

**Propagación *in vitro* de material seleccionado
de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo)
y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal Cafetero)***

3er. puesto en Biotecnología Agropecuaria - II Congreso Colombiano de Biotecnología

***In vitro* propagation of *Tabebuia rosea* (Bertol. DC)
(large spreading cedar) and *Cordia alliodora*
(Ruiz & Pav.) Oken (coffee-shading walnut)**

Ingrid Schuler G. **, *Sonsire Baquero O.* ***, *Diego Gaona T.* ***, *Enrique Vega G.* ***, *Javier Rodríguez R.* ***, *Claudia Ramírez S.* **, *Víctor Nieto R.* ***, *Elizabeth Hodson de Jaramillo* **

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo multiplicar y mantener *in vitro* plantas de *Tabebuia rosea* y de *Cordia alliodora*, a partir de semillas de cinco árboles plus de la primera especie y uno de la segunda. A partir de este material se seleccionaron plantas núcleo (PN), Yemas apicales de las plantas núcleo obtenidas, fueron removidas y cultivadas bajo condiciones *in vitro* hasta producir 1480 plantas de las dos especies. El proceso de aclimatación del material vegetal se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero, en cámaras húmedas ubicadas en la estación experimental "Bambusa" en Pacho, Cundinamarca. Para el manejo de la información, se diseñó una base de datos en el programa Access, Microsoft Office®, con el fin de monitorear y evaluar el comportamiento de cada uno de los individuos durante el desarrollo *in vitro*, por medio del cálculo de tasas de velocidad de multiplicación (TVM), tasa de pérdida (TP) y tasa de eficiencia del proceso (TE). Este material será entregado a Conif para el establecimiento de la primera plantación de origen *in vitro*, que será utilizada posteriormente para ensayos de propagación vegetativa, análisis de pruebas clonales y moleculares.

Palabras clave: Micropropagación y colección *in vitro*, *Tabebuia rosea*, *Cordia alliodora*.

ABSTRACT

This work was aimed at multiplying and maintaining *in vitro* plants from seedlings from five *Tabebuia rosea* (large spreading cedar tree) from and one *Cordia alliodora* (walnut tree used for providing shade for coffee plantations). Apical leaf buds were excised from mother plants (MP) and cultured *in vitro* until 1480 plants had been produced from the two species. The hardening process was carried out in greenhouse conditions using humid flow-chambers at Geoambiente Ltda's Bambusa experimental station in Pacho, Cundinamarca. A database was created using Microsoft Office Access software for handling information required for monitoring and evaluating each plant's behaviour during the *in vitro* culture process by calculating the rates of multiplication (RM) and loss (RL). The plants so produced will be used by Conif for field trials and evaluation purposes. This material will then be multiplied by vegetative propagation and used for clone and molecular testing analysis.

Key words: *in vitro* collection and propagation, *Tabebuia rosea*, *Cordia alliodora*.

* Proyecto "Investigación en Biotecnología Forestal". Convenio Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – Conif No. 042-03.

** Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Unidad de Biotecnología Vegetal. Carrera 7ª No. 40-62, Ed. 53-54, Bogotá, Colombia. PBX 3208320, Ext. 4126-4088. Correo electrónico: ishuler@javeriana.edu.co

*** Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal (Conif), Área de Biotecnología Forestal. Avda. Circunvalar No. 16-20, Venado de oro, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: sonsire.baquero@rebiofor.org (PBX: 3417000 Ext: 123).

Recibido: octubre 26 de 2004 **Aceptado:** junio 09 de 2005

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se enmarca dentro de la "Política de estímulo a la reforestación comercial" del Plan Nacional de Desarrollo 2003-2006, descrita en el documento "Hacia un estado comunitario", con el fin de priorizar y dar cumplimiento a los programas de investigación, mejoramiento genético y biotecnología forestal (Conpes, 2003). Se ha propuesto que para el año 2008 los planes de reforestación en Colombia contemplen el establecimiento de 8300 hectáreas de plantaciones con especies forestales definidas en el documento Conpes (2002), dentro de las cuales se incluyen *Tabebuia rosea* (roble, ocobo, flor morado) y *Cordia alliodora* (nogal cafetero), dos especies forestales nativas importantes en los planes de reforestación nacional (Conif, 1998), por la excelente calidad de su madera (Liegel y Stead, 1990; Ritcher y Dallwitz, 2000), rápido crecimiento con respecto a otras especies forestales y adaptabilidad a una amplia variedad de suelos. No obstante, para algunas de ellas no se cuenta con suficiente material de siembra de buena calidad para satisfacer estas necesidades y suplir la demanda media anual (BIRF *et al.*, 1999).

