cultivo
	Medio de cultivo	Solución madre	
<b>Macronutrientes</b>		<b>10X</b>	
KNO <sub>3</sub>	2,500.000	25,000.000	100.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250.000	2,500.000	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150.000	1,500.000	
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	150.000	1,500.000	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134.000	1,340.000	
<b>Micronutrientes</b>		<b>100X</b>	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10.000	1,000.000	1.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.000	300.000	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.000	200.000	
KI	0.750	75.000	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	25.000	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5000	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5000	
<b>Solución de Hierro</b>		<b>200X</b>	
FeNaEDTA	50.000	10,000.000	5.0
<b>Vitaminas</b>		<b>Dilución</b>	
Acido Nicotínico	1.000	1:1	1.0
Piridoxina	1.000	1:1	1.0
Tiamina	10.000	1:1	1.0
<b>Otros</b>		<b>Procedimiento</b>	
Inositol	100.000	Se pesaron individualmente en la balanza y se agregaron directamente a la solución.	
Sucrosa	30000.000		
Agargel	4.800		
PH = 5.8			

Fuente: George, 1996.

### 5.2.3 Diseño Experimental

El diseño experimental fue completo al azar. Este experimento consta de 5 niveles de BAP para un total de cinco tratamientos. Cada tratamiento consta de 30 unidades experimentales para un total de 150 unidades experimentales.

### 5.2.4 Toma de Datos

Las tomas de datos (Cuadro 7) se realizaron a los 22 y 33 dds. Los ápices permanecieron en este medio un total de 43 días.

**Cuadro 7.** Variables estudiadas en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Variable	Unidad de medición
Altura <sup>1</sup>	cm de altura / explante
Nudos	No de nudos / explante
Brotos basales	No de Brotes basales / explante
Oxidación <sup>2</sup>	
Categorías: Ausencia (0)	No de explantes por cada categoría
Presencia (1)	

<sup>1</sup> con el uso de una regla se midió la altura de los ápices desde la superficie del medio de cultivo hasta la yema apical.

<sup>2</sup> se observó el oscurecimiento en el medio de cultivo y la senescencia de los tejidos vegetales.

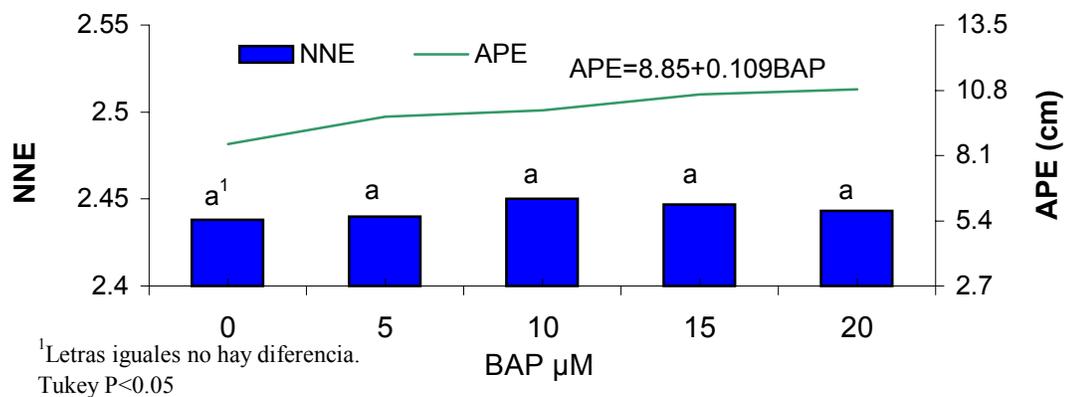
### 5.2.5 Análisis Estadístico

Los análisis efectuados fueron ANDEVA donde se dividió en dos fuentes de variación: la provocada por el nivel de BAP y por las unidades experimentales. Para conocer el tratamiento con mejor respuesta se utilizó la prueba Tukey de separación de medias con alpha de 0.05 y se evaluó el ajuste a una curva de respuesta por medio de un análisis de regresión.

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.3.2 Elongación de los ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea*: Número de nudos por explante (NNE) y altura por explante (APE)

Los ápices meristemáticos sometidos a concentraciones de BAP mostraron elongación en dos formas: por incremento en el número de nudos y por incremento en la altura (Figura 6).

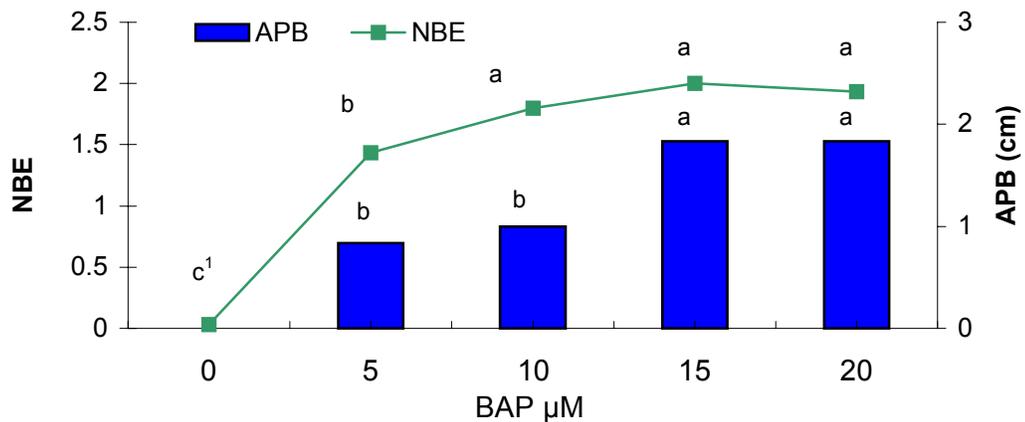


**Figura 6.** Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) en el número de nudos por explante (NNE) y en la altura por explante (APE) a los 33 días de siembra (dds) de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Los niveles de BAP utilizados en los tratamientos no provocaron incremento en el NNE a los 33 dds (Anexo 9). La APE aumentó según se incremento el nivel de la citoquinina BAP en el medio de cultivo. Esta diferencia para incremento en altura fue significativa (Anexo 10). Con los niveles utilizados en el ensayo el valor de APE esta dado por  $APE = 8.85 + 0.109 \text{ BAP}$  ( $R^2=.82$ ) (Anexo 11).

### 5.3.2 Formación de brotes basales en ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea*: Número de brotes por explante (NBE) y altura de los brotes (APB).

El número de brotes por explante (NBE) (Anexo 12) y la altura por brote (APB) varían según el nivel de hormona utilizada  $P<0.001$  (Anexo 13). La relación entre el nivel de hormona y la brotación fue directa positiva, pues un incremento del contenido de hormona en el medio de cultivo se tradujo en un incremento en el NBE a los 33 dds (Figura 7).



