

## Establecimiento *in vitro* de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) y *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco)

### *In vitro* establishment of two species native to Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) and *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco)

Hine Gómez, Ana<sup>\*</sup>; Rojas Vargas, Alejandra<sup>\*\*</sup>; Daquinta Gradaille, Marcos<sup>\*\*\*</sup>

#### Resumen

El objetivo de esta investigación fue lograr el establecimiento *in vitro* de la especie *Terminalia amazonia* y *Vochysia allenii* debido a la dificultad de propagarlas sexual y asexualmente con técnicas convencionales. Se logró establecer segmentos nodales de ambas especies en condiciones *in vitro* empleando el HgCl<sub>2</sub> 0,1 % con un tiempo de exposición de 5 minutos. El mejor medio de cultivo para nudos fue el WPM 100 % de sales para *T. amazonia* y para *V. allenii* fue el WPM 50 % de sales. Después de 28 días de cultivo se obtuvo un 42 % de nudos establecidos para *T. amazonia* y 10% para *V. allenii*. En ambas especies se evaluó el efecto sobre la brotación de cinco concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) (0,0; 2.22, 4.44, 6.66, 8.88 µM L<sup>-1</sup>) y cinco de tiazuron (TDZ) (0,0; 0.22, 0.45, 0.68, 0.90 µM L<sup>-1</sup>). Se obtuvo en promedio un brote por explante en los cinco tratamientos de BAP y TDZ utilizados.

**Palabra clave:** cultivo *in vitro*, nudos, 6-bencilaminopurina, tiazuron.

#### Abstract

The objective of this research was to achieve the *in vitro* establishment of the species *Terminalia amazonia* and *Vochysia allenii* due to the difficulty propagate sexually and asexually with conventional techniques. It was possible to establish the nodal segments of both species in *in vitro* conditions using 0.1 % HgCl<sub>2</sub> with an exposure time of 5 minutes. The best nodal culture medium was 100 % WPM salts in *T. amazonia* and *V. allenii* was WPM 50% salts. After 28 days of culture 42 % of nodal segments to *T. amazonia* and *V. allenii* 10% was obtained. In both species, the effect on sprouting of five concentrations of 6-benzylaminopurine (6-BAP) (0.0, 2.22, 4.44, 6.66, 8.88 µM L<sup>-1</sup>) and five thiazuron (TDZ) (0.0, 0.22, 0.45, 0.68, 0.90 µM L<sup>-1</sup>) was evaluated. Outbreak was scored on average per explant in the five treatments of BAP and TDZ used.

**Key word:** *in vitro* culture, nodal segments, 6-benzylaminopurine, thiazuron.

**Recibido:** febrero 18 de 2014

**Aprobado:** octubre 17 de 2014

#### Introducción

El amarillón, *Terminalia amazonia*, es un árbol grande de 25 a 45 m de altura, ampliamente distribuido en el bosque lluvioso y altamente valorado por su madera de alta calidad, su crecimiento es moderado convirtiéndolo en candidato para plantar desde altitudes bajas hasta medianas. Su madera dura y durable, es

cotizada en los mercados nacionales e internacionales. Por su alta fortaleza y acabado atractivo tiene diversos usos en construcción general (armadura de techos y pisos), mueblería y construcción externa, incluyendo en durmientes para ferrocarriles y puentes. Se recomienda para mangos de herramientas, encofrados, puentes, pilotes, tarimas, pisos industriales, chapa,

\* Master en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional (UNA). CP 86-3000. Costa Rica. Tel.: 25624606, ana.hine.gomez@una.cr.

\*\* Master en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional (UNA). CP 86-3000. Costa Rica. Tel.: 25624606, alejandra.rojas.vargas@una.cr.

\*\*\* Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km. 9. CP 69450. Cuba. Tel.: 2713313.

parquet, barriles, puertas y tablilla (OFI y CATIE, 2003; Zamora *et al.*, 2003).

Por otra parte, el árbol de botarrama blanco, *Vochysia allenii*, es un árbol de buen tamaño de 30 a 35 m de altura y 98-120 cm de DAP (diámetro a la altura de pecho). Su madera puede usarse en la construcción interna y carpintería general, postes de cercas, formaletas, molduras, cornisas y rodapié, cajas de diversos tamaños, fósforos, palillos y enchapes. Esta madera tiene características excelentes para la producción de pulpa para papel (Quesada *et al.*, 1997; Flores y Obando, 2003).