La producción de material seleccionado de especies forestales requiere, por una parte, un mayor conocimiento de la biología reproductiva así como de los condicionamientos fisiológicos que influyen en la capacidad morfogénica en relación con la juvenilidad de los materiales (Hodson de Jaramillo *et al.*, 2004). Así mismo, no es frecuente encontrar en la naturaleza estados juveniles en árboles adultos como fuente de material para propagación, aunque para algunas especies puede ser resuelto a través de la obtención de rebrotes de tocón, brotes epicórmicos, podas a ras de suelo, enraizamiento seriado de estacas, injertos y etiolación (Carrizosa y Serrano, 1996). Ante este panorama, la biotecnología se presenta como una alternativa para la producción y mejoramiento de especies forestales.

En la silvicultura mundial, la aplicación de técnicas de micropropagación en especies forestales de uso maderable ha constituido una alternativa muy útil para aumentar el número de plantas requeridas para el establecimiento de plantaciones en los programas de propagación masiva (ITTO, 2001), protección y aprovechamiento (Kirk, 1996; IITO, 1997; Adams, 2002). Así mismo, para aquellas en que su

comportamiento es más recalcitrante, el desarrollo de sistemas de propagación vegetativa mediante micropropagación y embriogénesis somática *in vitro* permite la obtención masiva de clones de genotipos seleccionados (Hartmann *et al.*, 1997). Bajo estas condiciones es posible producir material vegetal en cualquier época del año y entregarlo de acuerdo con el programa de siembra establecido por el reforestador.

Un estudio previo desarrollado para la propagación *in vitro* de material vegetal seleccionado de *Tabebuia rosea* y *Cordia alliodora* en 2003 (Conif, 2003, 2004; Ramírez *et al.*, 2004) permitió ajustar protocolos de este material en cultivo *in vitro*. Sobre la base de estos resultados se planteó la presente investigación en la cual fue posible la producción de plantas de *Tabebuia rosea* y *Cordia alliodora* a partir de semillas de árboles plus. Todo el proceso para la obtención de plantas endurecidas se ajustó y su monitoreo se sistematizó por medio del diseño e implementación de una base de datos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación corresponde a un estudio mixto con tres componentes: la micropropagación de material vegetal (I), el diseño e implementación de la base de datos del proceso (II) y el análisis de la información (III). Se debe señalar que la base de datos se construyó simultáneamente al proceso de micropropagación, el cual tuvo 8 fases (tabla 1). La fase 4, multiplicación, se dividió a su vez en tres subfases, denominadas ciclos de propagación. En la tabla 1, se presentan la población de estudio y las variables dependientes de cada fase del proceso de micropropagación de *T. rosea* y *C. alliodora*.

Con base en las variables evaluadas se realizó un estudio con modelo al azar, utilizando un diseño factorial $n \times 6 \times 6$, con n individuos por repetición, 60 repeticiones (PN de cada árbol) y 6 niveles (6 árboles) del factor 1: procedencia.

Micropropagación de material vegetal. El material vegetal se obtuvo a partir de la germinación de 1500 semillas de tres árboles plus de *Cordia alliodora* (RM, RIV 1-2 y RIII 1-6) y 5000 semillas de cinco árboles plus de *Tabebuia rosea* (24, 35, 41, 44 y 47), seleccionados por el programa de Mejoramiento

Tabla 1. Población y variables evaluadas en el proceso de micropropagación

Fase	Tipo de fase	Población	Variables
1	Germinación	Semillas	% germinación
2	Establecimiento de PN	Plántulas	LPA
3	Introducción <i>in vitro</i>	Yemas apicales	TP
4	Multiplicación <i>in vitro</i>	Explantos	TP, TVM
M1	Ciclo de propagación 1	Explantos	TP, TVM
M2	Ciclo de propagación 2	Explantos	TP, TVM
M3	Ciclo de propagación 3	Explantos	TP, TVM
5	Enraizamiento <i>in vitro</i>	Plantas	TP
6	Aclimatización <i>ex vitro</i>	Plantas	% supervivencia
7	Endurecimiento	Plantas	% supervivencia
8	Rustificación	Plantas	% supervivencia
Proceso de micropropagación		Plantas	TE

LPA: longitud parte aérea, TP: tasas de pérdida, TVM: tasa de velocidad de multiplicación, TE: tasa de eficiencia.