<sup>1</sup>Letras iguales no hay diferencia. Tukey  $P<0.05$

**Figura 7.** Número de brotes por explante (NBE) y la altura por brotes (APB) formados a partir de ápices meristemáticos en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* a los 33 dds (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Para conocer cual tratamiento específico fue el que presentó mayor NBE se realizó la prueba de comparación de medias. Se obtuvo que el tratamiento con mayor NBE fue el de 15 µM de BAP, con un promedio de 1.97 brotes, aunque este tratamiento no se diferenció en forma significativa de los niveles 10 y 20 µM ( $P>0.1$ ), pero si se diferenció de los dos tratamientos con los niveles bajos (Figura 7).

El nivel de BAP en el medio de cultivo también influyó en la APB ( $P<0.01$ ) (Anexo 14). Los brotes obtenidos a niveles de 15 y 20 µM de BAP fueron muy alargados (2 cm) y débiles, y no desarrollaron brotes nuevos. En las concentraciones de 5 y 10 µM de BAP se obtuvieron brotes de altura adecuada (0.9 cm) (Figura 7).

En otras observaciones realizadas para los ápices meristemáticos, se observó que en la concentración más alta de BAP (20  $\mu\text{M}$ ) hubo poco desarrollo foliar en comparación a niveles más bajos, esto puede ser un síntoma visual de toxicidad por el alto nivel de hormona utilizado.

### **5.3.3 Presencia de oxidación**

El porcentaje de oxidación para los tratamientos fue de 12% a los 33 dds y se distribuyó en forma aleatoria entre todos los tratamientos. La oxidación se manifiesta en mayor porcentaje con relación al tiempo en que permanecen los explantes en el medio de cultivo.

## **5.4 CONCLUSIONES**

- El BAP mostró efecto para el aumento de altura de los ápices meristemáticos (APE), pero no presentó efecto en el número de nudos que se desarrollaron por ápice meristemático (NNE).
- En el establecimiento de los ápices meristemáticos la concentración donde se desarrolló un mayor número de brotes por explante (NBE) y una altura adecuada de brotes fue la de 10  $\mu\text{M}$  de BAP.
- La oxidación tiene tendencia a incrementar con relación al incremento del período entre subcultivos.

## **5.5 RECOMENDACIONES**

- Para obtener una mayor altura por ápices meristemático (APE) se recomienda utilizar 20  $\mu\text{M}$  de BAP.
- Para obtener un mayor número de brotes por explante (NBE) y con una altura adecuada por brote (APB) se recomienda utilizar 10  $\mu\text{M}$  de BAP.
- Para disminuir la incidencia de oxidación se recomienda la transferencia de las porciones apicales y brotes basales a medio fresco con BAP antes de 35 dds.

## **6. EFECTO DEL ACIDO INDOLEBUTIRICO (AIB) EN EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *Tabebuia rosea*.**

### **6.1 OBJETIVOS**

Evaluar la auxina ácido indolebutírico (AIB) a un nivel de 15  $\mu\text{M}$  en el enraizamiento *in vitro* de porciones apicales y brotes producidos a partir de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea*.

### **6.2 MATERIALES Y METODOS**

#### **6.2.1 Material vegetal**

Se utilizaron las porciones apicales y los rebrotes basales de los ápices meristemáticos procedentes del experimento 2a, se transfirieron a un medio de cultivo Gamborg B5 con contenido de AIB para promover la formación de raíces.

#### **6.2.2 Medio de cultivo**

El material vegetal se sembró en un medio Gamborg B5 (Cuadro 6) con la adición de AIB a razón de 15  $\mu\text{M}$  (3 mg/L).

#### **6.2.3 Toma de datos**

Para esta evaluación se utilizaron 30 unidades experimentales. Se efectuaron observaciones sobre la formación de sistema radical en los ápices meristemáticos transferidos del material vegetal, la variable fue número de raicillas observadas.

#### 6.2.4 Análisis Estadístico

En este experimento se evaluó la capacidad de la hormona AIB al nivel de 15  $\mu\text{M}$  para enraizamiento de las porciones apicales y los rebrotes basales de los ápices meristemáticos utilizados en el experimento 2a. El modelo estadístico utilizado fue completo al azar. Se realizó descripción de los resultados observados y se efectuó un análisis comparativo.

### 6.3 RESULTADOS Y DISCUSION

En la etapa de enraizamiento *in vitro* de los explantes, la formación de sistema radical en los vástagos fue deficiente y más bien se presentó callogénesis en la parte basal del explante. No se estimuló la diferenciación radical en los explantes.

Estos resultados concuerdan con CIAT (1991) donde se menciona que la inducción de sistema radical en forestales, y en general en angiospermas, ha presentado problemas, así que la tendencia actual es la de enraizar preferiblemente bajo condiciones no estériles.

### 6.4 CONCLUSIONES

- Para el enraizamiento *in vitro* de las porciones apicales y los rebrotes basales de los ápices meristemáticos, el uso de AIB a una concentración de 15  $\mu\text{M}$  no fue adecuada para la estimulación de sistema radical y más bien estimuló la formación de tejido calloso en la base de los explantes.

### 6.5 RECOMENDACIONES

- Probar el uso de mayores niveles de AIB para estimular el enraizamiento *in vitro* de las porciones apicales y los rebrotes basales de los ápices meristemáticos.
- Probar otros tipos de auxina a diferentes niveles para enraizar *in vitro* las porciones apicales y los rebrotes basales de los ápices meristemáticos.
- Siembra de las porciones apicales y los rebrotes basales en condiciones *ex vitro*, no estériles, para inducir la formación de raíces.

## **7. EFECTO DEL ACIDO 2,4DICLOFENOXYACETICO (2,4-D) Y DE LA BENCILAMINOPURINA (BAP) EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*, INDUCCIÓN CALLOGÉNICA Y MORFOGENETICA DE EXPLANTES COTILEDONARES E HIPOCOTILEDONARES DE *Tabebuia rosea*.**

### **7.1 INTRODUCCION**

#### **7.1.1 Objetivos**

- Determinar el tipo de hormona más apropiado para el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea*.
- Determinar los niveles de hormona más apropiados para el establecimiento *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea*.
- Determinar el tipo de hormona más apropiado para la inducción callogénica y morfogénica de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea*.
- Determinar los niveles de hormona más apropiados para la inducción callogénica y morfogénica de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea*.
- Evaluar la tasa de regeneración *in vitro* según el tipo de explante utilizado.

### **7.2 MATERIALES Y METODOS**

#### **7.2.1 Material Vegetal**

En el presente experimento se efectuaron siembra de explantes cotiledonares e hipocotiledonares disectados de vitroplántulas de *Tabebuia rosea* con una edad de 60 días, que son las mismas plantas utilizadas en el experimento 2a, donde se utilizaron los ápices meristemáticos.

La siembra de los explantes cotiledonares fue apolar y sin presencia de corte de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en el experimento 1 en cuanto a formación de tejido callogénico.