Como respuesta a la dificultad de propagar sexual y asexualmente con técnicas convencionales el amarillón y la existencia de pocos individuos de botarrama, se plantea la propagación *in vitro* como una alternativa de multiplicación de estos materiales. En general, la técnica busca mejorar los sistemas de producción de las especies, producir material sano y seleccionado durante todo el año, útil para el establecimiento de plantaciones clonales de las especies seleccionadas; sin olvidar que se contribuye a la conservación genética de las mismas (Daquinta *et al.*, 2000; Agramonte *et al.*, 2001; Estopá, 2005).

Por otra parte, existen pocos trabajos de cultivo de tejidos en estas especies. Para el género *Terminalia*, Ramesh *et al.*, (2005) lograron el establecimiento exitoso de segmentos nodales de *Terminalia bellirica*; Pandey *et al.*, (2006) lograron el establecimiento de nudos de *Terminalia arjuna* y Méndez y Abdelnour (2014) lograron el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales. Para botarrama blanco no existen trabajos de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales.

Por lo anterior, se realizó este trabajo con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de amarillón y botarrama blanco para generar otro método de propagación vegetativa.

## Materiales y métodos

### ***Establecimiento in vitro de nudos de T. amazonia y V. allenii provenientes de plantas cultivadas en condiciones de invernadero***

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Forestales del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional, (UNA), Costa Rica. El material experimental fue donado por la Fundación para el desarrollo de la Cordillera Volcánica Central (FUNDECOR). Una vez colectadas las plantas, se trasladaron a condiciones de invernadero (temperatura promedio 27 °C, humedad relativa 60 %) para ser decapitadas y podadas mensualmente, eliminándose la yema apical con el fin iniciar el rebrote de las yemas axilares (rejuvenecimiento). Finalmente, las plantas se trataron semanalmente con una mezcla de 2 g/l de Agimicina y 2 g/l Benlate y 50 mg l<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (6-BAP) por un periodo de cuatro semanas (figura 1).

El material experimental de ambas especies a introducir en condiciones *in vitro*, consistió de nudos tomados de brotes axilares de plántulas mantenidas en condiciones de invernadero (figura 1). Para la desinfección del material, se colectaron los nudos en el invernadero y se trasladaron al laboratorio en una solución de 0,5 g/l de cisteína. Posteriormente, se mantuvieron durante 1 h bajo el flujo de agua constante, seguido se sumergieron en una solución de agua y jabón líquido Antibacterial Bactex (Punto Rojo S.A) al 1 % por 10 min en agitación y se lavaron con ayuda de un cepillo suave para eliminar los contaminantes adheridos superficialmente, luego se enjuagaron con abundante agua. Posteriormente, se evaluaron tres metodologías de desinfección para la introducción *in vitro* de nudos de ambas especies tabla 1. Los explantes de *T. amazonia* se cultivaron en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) y el Lloyd y McCown, (WPM)



**Figura 1.** Plántulas en condiciones de invernadero: (A) *T. Amazonia*; (B) *V. allenii*.

(1980). Para el caso de *V. allenii* se cultivaron los explantes en WPM 100 % y 50 % de fuerza iónica y el MS 50 % de fuerza iónica. Todos los medios de cultivo se complementaron con 3 % de sacarosa, y se solidificaron con 2,7 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™ (Sigma, St. Louis, MO, USA); el pH del medio se ajustó a 5,7 antes de la esterilización en autoclave (21 °C, 15 lb. presión, 25 min).

Debido a la oxidación del medio de cultivo que presentaron los nudos de *T. amazonia* al ser desinfectados e introducidos en condiciones *in vitro*, se realizó una prueba con diferentes medios de cultivo y antioxidantes con el fin de eliminar la necrosis de los explantes. Los tratamientos empleados se detallan en la tabla 2. Para este ensayo los explantes fueron desinfectados empleando la metodología C (tabla 1).