Genético de Comfore (Conif-MADR, 1998; Ipinza, 1998).

Fase 1. Germinación. Las semillas de cada uno de los árboles seleccionados de *T. rosea* y de *C. alliodora* se desinfectaron y sembraron en bandejas plásticas transparentes Rubbermaid® de cierre hermético utilizando como sustratos mezcla de suelo y arena de río, turba y arena de río en proporción 1:1 y turba 100%. En esta fase se calculó el porcentaje de germinación para cada árbol durante 60 días, así: (Número de semillas germinadas/Número de semillas sembradas) * 100.

Fase 2. Establecimiento y selección de plantas núcleo. Sesenta días después de la germinación, de 200 plántulas obtenidas, 60 con longitud de la parte aérea (LPA) entre 3 y 5 cm fueron seleccionadas, individualizadas y trasplantadas, utilizando turba y arena (1:1) como sustrato. Los árboles de RIV 1-2 y RIII 1-6 de *C. alliodora* no entraron en esta fase, pues no respondieron en la fase de germinación.

Fase 3. Introducción *in vitro* de yemas apicales de PN. Yemas apicales de PN de 60 días de

germinadas, y con 2 láminas foliares, fueron introducidas *in vitro* en medio MS/2, suplementado con ácido ascórbico y cítrico (100 mg/L). Los explantes se incubaron a una temperatura de 27 °C ± 5, 16/8 h luz/oscuridad y HR del 58,6% por 30 días.

Fase 4. Multiplicación *in vitro*. Después de 30 días de la introducción *in vitro* de explantes (yemas apicales, nudos y/o brotes), se seccionaron y transfirieron a MS/2 con 0,47 μM de ácido giberélico (GA₃) y 6,04 μM de kinetina (KIN) y se mantuvieron en las mismas condiciones de la fase 3. En esta fase se calculó la TP y la TVM para cada uno de los ciclos de propagación (M1, M2 y M3).

El número de ciclos se definió con base en la respuesta de los explantes a las condiciones establecidas *in vitro*; cada ciclo tuvo una duración de 30 días. Dentro de la fase de multiplicación se definió el número de ciclos de propagación o número de multiplicaciones necesarias para la obtención de plantas completas.

Tasa de pérdida (TP): relación entre el número de explantes totales perdidos sobre el número de explantes introducidos (en una misma fase).

Tasa de velocidad de multiplicación (TVM): relación entre el número de explantes obtenidos al final del ciclo menos el número de explantes introducidos al ciclo de la fase de multiplicación, sobre el tiempo (t) de duración del ciclo: $TVM = (\text{No. explantes finales en el ciclo} - \text{No. explantes introducidos al ciclo}) / t$.

Fase 5. Enraizamiento *in vitro*. Yemas apicales que presentaban a los 30 días, en medio de enraizamiento, dos láminas foliares bien diferenciadas, fueron subcultivadas y mantenidas en medio MS básico, con carbón activado 2 g/L y sacarosa 15 g/L entre 30 y 40 días. El desarrollo de raíces adventicias en los explantes determinó el momento de la transición a la fase de aclimatización *ex vitro*.

Fase 6. Aclimatización ex vitro. Plantas micropropagadas con 30 días en fase de enraizamiento *in vitro* fueron trasplantadas a turba. Previo a la siembra, las raíces de la planta con longitudes superiores a 2 cm fueron recortadas dejándolas de un tamaño de 2 cm. En esta etapa se emplearon los protocolos definidos por Ziv (1991) y Donnelly y Tisdall (1993).

La duración de esta fase fue de 30 días después del trasplante, y las plantas se mantuvieron en cámaras húmedas, en condiciones de 100% de HR utilizando una cubierta de polietileno de baja densidad con aditivo UV Agrolene® de calibre 6; riego por nebulización (10 psi) y temperatura de 25 ± 6 °C. Sobre las cámaras húmedas fue necesario instalar una malla polisombra del 70% (Alumitex®).

Fase 7. Endurecimiento. Plantas micropropagadas de 30 días de trasplante se trasladaron al exterior de la cámara húmeda (HR 40-60%), en condiciones de invernadero. El riego se suministró a capacidad de campo, utilizando sombra del 70%, con temperatura media de 25 °C. Esta fase tuvo una duración de 30 días.