### 7.2.2 Medio de Cultivo

En este experimento se utilizó el medio Gamborg B5 (Cuadro 6) donde se evaluaron los dos tipos de explantes (cotiledonares e hipocotiledonares) con uso de cuatro niveles de BAP (0, 5, 10, 15  $\mu\text{M}$  ó 0, 1.13, 2.25, 3.38 mg/L) y tres niveles de 2-4,D (0, 0.9, 1.8  $\mu\text{M}$  ó 0, 2, 4 mg/L). Esta combinación de los tres factores nos brinda un total de 24 tratamientos (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Tratamientos para la evaluación del efecto del 2,4-D y del BAP en el establecimiento *in vitro*, inducción callogénica y morfogenética de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

Explante	2-4,D ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )			
		0	5	10	15
Hipocotilo	0.0	T1	T4	T7	T10
	0.9	T2	T5	T8	T11
	1.8	T3	T6	T9	T12
Cotiledón	0.0	T13	T16	T19	T22
	0.9	T14	T17	T20	T23
	1.8	T15	T18	T21	T24

### 7.2.3 Toma de datos

Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial con un diseño en completo al azar. Se realizaron 3 réplicas con un total de 24 tratamientos (Cuadro 8). Cada tratamiento tuvo 30 unidades experimentales para un total de 720 unidades experimentales.

Se tomaron datos de: porcentaje de callogénesis, presencia de oxidación y vitrificación (Cuadro 5). Las tomas de datos se realizaron a los días 22 y 33 dds. En total los explantes permanecieron en el medio de cultivo por 35 días.

### 7.2.4 Análisis estadístico

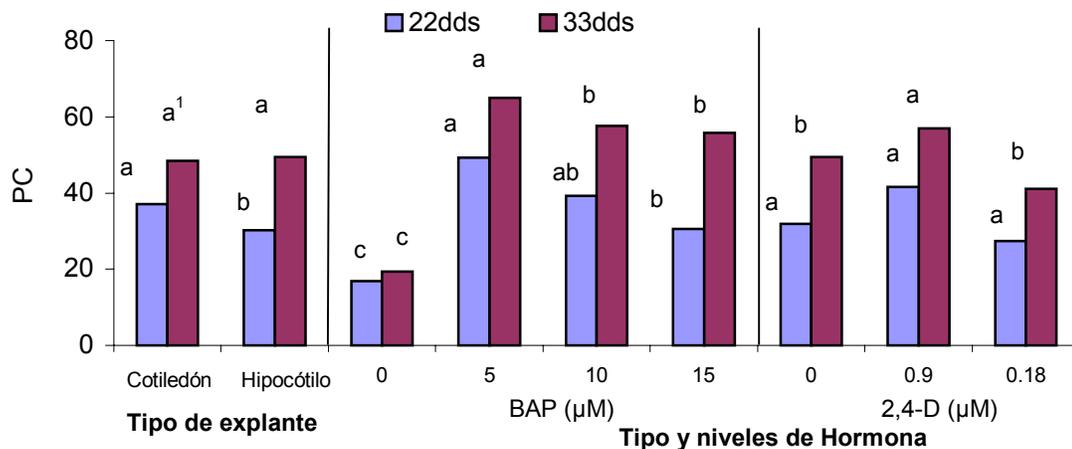
A estos datos se les realizó un ANDEVA con tres criterios de clasificación (explante, BAP, 2,4-D) con evaluación de las interacciones. El arreglo fue factorial completo. Para la comparación de los tratamientos se realizó la separación de medias con la Prueba Duncan con alpha de 0.05.

## 7.3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.3.1 Porcentaje de Formación de Tejido Calogénico (PC)

El PC varió según el tratamiento aplicado utilizado. En general, el tipo de explante utilizado no fue fuente de variación ( $P=0.43$ ) en el PC a los 33 dds. Los niveles y los tipos de hormonas utilizados fueron los causantes de variación ( $P<0.001$ ) en el valor de PC (Anexo 15).

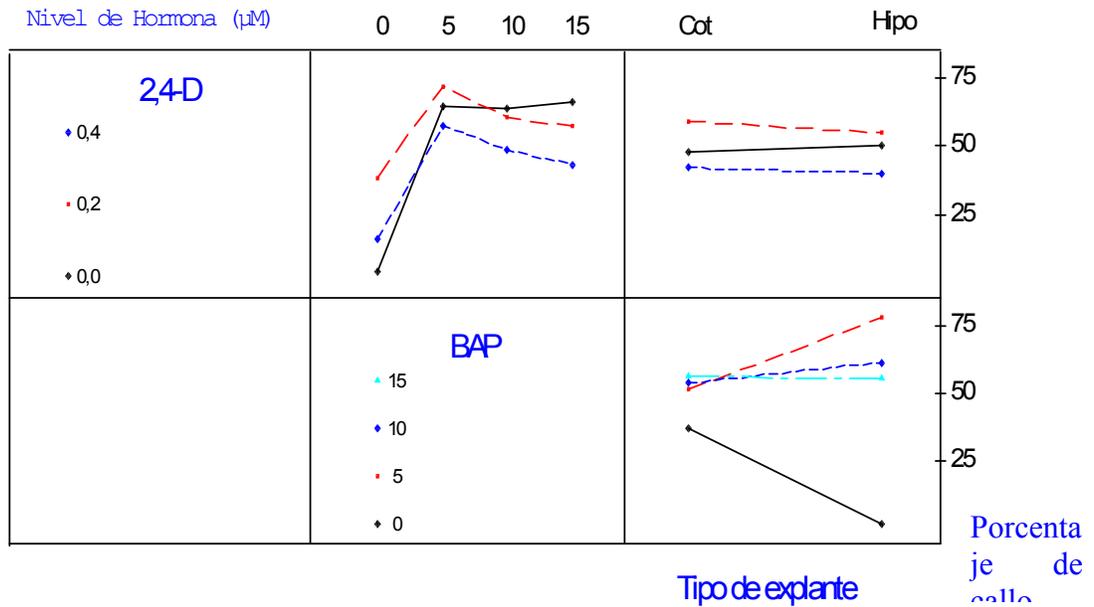
A los 33 dds, se obtuvo el mayor PC (57%) con  $0.9 \mu\text{M}$  de 2,4-D valor que fue diferente a los demás niveles en forma altamente real (Figura 8, Anexo 15). Igualmente a esta fecha se observó que con  $5 \mu\text{M}$  de BAP se presentó el valor mas alto de PC (65%), que fue diferente en forma real a los demás niveles de citoquinina. El uso de niveles mayores a  $5 \mu\text{M}$  de BAP tuvo como consecuencia la disminución del PC (Figura 8).