### Inducción de brotes en segmentos nodales de *T. amazonia* y *Vochysia allenii*

Para los ensayos de multiplicación *in vitro*, se emplearon nudos de *T. amazonia*, inmaduros y etiolados durante 30 días en condiciones de invernadero y nudos de *V. allenii*, inmaduros sin etiolar. Los nudos de ambas especies fueron desinfectados empleando la metodología C, que incluía el uso de 0,1 % de HgCl<sub>2</sub>. Como unidad experimental se consideró un nudo de 2 cm de longitud cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo WPM 100 % de fuerza iónica para el caso de *T. amazonia* y 50 % de fuerza iónica para *V. allenii*, complementados con 3 % de sacarosa, 1 ml L<sup>-1</sup> de Plant Preservative Mixture (PPM)™ (Plant Cell Technology, Washington DC, USA), 1 g L<sup>-1</sup> de PVPP™ (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,5 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada y solidificados con 2,7 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™. El pH de los medios se ajustó a 5,7 antes de la esterilización en autoclave (21 °C, 15 lb. presión, durante 25 min). Se estudiaron cinco concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) (Sigma, St. Louis, MO, USA): (0,00; 2.22; 4.44; 6.66; 8.88 μM L<sup>-1</sup>) y cinco de

tidiazuron (TDZ) (Sigma, St. Louis, MO, USA): (0.00; 0.22; 0.45; 0.68; 0.90 μM L<sup>-1</sup>).

### Procesamiento estadístico de los datos

Cada tratamiento consistió de 20 nudos introducidos en condiciones *in vitro*; como unidad experimental se consideró un nudo de 2 cm de longitud cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo. Las variables evaluadas fueron las siguientes: porcentaje de nudos contaminados, porcentaje de explantes necrosados y número promedio de brotes por explante desinfectado. El ensayo se evaluó semanalmente durante un mes. En cada uno de los ensayos se utilizó un diseño completamente al azar con 20 nudos por tratamiento. El procesamiento de la información se realizó empleando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2009).

### Resultados y discusión

#### Establecimiento *in vitro* de nudos de *T. amazonia* y *V. allenii*

En *Terminalia amazonia* para la variable explantes libres de contaminación no se logró determinar diferencia entre los tratamientos de desinfección aplicados. El tratamiento con HgCl<sub>2</sub> 0,1 % con un tiempo de exposición de 5 min resultó ser el mejor, debido a que no se presentaron explantes necrosados (0 %) y el porcentaje de explantes sobrevivientes fue alto (76 %). Por su parte, los tratamientos A y B presentaron 100 % de explantes necrosados y no sobrevivió ningún explante. Sin embargo, el material no presentó valores de contaminación importantes, en el tratamiento A se presentó un 73 % de explantes libres de contaminación y en el tratamiento B un 79 %. Además, se debe mencionar que se observó oxidación de los medios de cultivo en todos los explantes desinfectados tanto con NaClO como con HgCl<sub>2</sub>. Por este motivo, se necrosó gran parte del material introducido. Se definió el trata-

**Tabla 1.** Tratamientos empleados para el establecimiento de una metodología de desinfección para nudos de *T. amazonia* y *V. allenii*.

Pasos de desinfección	Tratamientos		
	A	B	C
1. Sumergir en una mezcla en agitación de Agrimicin® (2 g L <sup>-1</sup> ) y Benlate® (2 g L <sup>-1</sup> ) por 30 min	√	√	-
2. Sumergir en una solución de cloruro de mercurio al 0,1% por 5 min con bomba de vacío.	-	-	√
3. Sumergir en una solución en agitación de hipoclorito de sodio (NaClO i.a) + 0.1 % de tween 80 por 20 min <i>T. amazonia</i> y 15 min <i>V. allenii</i> .	2,5%	3,5%	-
Tres lavados con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar, durante dos min.	√	√	√

√: paso de desinfección realizado - : paso de desinfección no realizado

miento C con HgCl<sub>2</sub> 0,1 % como el más efectivo en la desinfección de nudos de *T. amazonia*.