Fase 8. Lignificación. La lignificación duró 30 días. El material vegetal endurecido se transplantó a bolsas de polietileno calibre 1,75, utilizando una mezcla de tierra negra cernida y abonada (Soil AID-abono orgánico 50 g/) como sustrato.

El desarrollo de las fases 6, 7 y 8 se llevaron a cabo en el invernadero No. 1 de la estación experimental "Bambusa", ubicada en el Municipio de Pacho (Cundinamarca), a 1350 m.s.n.m y 25 °C de temperatura promedio.

Porcentaje de supervivencia: número de plantas de cada 100 que sobreviven en una fase.

Tasa de eficiencia (TE): relación de la diferencia entre el número de explantes obtenidos menos el número de explantes introducidos sobre el tiempo (t) de todo el proceso de micropropagación.

La investigación se propuso conocer cuál fue el efecto de la procedencia de la especie (factor 1) sobre la germinación de semillas (%G) de árboles

seleccionados de *T. rosea* y *C. alliodora*, sobre la tasa de pérdida (TP) y la tasa de velocidad de multiplicación (TVM) en las fases de introducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro*, y sobre la eficiencia tasa de eficiencia del proceso de producción *in vitro* del material vegetal seleccionado de *T. rosea* y *C. alliodora*.

Diseño e implementación de la base de datos. La base de datos es un conjunto de registros y archivos organizados y relacionados para apoyar los procesos de micropropagación en el laboratorio. Para el diseño orientado a objetos (Barker, 1994) se identificaron las fases, PN, lotes de explantes y medios de cultivo, es decir, los componentes que de manera independiente o relacionados entre sí juegan un papel en la respuesta del material en condiciones *in vitro*.

Para el ingreso de las Plantas Núcleo se definió un código alfanumérico compuesto así: Tr024PNn donde n es un explante (planta núcleo), aproximadamente 60 provenientes de árboles plus, el ejemplo correspondiente al No. 24 de *T. rosea*. De forma análoga se asignó un código a las fases, los lotes de explantes y los medios de cultivo.

En la base se incluyeron seis fases del proceso de micropropagación, desde la introducción hasta la aclimatización, y se registraron las pérdidas por necrosis, vitrificación, oxidación, deshidratación o intoxicación.

Formulario de ingreso de datos o interfaz de la base de datos. El formulario de ingreso de datos (figura 1) permite introducir información básica del proceso.



Figura 1. Formulario de ingreso de datos.

Se ingresaron más de 10000 datos, generados por la clonación de Plantas Núcleo, número de lotes sembrados, tipos de medios de cultivo, principalmente datos de referencia. Algunos datos se consiguieron con la frecuencia sugerida por el ritmo de producción y otros se determinaron por los cronogramas estipulados por los usuarios. La información ingresada en este formulario permitió la consulta inmediata y la emisión de informes escritos para la evaluación del proceso y la toma de decisiones.

Formulario de Plantas Núcleo (PN). El formulario se diseñó para el registro de las PN (figura 2).

Formulario de Ingreso de Lotes. El diseño relacional permite identificar la unidad de muestreo o lote de explantes, la cual corresponde a los grupos de material vegetal homogéneo en términos de identificación, fase y fecha. En este formulario (figura 3) el sistema asigna un número serial al lote de explantes, posteriormente se debe indicar fase, código de PN, cantidad de explantes, número de siembra, código de medio de cultivo y fecha de entrada.

Análisis de la información. En cada fase se tomaron los datos para cada variable dependiente, teniendo en cuenta el tipo de muestra y de población de estudio.

Figura 2. Formulario de Plantas Núcleo.

La unidad de muestreo estuvo representada por tres lotes de explantes. Cada PN constituye una repetición, es decir que cada árbol tiene 60 repeticiones que obedecen a 60 Plantas Núcleo.

Para cada árbol se realizó un Anova sencillo (modelo aleatorio simple) y una prueba Duncan para calcular la significancia de los datos en cada fase y la comparación entre medias.

Identificación	Fase	ID Planta Núcleo	Cantidad de Explantes	Número de Siembra	Código de Medio de Cultivo	Fecha de Entrada
5098	Acimatización	Tr04#N467	3	0	Turba	26/04/2004
5099	Acimatización	Tr04#N171	3	0	Turba	26/04/2004
5100	Acimatización	Tr04#N488	2	0	Turba	26/04/2004
(Autonumérico)	Introducción		3	0	MC001	16/09/2003

Figura 3. Formulario de Lote de Explantes.