<sup>1</sup>letras iguales de una misma fecha, no hay diferencia. Tukey  $P<0.05$

**Figura 8.** Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de callo (PC) en explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* a los 22 y 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

Para el PC, se presentaron interacciones significativas  $P<0.001$  entre tipo de explante\*BAP, y entre los dos tipos de hormonas (Anexo 15). La interpretación de las interacciones se puede hacer gráficamente, analizando cada nivel de una variable con respecto a la otra, y se debe observar el tipo de relación, es decir, de sinergismo, sin interacción, o negativa (Figura 9).



**Figura 9.** Interacciones entre los factores tipo de explante, BAP y 2,4-D, en la etapa de multiplicación de tejido callogénico e inducción morfogénica de explantes cotiledonares e hipocotiledonares a los 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

Para conocer el tratamiento con el mayor PC de los 24 utilizados, fue necesaria una prueba de separación de medias por prueba Duncan con alpha de 0.05. El rango de PC para los tratamientos fue desde casi 0 % hasta 96% (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Comparación múltiple de medias del efecto del tipo de explante, nivel de BAP y 2,4-D, en el porcentaje de callo (PC) a los 33 días después de siembra (dds) durante el establecimiento *in vitro*, inducción callogénica y morfogénica de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* (Experimento 3a), Zamorano, Honduras, 2001.

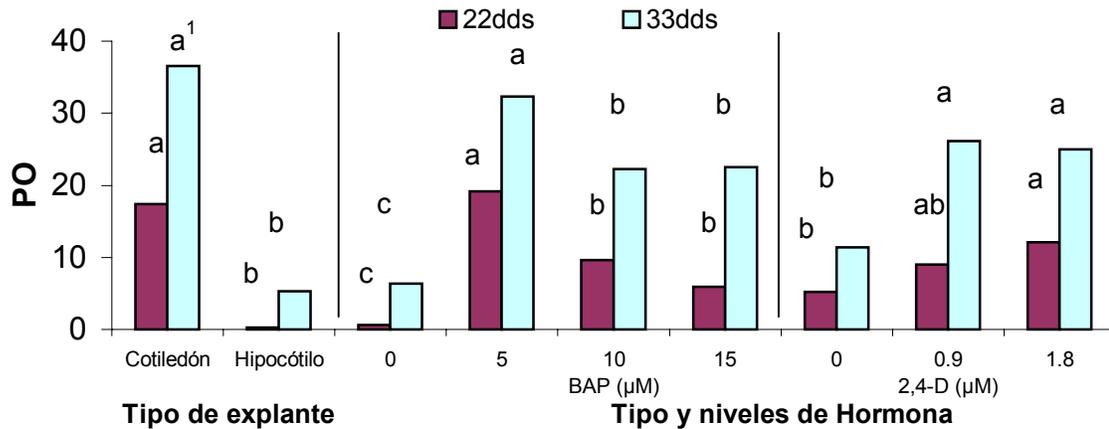
<b>Tipo de Explante</b>	<b>Nivel de BAP (μM)</b>	<b>Nivel de 2,4-D (μM)</b>	<b>PC (%)</b>	<b>Grupo Duncan α=0.05</b>
Hipocótilo	5	0,9	96,3	a <sup>1</sup>
Cotiledón	0	0,9	81,5	b
Hipocótilo	10	0,9	76,0	bc
Hipocótilo	5	1,8	71,3	cd
Cotiledón	10	0	67,6	cde
Hipocótilo	5	0	67,5	cde
Cotiledón	15	0	66,4	de
Hipocótilo	15	0	66,0	de
Cotiledón	5	0	61,6	ef
Cotiledón	15	0,9	60,6	ef
Hipocótilo	10	0	60,0	ef
Hipocótilo	15	0,9	54,2	fg
Cotiledón	5	0,9	49,1	gh
Cotiledón	10	0,9	46,4	gh
Cotiledón	10	1,8	48,3	gh
Hipocótilo	10	1,8	49,0	gh
Cotiledón	0	1,8	33,0	h
Cotiledón	5	1,8	44,6	h
Cotiledón	15	1,8	42,0	h
Hipocótilo	15	1,8	44,4	h
Hipocótilo	0	0	6,2	i
Cotiledón	0	0	1,7	j
Hipocótilo	0	0,9	0,0	j
Hipocótilo	0	1,8	0,0	j

<sup>1</sup>Letras iguales no hay diferencias.

El tratamiento que presentó el mayor PC fue el de hipocótilo (Anexo 16) con 5 μM BAP y 0.9 μM de 2,4-D. Este tratamiento se diferenció en forma real de los demás, y tuvo un PC de 96% a los 33 dds en el medio de cultivo. El tratamiento de cotiledones (Anexo 17) sin BAP y con nivel de 0.9 μM de 2,4-D fue el segundo tratamiento con mayor PC (81%) y no fue diferente del tratamiento de hipocótilo con 10 μM de BAP y 0.9 μM de 2,4-D (Cuadro 9).

### 7.3.2 Porcentaje de oxidación (PO)

La oxidación se midió en forma de porcentaje a los 22 y 33 dds para cada uno de los tratamientos. A los tres factores de comparación (BAP, 2,4-D, Explante) de esta etapa se les midió su influencia individual en el PO (Figura 10), así como también la influencia combinada o interacciones.



<sup>1</sup>Letras iguales de una misma fecha, no hay diferencia. Tukey  $P < 0.05$ .

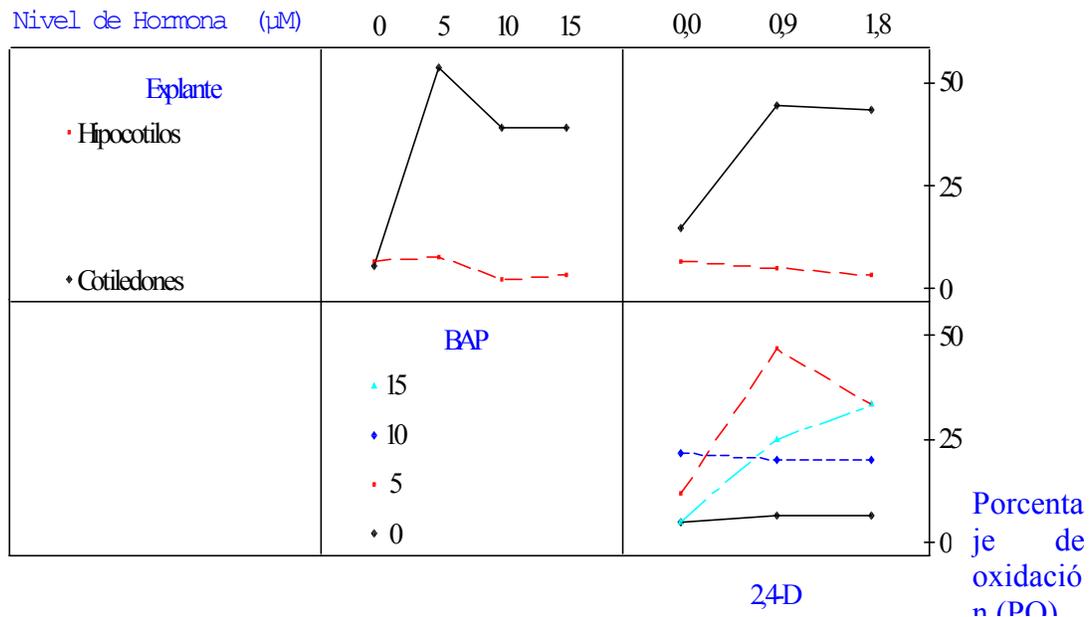
**Figura 10.** Influencia en el porcentaje de oxidación (PO) del tipo de explante, tipo y nivel de hormona en el establecimiento *in vitro*, inducción calogénica y morfogénica de *Tabebuia rosea* a los 22 y 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