**Tabla 2.** Tipos de medios de cultivo y antioxidantes en el establecimiento *in vitro* de nudos *T. amazonia*, luego de 28 días de cultivo

Tipo de medio de cultivo	Tipo de antioxidante
MS (50% de sales)	100 mg L <sup>-1</sup> ácido cítrico
MS (50% de sales)	100 mg L <sup>-1</sup> ácido cítrico + 100 mgL <sup>-1</sup> ácido ascórbico
MS	1 g L <sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) <sup>TM</sup>
WPM (50% de sales)	100 mg L <sup>-1</sup> ácido ascórbico
WPM (50% de sales)	100 mg L <sup>-1</sup> ácido cítrico + 100 mgL <sup>-1</sup> ácido ascórbico
WPM (50% de sales)	1 mg L <sup>-1</sup> ácido cisteína
WPM	1 g L <sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) <sup>TM</sup>
WPM	-

Por otro lado, en el caso de *V. allenii* solo se observó explantes limpios en la desinfección con HgCl<sub>2</sub>; (47,5 %), de los cuales solo el 10 % sobrevivieron y no se observó oxidación del medio de cultivo. Sin embargo, en esta especie se observó gran pérdida de material por necrosis de los explantes en todos los tratamientos de desinfección y por la presencia de una bacteria persistente. De acuerdo con Smith (2000) y Alvarado (1998), es frecuente que el material vegetal tenga microorganismos endógenos. En algunos casos estos microorganismos se pueden expresar porque la desinfección es un estrés para el vegetal o quedaron latentes y almacenados en el interior de las células, espacios intercelulares o haces conductores.

Por otra parte, el cloruro de mercurio aunque ha tenido sus detractores, es un desinfectante muy empleado en especies donde los hipocloritos no han tenido éxito. Por ejemplo, Daquinta *et al.*, (2007) lograron el establecimiento de Bambú con HgCl<sub>2</sub> 0,2 % con un tiempo de exposición de 10 min. Además, Abdelnour y Muñoz (2005), obtuvieron un 40 % de yemas limpias al desinfectar con HgCl<sub>2</sub> 0,5 % durante 10 min, yemas de estacas de (*Tectona grandis*) provenientes de plantas de campo.

Pandey *et al.*, (2006) lograron el establecimiento de nudos de *Terminalia arjuna* provenientes de brotes juveniles de árboles de 35 años de edad, aplicando durante 3 min una solución de 0,05 % de HgCl<sub>2</sub>. Además, Ramesh *et al.*, (2005) lograron el establecimiento exitoso de segmentos nodales de plántulas de 3 meses de

edad de *Terminalia bellirica*, provenientes de semillas germinadas en condiciones de invernadero empleando 0,1 % de HgCl<sub>2</sub> por 5 min. Lo que demuestra que el HgCl<sub>2</sub> es utilizado exitosamente como desinfectante para el establecimiento de explantes de diferentes especies del género *Terminalia*. Sin embargo, Abdelnour y Muñoz (2005), observaron que en yemas de *Tectona grandis* provenientes de estacas de campo, desinfectadas con cloruro de mercurio en concentraciones de 1,5 % y 1,0 % se obtienen porcentajes de contaminación del 3 % y 5 % respectivamente, pero estas son incapaces de brotar. Cuando se utilizó este desinfectante en concentraciones de 0,5 % durante 10 min, se observó un mayor porcentaje de explantes contaminados (58 %), pero el 40 % del total de material sometido a desinfección logró el establecimiento aséptico y la brotación de las yemas. Lo anterior, evidencia que aún cuando en muchas especies el HgCl<sub>2</sub> sea el único agente desinfectante que permita la desinfección de los explantes, el tejido vegetal puede dañarse a su exposición, afectando significativamente los porcentajes de sobrevivencia.

Con respecto al comportamiento de los nudos de ambas especies, establecidos en los medios de cultivo MS y WPM 100 % y 50 % de sales, en el caso de *T. amazonia*, se obtuvo entre el 40 – 42 % de explantes vivos (tabla 3) en ambos medios de cultivo. Sin embargo, los mayores valores se obtienen en el medio de cultivo WPM, siendo el mejor para continuar con la investigación. Al analizar los datos de *V. allenii* se observó mayor porcentaje de sobrevivencia (35 %) en el medio WPM al 50 % de sales inorgánicas (tabla 4). Ambos medios de cultivo se han empleado indistintamente para el establecimiento de diversas especies leñosas, de acuerdo a sus exigencias nutricionales (George *et al.*, 2008).

Los resultados presentados en la tabla 5, muestran que el PVPP fue el antioxidante con mejor efecto contra la oxidación del medio de cultivo y la necrosis de los nudos de *T. amazonia*; resultado que coincide con el de Méndez y Abdelnour (2014) en *T. amazonia*. Además, George *et al.*, (2008) mencionan que el PVPP es una poliamida que absorbe los fenoles a través de uniones hidrógeno, previniendo su oxidación y polimerización.