Utilizando el *modelo aleatorio simple* se evaluaron las variaciones de respuesta del factor procedencia, correspondiente al modelo por tratamientos definidos (niveles de procedencias), en las TP, TVM y TE.

Para corroborar las diferencias entre tratamientos (procedencias) dadas por el modelo, se realizó la prueba de rango múltiple Duncan.

Los datos se analizaron en el programa estadístico Statistical Analysis System (S.A.S) (Release 6.12 TS Level 0020), utilizando el procedimiento de modelos lineales (GLM).

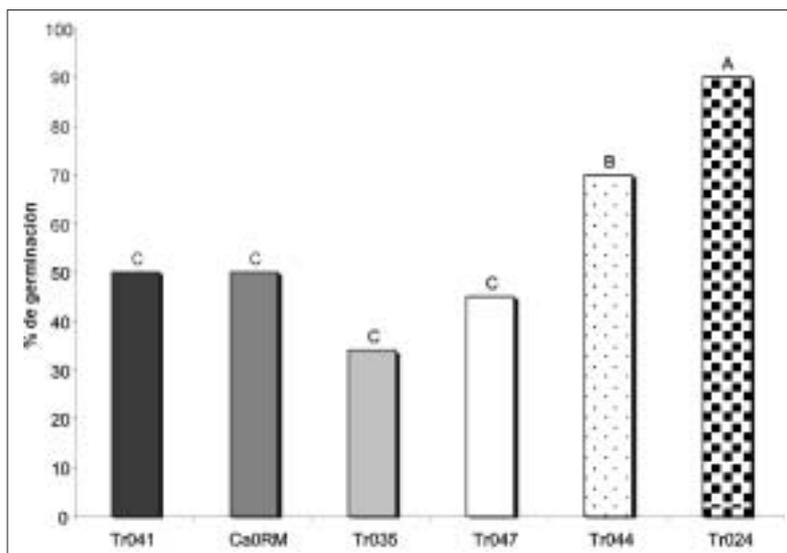


Figura 4. Porcentaje de germinación de semillas de los árboles Plus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Micropropagación del material vegetal y análisis de la información. A partir de 53 PN por árbol establecidas *in vitro* se obtuvo un promedio de 4 copias (clones) por PN, para un total de 1406 plantas, obtenidas en el proceso de micropropagación (tabla 2).

Fase 1. Germinación. En la figura 4 se observa que existieron diferencias significativas a nivel de porcentaje de germinación entre árboles y especies. Estos resultados coinciden con los trabajos de (Conif-MADR, 1998), en los cuales también se ha

observado el efecto de la procedencia sobre la germinación en estas especies. Los mejores valores de (%) de germinación correspondieron al árbol 24 de *T. rosea*, los cuales fueron significativamente diferentes a los presentados por los demás árboles de esta especie. Las semillas de los árboles RIV 1-2 y RIII 1-6 de *C. alliodora* presentaron 0% de germinación. En el estudio no se observó el efecto del sustrato sobre la germinación, lo que demuestra que el único factor a tener en cuenta es la procedencia del material, resultado similar al obtenido en otros estudios con estas mismas especies (Conif, 1998).

Tabla 2. Inventario final de material vegetal de *T. rosea* y *C. alliodora*. Promedio de plantas clonadas por plantas núcleo

Árbol	PN establecidas	Plantas obtenidas* Árbol	Plantas clonadas* PN	
			Valor	Aproximación
CaRM	47	134	2,85	3
Tr024	47	252	5,36	5
Tr035	56	261	4,66	4
Tr041	58	317	5,47	5
Tr044	60	222	3,70	3
Tr047	53	220	4,15	4
Promedio	321	1406	4,38	4

PN: Planta Núcleo.

Fase 2. Selección y establecimiento de Plantas Núcleo (PN). Se seleccionaron 300 plántulas de *T. rosea* y 60 de *C. alliodora*, las cuales se definieron como Plantas Núcleo (PN). Estas plántulas se caracterizaron por su rápida germinación, entre 9 y 15 DDS, láminas foliares bien desarrolladas y rectitud en el tallo. A partir de esta fase se estableció la nomenclatura para conservar la procedencia del material vegetal y la identidad de las plantas clonadas. Las PN se mantuvieron como fuente constante de explantes durante los 10 meses del estudio.