Las diferencias observadas a los 22 dds en PO para las fuentes de variación fueron altamente significativas  $P < 0.05$ , excepto las siembras o replicas  $P = 0.67$ , que nos indica la buena aleatorización del material vegetal para cada tratamiento (Anexo 18).

A los 22 dds, el valor de PO para los cotiledones fue de 17% y para los hipocótilos fue de aproximadamente 1%, esta diferencia fue real. A los 33 dds el PO para los cotiledones e hipocótilos fue de 36% y 5% respectivamente. Esto nos indica que los cotiledones tienen tendencia a presentar mayor oxidación.

A los 33 dds se observó un mayor PO (25%) en los tratamientos con 1.8  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; los incrementos en el nivel de 2,4-D produjeron incrementos en el PO. Entre los niveles de BAP, se observó un mayor PO (32%) a un nivel de 5  $\mu\text{M}$  de BAP, y los incrementos en el nivel de BAP produjeron disminución del PO.

Se evaluó las interacciones entre los factores: tipo de explante, método de siembra y la presencia o ausencia de cortes. Las tres interacciones entre las variables fueron significativas (Figura 11) a los 33 dds (Anexo 19).



**Figura 11.** Interacciones entre los factores tipo de explante, BAP y 2,4-D para la variable porcentaje de oxidación (PO) en el establecimiento *in vitro*, inducción callogénica y morfogénica para los explantes cotiledonares e hipocotiledonares a los 33 dds (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

#### 7.4 CONCLUSIONES

- El nivel de BAP que en promedio presentó el mayor PC fue el de 5 μM.
- El nivel de 2,4-D que presentó el mayor PC fue el de 0.9 μM
- Para los hipocótilos el tratamiento en que mayor PC se produjo fue el de 5 μM de BAP y 0.9 μM de 2,4-D.
- Para los cotiledones el tratamiento en que mayor PC se produjo fue el de 0 μM de BAP y 0.9 μM de 2,4-D.
- Los cotiledones presentaron mayores problemas de oxidación que los hipocótilos.
- Según el tipo de hormona e independientemente una de la otra, se observó mayor porcentaje de oxidación a niveles de: 5 μM con 1.8 μM de BAP y 2,4-D respectivamente.

## 7.5 RECOMENDACIONES

- Para obtener valores mayores en cuanto a formación de tejido callogénico con explantes hipocotiledonares se recomienda una combinación de las hormonas BAP y 2,4-D a razón de 5  $\mu\text{M}$  y 0.9  $\mu\text{M}$  respectivamente.
- Para obtener valores mayores en cuanto a formación de tejido callogénico con explantes cotiledonares se recomienda utilizar 2,4-D a razón de 0.9  $\mu\text{M}$ .
- Utilizar alternativas para reducir la presencia de oxidación como: subcultivos frecuentes o agregar antioxidantes al medio de cultivo. Esto es necesario especialmente si se piensa utilizar explantes cotiledonares.
- Evaluar otros factores para la inducción morfogénica como: Alteraciones de luz y oscuridad y contenido de nitrógeno en el medio de cultivo.

## **8. EFECTO DEL ACIDO 2,4DICLOROFENOXYACETICO (2,4-D) EN LA MULTIPLICACIÓN DE TEJIDO CALLOGENICO OBTENIDO A PARTIR DE EXPLANTES COTILEDONARES E HIPOCOTILEDONARES DE *Tabebuia rosea*.**

### **8.1 OBJETIVOS**

Evaluar cinco niveles de la auxina 2-4,D en la multiplicación de tejido callogénico procedentes del mejor tratamiento de cotiledones (0 $\mu$ M de BAP con 0.9  $\mu$ M 2,4-D) y del mejor tratamiento de hipocótilos (5  $\mu$ M de BAP con 0.9  $\mu$ M de 2,4-D) del experimento 3a.

### **8.2 MATERIALES Y METODOS**

#### **8.2.1 Material Vegetal**

Como material inicial se utilizó tejido callogénico producto de dos tratamientos con mejor producción de callo del experimento 3a, los callos se dividieron a los 45 dds y se sembraron en el medio de cultivo.

#### **8.2.2 Medio de Cultivo**

El medio de cultivo utilizado es el de Gamborg B5 (Cuadro 6) y en este caso uso la auxina 2-4,D en cinco niveles: 0, 2.25, 4.50, 6.75 y 9.00  $\mu$ M (0, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/L).

#### **8.2.3 Toma de datos**

Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial con un completo al azar, se realizaron 3 réplicas, para cada uno de los 10 tratamientos (Cuadro 10). Cada tratamiento consta de 30 unidades experimentales. Se tomaron datos de: porcentaje de callogénesis y presencia de oxidación (Cuadro 5). Las tomas de datos se realizaron 15 días después de la siembra.

**Cuadro 10.** Tratamientos para evaluación del efecto del 2,4-D en la multiplicación de tejido callogénico procedente de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* (Experimento 3b). Zamorano, Honduras, 2001.

Explante	2-4,D ( $\mu\text{M}$ )				
	0	2.25	4.50	6.75	9.00
Hipocótilo	T1	T2	T3	T4	T5
Cotiledón	T6	T7	T8	T9	T10

#### 8.2.4 Análisis estadístico

Se realizó un ANDEVA con dos criterios de clasificación (tipo de explante y niveles de la auxina 2,4-D). Para comparación de los tratamientos se realizó la separación de medias con la Prueba Duncan con alpha de 0.05.

### 8.3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 8.3.1 Porcentaje de callo (PC)

La multiplicación del tejido callogénico (Anexo 20) se presentó en mayor porcentaje y con una diferencia real en los testigos sin uso de hormona.

#### 8.3.2 Porcentaje de oxidación (PO)

A los 15 dds, la oxidación del tejido callogénico se presentó mayormente en los tratamientos con contenido de hormona y fue en promedio 70%. En el testigo sin contenido de hormona no se presentó.