No se observó oxidación de los explantes durante los primeros 7 días de cultivo tanto en el medio MS (1962) como en el WPM. Por lo que se incluye dentro de los compuestos complementarios del WPM a emplear en la etapa de multiplicación. Azofeifa (2009), define la oxidación u oscurecimiento del tejido *in vitro* como la oxidación de radicales libres de diferentes compuestos celulares, así, como la oxidación de los compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO), para producir quinonas, las cuales son muy reactivas, generando daño e incluso la muerte celular.

**Tabla 3.** Efecto del tipo de medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de nudos *T. amazonia*, luego de 28 días de cultivo.

Tratamientos	Explantos limpios (%)	Explantos necrosados (%)	Sobrevivencia (%)
MS (1962)	45,00 ± 0,00	7,50 ± 3,54	40,00 ± 0,00
WPM	50,00 ± 0,00	7,50 ± 3,54	42,00 ± 3,34

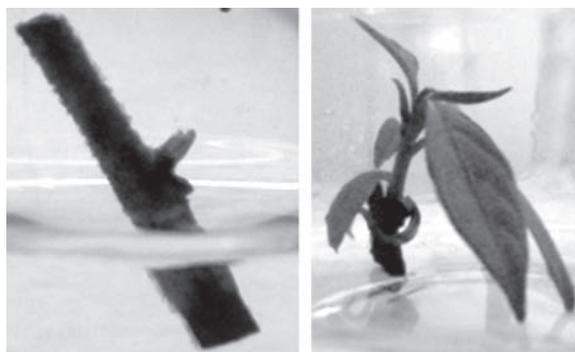
Promedio de dos experimentos, cada experimento consistió de 20 nudos por tratamiento.

**Tabla 4.** Efecto del tipo de medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de nudos *V. allenii*, luego de 28 días de cultivo.

Tratamientos	Explantos limpios (%)	Explantos necrosados (%)	Sobrevivencia (%)
WPM (100% sales inorgánicas)	45	55	20
WPM (50% sales inorgánicas)	60	25	35
MS (1962) (50% sales inorgánicas)	45	45	20

**Tabla 5.** Efecto del tipo de medio de cultivo y antioxidante en el establecimiento *in vitro* de nudos *T. amazonia*, luego de 7 días de cultivo.

Tipo de medio de cultivo	Tipo de antioxidante	Explantos oxidados (%)
MS (50% de sales)	100 mg L <sup>-1</sup> ácido cítrico+ 100 mgL <sup>-1</sup> ácido ascórbico	45
MS (50% de sales)	100 mgL <sup>-1</sup> ácido cítrico	30
MS	1 gL <sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVPP) <sup>TM</sup>	0
WPM (50% de sales)	100 mgL <sup>-1</sup> ácido ascórbico	60
WPM (50% de sales)	1 mgL <sup>-1</sup> ácido cisteína	80
WPM (50% de sales)	100 mgL <sup>-1</sup> ácido cítrico	15
WPM (50% de sales)	100 mgL <sup>-1</sup> ácido cítrico + 100 mg L <sup>-1</sup> ácido ascórbico	45
WPM	1 gL <sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVPP) <sup>TM</sup>	0
WPM	-	55



**Figura 2.** Brote de *T. amazonia* inducido con 4,44 µM L<sup>-1</sup> de 6-BAP (A). Brote de *T. amazonia* desarrollado (B).

**Tabla 6.** Efecto de diferentes concentraciones de TDZ y 6-BAP sobre la inducción de brotes en nudos de *T. amazonia* establecidos en condiciones *in vitro*, luego de 60 días de cultivo.

	Concentraciones TDZ ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )					Concentraciones 6-BAP ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )				
	0,00	0,22	0,45	0,68	0,90	0,00	2,22	4,44	6,66	8,88
Explantos brotados por tratamiento (%)	25	40	15	15	15	35	35	35	30	20
Promedio de brote/explante brotado	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Promedio de dos experimentos, cada experimento consistió de 20 nudos por tratamiento.