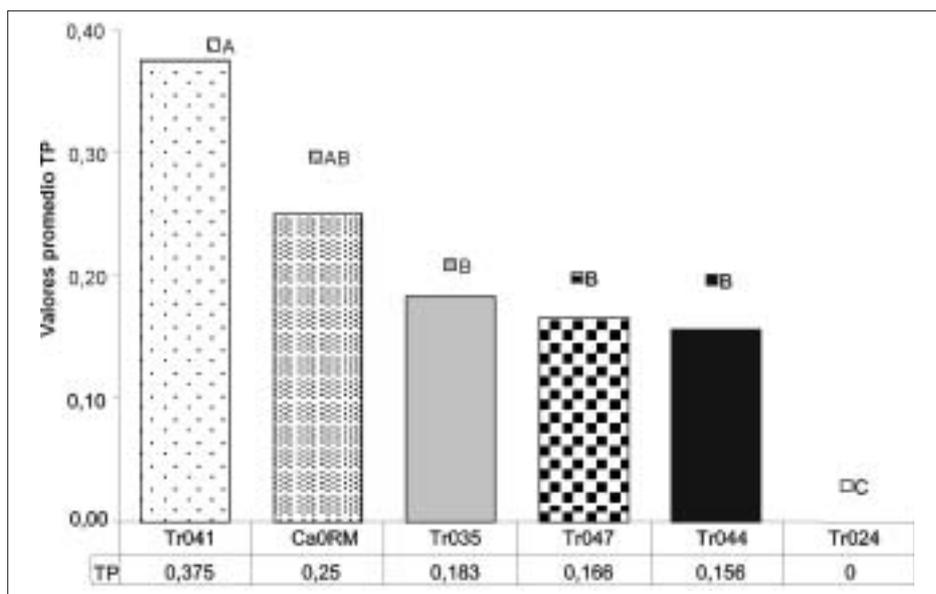


Figura 5. Tasa de pérdida de explantes durante el proceso de micropropagación de *T. rosea* y *C. alliodora*.

Fase 3. *Introducción in vitro*. Durante la fase de introducción *in vitro* se observó que las yemas apicales de las PN del árbol 24 de *T. rosea* (Tr024) presentaron la menor TP (0), mientras que las del árbol 41 mostraron la mayor (90%). Los explantes obtenidos de árboles 35,44 y 47 mostraron valores TP similares agrupados por la prueba Duncan (figura 5). La tasa de pérdida (TP) permitió ponderar qué cantidad de

material inicial se requiere para iniciar el proceso de micropropagación.

Multiplicación in vitro. En esta fase se calcularon las TVM y la TP en cada ciclo de propagación (M1, M2 y M3). Igualmente la base de datos generó estimaciones de la TVM, las cuales son muy aproximadas al valor estadístico calculado. En la tabla 3 se puede observar que el valor TVM estadístico promedio para Tr-024 fue de 0,82 y que el valor arrojado por la base de datos fue de 0,87. Lo mismo ocurre con Tr-35, Tr-044 y Tr-047, lo que confirma la utilidad de la base para la toma de decisiones y el control del proceso.

Ciclo de propagación M1: los explantes del árbol 24 presentaron la mayor TVM (0,86 explantes/día), significativamente superior a la TVM de los demás árboles. Los provenientes de los árboles 41 y 44 mostraron la más baja TVM y al ser analizados entre sí, mostraron resultados estadísticamente comparables. Los explantes provenientes del árbol RM mostraron la mayor TP (0,27 explantes/día).

Ciclo de propagación M2: en esta fase también se observaron diferencias significativas entre árboles. Los explantes provenientes del árbol 24 presentaron nuevamente una mayor TVM, mientras que los que derivan de los árboles Tr044 y Tr041 mostraron la tasa más baja de TVM (figura 5). La mayor TP correspondió a los explantes de los árboles 44 y 47 de *T. rosea*, mientras que los

Tabla 3. Resultados de la prueba Duncan y de la base de datos, en los ciclos de propagación, en la fase de multiplicación

TVM	Tr-24	Tr-35	Tr-41	Tr-44	Tr-47	Ca-RM P<X
M1	0,86 a	0,32 bc	0,24 bc	0,26 c	0,35 bc	0,57 b**
M2	0,77 a	0,72 ab	0,32 d	0,50 dc	0,54 bc	*
M3		0,81 a	0,64 a	0,79 a	0,96 a	*
	1,63	1,85	1,19	1,55	1,85	0,57
Promedio SAS	0,82	0,62	0,40	0,52	0,62	0,57
VALORES RESULTADOS EN LA BASE DE DATOS (VBD)						
TVM* Semana	6,12	3,57	1,38	3,38	4,28	
VBD	0,8745	0,5097	0,1964	0,4834	0,6112	

TVM: Tasa de Velocidad de Multiplicación
 * P < 0.05
 ** P < 0.001

árboles 35 y 24 mostraron una mejor respuesta (0,77 y 0,92 explantes/día).