### 8.4 CONCLUSIONES

- Se encontró mayor multiplicación del tejido callogénico con el tratamiento sin contenido de hormona

### 8.5 RECOMENDACIONES

- Utilizar tejido callogénico con menor tiempo de los 45 dds, para evitar la senilidad del material utilizado.
- Si se utiliza tejido callogénico inicial bajo las condiciones de este experimento se recomienda evaluar concentraciones mayores a las utilizadas en la etapa de inducción de callogénica.

## 9. CONCLUSIONES

- El cultivo de ápices meristemáticos se presenta como una alternativa factible de micropropagación de la especie *Tabebuia rosea*, pues este tipo de explante mostró una respuesta favorable en el establecimiento *in vitro*, se desarrollaron brotes basales y aumentó la cantidad de nudos por explante lo que permite contar con mayor material vegetal para la fase multiplicación.
- Los explantes cotiledonares e hipocotiledonares mostraron adecuada formación de tejido callogénico, lo que indica la posibilidad de utilizar este tipo de explantes con métodos indirectos de micropropagación, realizando una posterior inducción morfogénica para la diferenciación del tejido.

## 10.RECOMENDACIONES

### 10.1 SIEMBRA DE SEMILLAS SEXUAL DE *Tabebuia rosea*

- Para disminuir la presencia de contaminación en la siembra de las semillas, es necesario evaluar niveles de hipoclorito de calcio mayores a 0.5% con un tiempo de desinfección en la solución de 30 minutos. Seguidamente, a nivel de la cámara de flujo laminar realizar tres enjuagues con agua destilada estéril de 1 minuto cada uno y proceder a la siembra en un medio Knop modificado.

### 10.2 ELONGACION DE APICES MERISTEMATICOS

- Utilizar como material vegetal ápices meristemáticos obtenidos de vitroplántulas de *Tabebuia rosea* de 45 días de germinadas.
- Para el establecimiento *in vitro*, sembrar los ápices meristemáticos de 1 cm en un medio de cultivo Gamborg B5 conteniendo 10  $\mu\text{M}$  (2.25 mg/L) de BAP.
- A los 35 dds subcultivar las porciones apicales y los brotes basales a etapa de enraizamiento.
- Realizar ensayos de enraizamiento del tejido vegetal obtenido, en condiciones no estériles o utilizar niveles mayores a 15  $\mu\text{M}$  (3 mg/L) de AIB para inducir el enraizamiento *in vitro*.

### 10.3 REGENERACION INDIRECTA A PARTIR DE EXPLANTES COTILEDONARES

- Utilizar como material vegetal inicial cotiledones obtenidos de vitroplántulas de *Tabebuia rosea* de 45 días de germinadas.
- De cada vitroplántula se deben obtener cuatro explantes cotiledonares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Los explantes se deben seccionar en la forma presentada en el estudio (Figura 2) sin la presencia de corte.
- Sembrar los explantes cotiledonares en forma apolar en un medio Gamborg B5 con un nivel de 0.9  $\mu\text{M}$  (2 mg/L) de 2,4-D.

- A los 35 días de siembra subcultivar los tejidos callogénicos obtenidos, y someterlos a condiciones necesarias para estimular la inducción morfogénica. Probar la influencia de factores como: Régimen de luminosidad, tipo y niveles de reguladores de crecimiento y medio de cultivo.

#### **10.4 REGENERACION INDIRECTA A PARTIR DE EXPLANTES HIPOCOTILEDONARES**

- Utilizar como material vegetal inicial hipocótilos obtenidos de vitroplántulas de *Tabebuia rosea* de 45 días de germinadas.
- Los hipocótilos se deben dividir en explantes de 1 cm de longitud, de cada vitroplántula se pueden obtener 4 o 5 explantes hipocotiledonares.
- Sembrar los explantes hipocotiledonares en forma horizontal en un medio Gamborg B5 con un nivel de 5  $\mu\text{M}$  (1.13 mg/L) de BAP y 0.9  $\mu\text{M}$  (2 mg/L) de 2,4-D.
- A los 35 días de siembra subcultivar los tejidos callogénicos obtenidos, y someterlos a condiciones necesarias para estimular la inducción morfogénica. Probar la influencia de otros factores como: Régimen de luminosidad, tipo y niveles de reguladores de crecimiento y medio de cultivo.

## 11. BIBLIOGRAFIA

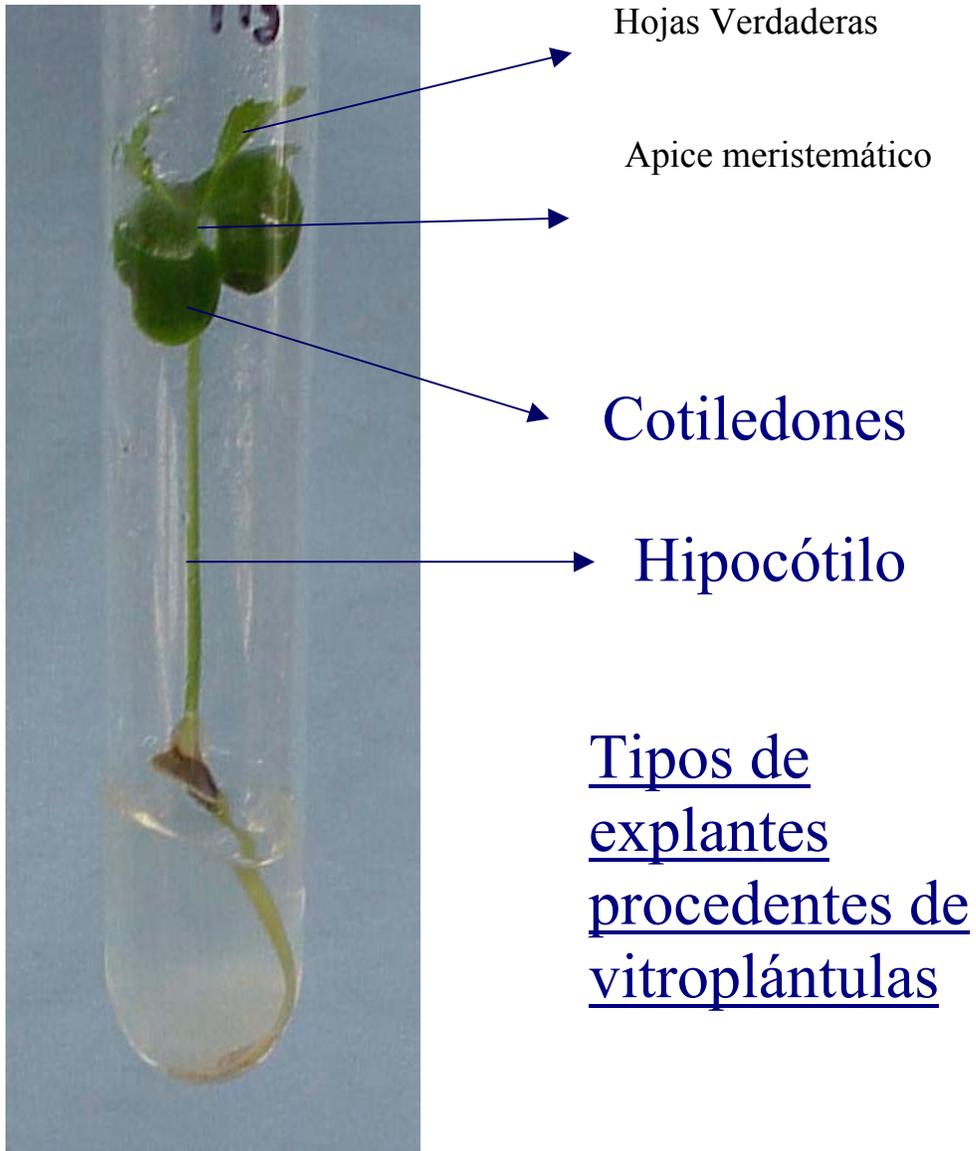
- BERNAL, M.; CORREA, L. 1989. Descripción de especies forestales de importación. 1 Ed. Universidad Nacional. Caracas, Venezuela. 20 p.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1983. Plant tissue culture: Theory and Practice. Elsevier publishers. Amsterdam, Netherlands. 502 p.
- BUENO, M. 1992. Propagación clonal de árboles adultos de *Populus tremula* L. de la sierra de Madrid por cultivo de tejidos. Proceedings Vol. 1. CIT-INIA. Departamento de Sistemas Forestales. Madrid, España. p.523-528.
- BUENO, M.; 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.
- CATIE (Centro de Agricultura Tropical de Investigación y Enseñanza). 1997. Árboles forestales de usos múltiples de América Central. Turrialba, Costa Rica. 47 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura; Fundamentos y aplicaciones. Ed Roca, W.N.; Mrogiski, L.A.. Cali, Colombia. 379 p.
- ESPINOSA, C. 2001. Evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan*. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 36 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1997. Almanac of World Situation and Statistics. UNO. Rome. Italy. 199 p.
- GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture, Part 1, The Technology. 2<sup>nd</sup> Ed. Exegetics Ltd. Edington, England. 555 p.
- GEORGE, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture, Part 2, In Practice. 2<sup>nd</sup> Ed. Exegetics Ltd. Edington, England. 632 p.
- HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E. 1997. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Prentice-Hall, Inc. México. 760 p.

- HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLANDER, A. 1985. Tissue culture in forestry and agriculture. Plenum Press, New York, USA. 390 p.
- HURTADO, D.; MERINO, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. 1 Ed. Trillas, S.A. de C.V.. México. 232 p.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agrícola del Ecuador). 1997. Árboles forestales del Ecuador. Ministerio de Agricultura. Quito. Ecuador. 43 p.
- JORDAN, M.; CORTES, 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 plántulas de alcornoque (*Quercus suber*) por cultivo *in vitro*. CIT-NIA. p.732-382
- MEJIA AMAYA, R. 1998. Estudio para la propagación *in vitro* de *Albizia lebeck*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Quito, Ecuador. 1998. 34 p.
- PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 343 p.
- SAMARTIN, C. 1990. Estudio de propagación de las especie forestales *Camellia sasanqua* y *Camellia japonica* por cultivo *in vitro*. CIT-INIA. Madrid, España. 12 p.
- STANDLEY, P. 1970. Flora of Guatemala. Botany, Vol 24. Field Museum Press. Washington, USA. p.224 – 225.
- THORPE, T. 1981. Plant tissue culture: methods and applications in agriculture. Academic Press. NY, USA. 279 p.
- WOODLAND, D.W. 1997. Contemporary plant systematics. Andrews University Press. Michigan, USA. 277 p.

## 12. ANEXOS

**Anexo 1.** Lista de siglas utilizadas para las variables en la evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*. Zamorano, Honduras, 2001.

<b>Variables</b>	<b>Siglas</b>
Altura por explante	<b>APE</b>
Altura por brote basal	<b>APB</b>
Días despues de siembra	<b>dds</b>
Número de brotes basales por explante	<b>NBE</b>
Número de nudos por explante	<b>NNE</b>
Porcentaje de formación de tejido callogénico	<b>PC</b>
Porcentaje de oxidación	<b>PO</b>
Porcentaje de vitrificación	<b>PV</b>



**Anexo 2.** Vitroplántula de *Tabebuia rosea* a los 60 días de germinada *in vitro* con los diferentes tipos de explantes utilizados para el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*. Zamorano, Honduras, 2001.

**Anexo 3.** Análisis de varianza para el porcentaje de formación de tejido callogénico (PC) a los 33 dds según el tipo de explante (cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas) en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>SC Aj.</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
TE	2	92.956	92.956	46.478	81.31	0.000
Error	172	98.324	98.324	0.572		
Total	174	191.280				

**Anexo 4.** Análisis de varianza para el porcentaje de formación de tejido callogénico (PC) a los 33 dds en la evaluación del efecto del tipo de explante (cotiledones y hojas verdaderas), método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>SC Aj.</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Tipo de explante (TE)	1	15,7800	15,9325	15,9325	28,42	0,000
Método de siembra (PS)	1	15,6130	14,2757	14,2757	25,46	0,000
Corte (C)	1	0,0944	0,1570	0,1570	0,28	0,598
TE*PS	1	1,0441	1,0519	1,0519	1,88	0,173
TE*C	1	0,1405	0,1448	0,1448	0,26	0,612
C*PS	1	0,0042	0,0136	0,0136	0,02	0,876
TE*C*PS	1	0,2201	0,2201	0,2201	0,39	0,532
Error	127	71,2072	71,2072	0,5607		
Total	134	104,1037				

**Anexo 5.** Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 dds según el tipo de explante (cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas) en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>SC Aj.</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
TE	2	8,5304	8,5304	4,2652	23,58	0,000
Error	158	28,5752	28,5752	0,1809		
Total	160	37,1056				

**Anexo 6.** Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación (PO) a los 33 dds en la evaluación del efecto del tipo de explante (cotiledones y hojas verdaderas), método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de Variación	GL	SC	SC Aj	CM	F	P
Tipo de explante (TE)	1	7,7081	7,7371	7,7371	54,06	0,000
Método siembra (MS)	1	3,1085	2,6560	2,6560	18,56	0,000
Corte (C)	1	0,3689	0,2776	0,2776	1,94	0,166
TE*MS	1	0,7494	0,7569	0,7569	5,29	0,023
TE*C	1	0,2522	0,2524	0,2524	1,76	0,186
C*PS	1	0,0586	0,0434	0,0434	0,30	0,583
TE*C*MS	1	0,0542	0,0542	0,0542	0,38	0,539
Error	127	19,0333	19,0333	0,1431		
Total	134	31,3333				