### Inducción de brotes en segmentos nodales de *T. amazonia* y *V. allenii*

Comportamiento similar en cuanto al número promedio de brotes por explantes, se observó al emplear 6-BAP y TDZ en *T. amazonia* (tabla 6). Obteniéndose un brote por explante en todas las concentraciones evaluadas (figura 3A). Según George *et al.*, (2008), ambas citocininas se han empleado en el establecimiento de diferentes especies leñosas, siendo su respuesta similar a la obtenida en el presente trabajo en *T. amazonia*. En la figura 3B, se presenta la respuesta de un nudo de *T. amazonia*, en presencia de  $4,44 \mu\text{M L}^{-1}$  de 6-BAP, como se puede notar se alcanza un buen desarrollo tanto del brote como de las hojas en el medio de cultivo WPM. Este resultado concuerda con lo mencionado por Méndez y Abdelnour (2014), donde el 6-BAP actúa como una citocinina que promueve la proliferación de brotes por explante en concentraciones relativamente bajas.

Pandey *et al.*, (2006) y Pijut *et al.*, (2012), lograron propagar *Terminalia arjuna* a partir de segmentos nodales de un árbol maduro. Para lo cual emplearon en medio de cultivo MS a la mitad de sus sales orgánicas y complementado con BAP  $4,44 \mu\text{M}$  y  $0,53 \mu\text{M}$  de ácido naftalenacético (ANA). Por otra parte Ramesh *et al.* (2005) y Pijut *et al.*, (2012), lograron inducir la brotación de *Terminalia bellirica* a partir de explantes nodales cultivados en medio de cultivo MS complementado con  $13,3 \mu\text{M}$  6-BAP, seguido de subcultivo en un medio que contenía  $4,4 \mu\text{M}$  6-BAP. Por su parte, Méndez y Abdelnour (2014) lograron en *T. amazonia* generar brotes con una concentración alta de 6-BAP ( $30 \text{ mg/l}$ ) y

Ravi *et al.*, (2014) también lograron inducir brotación de yemas con  $1,5 \text{ mg/l}$  de 6-BAP.

Por su parte, al utilizar el TDZ en *T. amazonia* se presentó un resultado similar al estudiado por Pandey *et al.*, (2006), los cuales determinaron que el TDZ en algunas especies forestales puede presentar niveles bajos de inducción de yemas.

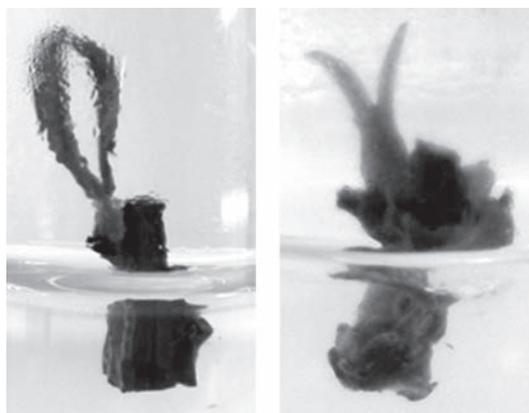
En la tabla 7 se presenta el efecto de 6-BAP y TDZ sobre la brotación de nudos de *V. allenii*. Se obtuvo en promedio de 1 a 2 brotes por explante, resultado muy similar al presentado en *T. amazonia*.

De acuerdo con la (figura 4 A) las yemas nuevas presentaron un mejor desarrollo en el medio de cultivo complementado con 6-BAP. Este resultado pudo deberse según George (2008), a que el TDZ es un regulador del crecimiento que induce una brotación múltiple y en consecuente los brotes adventicios no pueden elongarse lo suficiente. Por su parte, el 6-BAP sí induce la elongación y desarrollo del brote que prolifera.

Como ya se mencionó, la inducción de yemas presentó un resultado muy similar en ambas especies y evidencia lo mencionado por George *et al.* (2008), en cuanto a que la respuesta de estos reguladores de crecimiento es similar al inducir brotes en especies leñosas. Finalmente, no se reportan trabajos anteriores de micropropagación en *V. allenii*, pero queda claro con este ensayo que la especie responde a los reguladores de crecimiento. Lo anterior, indica que su multiplicación podría darse empleando el cultivo de tejidos como una herramienta para tal fin, pero se debe trabajar otras técnicas hasta obtener un protocolo de multiplicación *in vitro* de la especie.

**Tabla 7.** Efecto diferentes concentraciones de 6-BAP y TDZ sobre la inducción de brotes en nudos de *V. allenii* establecidos en condiciones *in vitro*, luego de 28 días de cultivo.

	Concentraciones TDZ ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )			Concentraciones 6-BAP ( $\mu\text{M L}^{-1}$ )				
	0,00	0,22	0,45	0,00	2,22	4,44	6,66	8,88
Explantos brotados por tratamiento (%)	50	60	35	20	10	10	10	10
Promedio de brote/explante brotado	1	1	2	1	1	1	1	1



**Figura 4.** (A) Brote de *V. allenii* inducido con 6-BAP. (B) Brote de *V. allenii* inducido con TDZ.

## Conclusiones

En ambas especies se logró el establecimiento *in vitro* utilizando el  $HgCl_2$  como agente desinfectante. Se concluye que el WPM 100 % de fuerza iónica es el mejor medio de cultivo para el desarrollo de *T. amazonia*; mientras que para *V. allenii* el mejor medio de cultivo es WPM 50 % de fuerza iónica. Además, se logró la inducción de brotes a partir de segmentos nodales. Sin embargo, los datos obtenidos en ambas especies sugieren que la multiplicación partir de segmentos nodales resulta en baja frecuencia de brotación de los nudos. Lo anterior, las clasifica como especies altamente recalcitrantes o difíciles de establecer en condiciones *in vitro*. Es importante destacar que sí es posible su establecimiento en condiciones *in vitro* y que se deben estudiar otras metodologías de multiplicación que permitan la propagación del material ya establecido.

## Referencias bibliográficas

- Abdelnour, A.; Muñoz, A. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: *Revista Forestal* (Costa Rica). 2(5): 1- 11.
- Agramonte, D.; Delgado, L.; Trocones, A.; Pérez, M.; Ramírez, D.; Gutiérrez, O. 2001. Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales. *Bioteología vegetal*. 1(2): 109-114.
- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de Plantas, Cuba. p 81-104.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación en explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*. 20(1): 153-175.
- Daquinta, M.; Gregori, A.; Cid, M.; Lezcano, L.; Sagarra F. 2007. Formación de callos e inducción de brotes a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua angustifolia* Kunth. *Bioteología Vegetal*. 7(2): 119-122.
- Daquinta, M.; Ramos, L.; Lezcano, L.; Rodríguez, R.; Escalona, M. 2000. Algunos elementos en la propagación de la teca. *Bioteología vegetal*. 1: 39-44.
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, C. 2009. Infostat versión 2009. Grupo Infostat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Estopá, BM. 2005. El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa de plantas de vivero. *Viveros Revista Extra*. Pp. 50-56.
- Flores, E.; Obando, G. 2003. Árboles del trópico húmedo: importancia socioeconómica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago. 920 p.
- George EF.; Hall MA.; De Klerk, G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3ra Ed. Springer, The Netherlands. 501 p.
- Lloyd, G; McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int Plant Prop Soc. Proc.* 30: 421- 427.
- Méndez, D.; Abdelnour, A. 2014. Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* (Costa Rica). 11(27): 7-21.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- OFI (Oxford Forestry Institute) y CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2003. *Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas*.UK. 1 disco compacto. 1079p.
- Pandey, S.; Singh, M.; Jaiswal, U.; Jaiswal, V. 2006. Shoot initiation and multiplication from a mature tree of *Terminalia arjuna* roxb. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 42: 389-393.
- Pijut, PM.; Beasley, RR.; Lawson, SS.; Palla, KJ.; Stevens, ME.; Wang, Y. 2012. *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species - A Review (2001-2011). *Propagation of Ornamental Plants*. 12(1): 25-51
- Quesada, F.; Jiménez, Q.; Zamora, N.A.; Aguilar, R.; González, J. 1997. *Árboles de la Península de Osa*. Heredia, CR, INBio.
- Ramesh, M.; Pavan, U.; Venugopal, K.; Sadanandam, A. 2005. Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb. A sericulture and medicinal. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 41: 320-323.
- Ravi, M.; Ramanjaneyulu, P; Rao, A. 2014. Micropropagation of *Terminalia arjuna* Roxb. from nursery plant material. *International Journal of Emerging Trends in Science and Technology*. 01(07): 997-1004.
- Smith, R. 2000. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. 2<sup>da</sup> Edición. San Diego, USA. Academic Press. p 231.
- Zamora, N.; Jiménez, Q.; Poveda, I.; Aragón, C. *Árboles de Costa Rica*. Heredia, INBIO, Costa Rica. 2003.