**Anexo 7.** Análisis de varianza para la porcentaje de vitrificación (PV) a los 33 dds según el tipo de explantes (cotiledones, hipocótilos y hojas verdaderas) utilizado en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de Variación	GL	SC	SC Ajustada	CM	F	P
Tipo de explante	2	0,4684	0,4684	0,2342	0,93	0,396
Error	158	39,7055	39,7055	0,2513		
Total	160	40,1739				

**Anexo 8.** Análisis de varianza para el porcentaje de vitrificación (PV) a los 33 dds en la evaluación del efecto del tipo de explante (Cotiledones y hojas verdaderas), método de siembra y la presencia o ausencia de cortes en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 1). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de Variación	GL	SC	SC Aj	CM	F	P
Tipo de explante (TE)	1	0,3950	0,3905	0,3905	1,66	0,300
Método de siembra (PS)	1	0,3347	0,2056	0,2056	1,06	0,305
Corte (C)	1	0,0048	0,0122	0,0122	0,06	0,803
TE*PS	1	0,7533	0,7569	0,7569	3,91	0,050
TE*C	1	0,0661	0,0662	0,0662	0,34	0,560
C*PS	1	0,0054	0,0038	0,0038	0,02	0,890
TE*C*PS	1	0,0074	0,0074	0,0074	0,04	0,846
Error	133	25,7667	25,7667	0,1937		
Total	140	31,3333				

**Anexo 9.** Análisis de varianza para la variable número de nudos por explante (NNE) a los 33 dds en la evaluación del efecto de la bencilaminopurina (BAP) en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de Variación	GL	SC	SC Aj	CM	F	P
BAP	4	0.001	0.001	0.000	0.05	0.99
Rep	2	0.013	0.013	0.007	2.09	0.186
Error	8	0.025	0.025	0.003		
Total	14	0.038	0.038			

**Anexo 10.** Análisis de varianza para la variable altura por explante (APE) a los 33 dds en la evaluación del efecto de la bencilaminopurina (BAP) en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de Variación	GL	SC	SC Aj	CM	F	P
BAP	4	9.67	9.67	2.417	27.06	0.000
Rep	2	0.37	0.37	0.186	2.08	0.187
Error	8	0.71	0.71	0.089		
Total	14	10.76	10.76			

**Anexo 11.** Análisis de regresión para la variable altura por explante (APE) vrs. nivel de Bencilaminopurina (BAP) a los 33 dds en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

$$\text{APE} = 8.85 + 0.109 \text{ BAP}$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	8.8467	0.1660	53.30	0.000
BAP	0.10933	0.01355	8.07	0.000

$$S = 0.3711 \quad R\text{-Sq} = 83.4\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 82.1\%$$

#### Analisis de Varianza

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Regresion	1	8.9653	8.9653	65.09	0.000
Error	13	1.7907	0.1377		
Total	14	10.7560			



**Anexo 12.** Apice meristemático con brotes basales, a los 32 dds en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea*. Zamorano, Honduras, 2001.

**Anexo 13.** Análisis de varianza para el número de brotes basales por explante (NBE) a los 33 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de Variación	GL	SC	SC Aj	CM	F	P
BAP	4	7.996	7.996	1.999	108.05	0.000
Rep	2	0.052	0.052	0.026	1.41	0.3
Error	8	0.148	0.148	0.0185		
Total	14	8.196	8.196			

**Anexo 14.** Análisis de varianza para la variable altura por brote basal (APB) obtenidos a los 33 dds en la evaluación del efecto de Bencilaminopurina BAP en el establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos de *Tabebuia rosea* (Experimento 2a). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de Variación	GL	SC	SC Aj	CM	F	P
BAP	4	7.10	7.1	1.77	35.5	0.00
Rep	2	0.1	0.1	0.05	1	0.41
Error	8	0.4	0.4	0.05		
Total	14	7.6				

**Anexo 15.** Análisis de varianza para la variable porcentaje promedio de callo (PC) a los 33 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 Diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénica *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea*. (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de variación	GL	SC	SC aj	CM	F	P
Tipo de explante (TE)	1	0,327	0,216	0,216	0,62	0,433
BAP	3	342,671	327,180	109,060	310,91	0,000
2,4-D	2	44,695	47,855	23,927	68,21	0,000
BAP*2,4-D	6	137,145	143,091	47,697	135,98	0,000
TE*BAP	3	0,955	0,608	0,304	0,87	0,421
TE*2,4-D	2	61,843	62,062	10,344	29,49	0,000
TE*BAP*2,4D	6	120,925	120,925	20,154	57,46	0,000
Error	649	227,653	227,653	0,351		
Total	672	936,214				



**Anexo 16.** Explante hipocotiledonar a los 28 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 Diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénica *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.



**Anexo 17.** Explante cotiledonar a los 27 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 Diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénica *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

**Anexo 18.** Análisis de varianza para la variable porcentaje promedio de oxidación (PO) a los 22 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 Diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénica *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de variación	GL	SC	SC aj	CM	F	P
Tipo de explante (TE)	1	16,4760	16,6922	16,6922	174,70	0,000
BAP	3	5,8981	5,8684	1,9561	20,47	0,000
2,4-D	2	2,9769	2,9921	1,4960	15,66	0,000
BAP*2,4-D	6	6,0712	6,1888	2,0629	21,59	0,000
TE*BAP	3	3,9283	4,0564	2,0282	21,23	0,000
TE*2,4-D	2	3,6169	3,7707	0,6285	6,58	0,000
TE*BAP*2,4D	6	9,7944	9,7944	1,6324	17,08	0,000
Error	651	62,2011	62,2011	0,0955		
Total	674	110,9630				

**Anexo 19.** Análisis de varianza para la variable porcentaje de oxidación (PO) a los 33 dds en la evaluación del efecto de la Bencilaminopurina (BAP) y el Acido 2,4 Diclorofenoxyacetico (2,4-D) en el establecimiento, inducción callogénica y morfogénica *in vitro* de explantes cotiledonares e hipocotiledonares de *Tabebuia rosea* (Experimento 3a). Zamorano, Honduras, 2001.

Fuente de variación	GL	SC	SC aj	CM	F	P
Tipo de explante (TE)	1	4,91775	4,90719	4,90719	83,13	0,000
BAP	3	3,10921	3,07635	1,02545	17,37	0,000
2,4-D	2	0,48540	0,47631	0,23815	4,03	0,018
BAP*2,4-D	6	2,76158	2,70781	0,90260	15,29	0,000
TE*BAP	3	0,57747	0,61332	0,30666	5,19	0,006
TE*2,4-D	2	1,52980	1,61949	0,26992	4,57	0,000
TE*BAP*2,4D	6	2,03165	2,03165	0,33861	5,74	0,000
Error	651	38,43009	38,43009	0,05903		
Total	674	53,84296				



**Anexo 20.** Tejido callogénico a los 31 dds en la evaluación del efecto del 2,4-D en la mutiplicación de tejido callogénico en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia rosea* (Experimento 3b). Zamorano, Honduras, 2001.