Ciclo de propagación M3: a diferencia de los anteriores ciclos, en el ciclo M3 no se observaron diferencias significativas entre explantes de los árboles de *T. rosea* en cuanto a la TVM. Los datos entre estos variaron entre 0,95 y 0,63 explantes/día, lo que sugiere que al alcanzar el tercer ciclo de propagación el material vegetal logra una aclimatación al ambiente *in vitro* independiente de la procedencia, y es factible que se tenga un umbral de capacidad morfo genética similar para muchos árboles (figura 6).

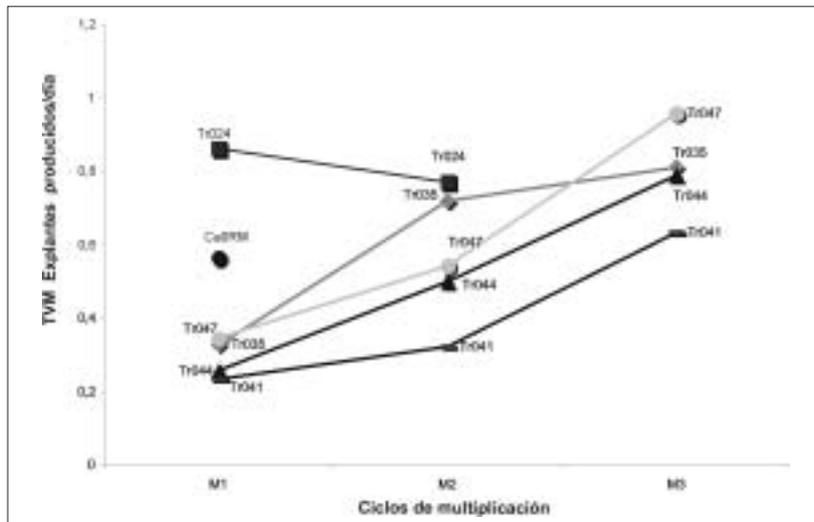


Figura 6. TVM en los ciclos M1, M2 y M3.

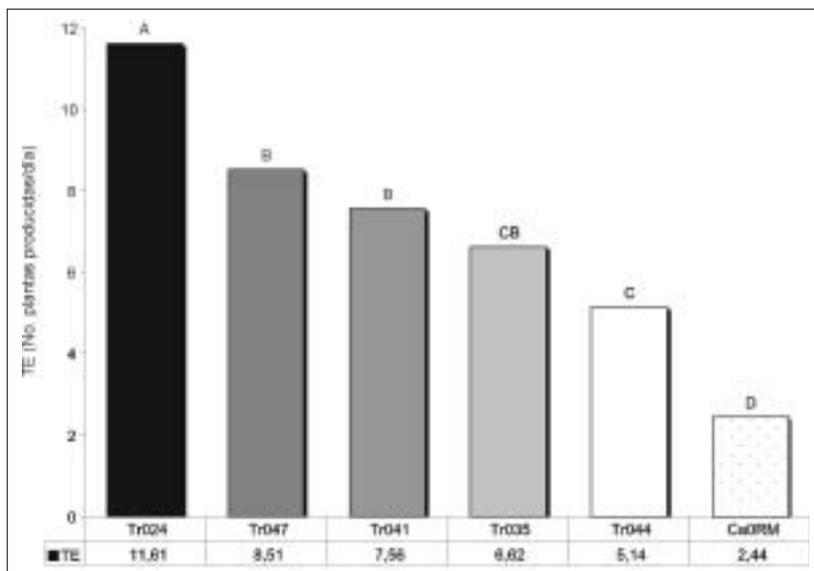


Figura 7. TE del proceso de micropropagación para los árboles 35, 41, 44 y 47 de *T. rosea* y RM de *C. alliodora*.

En M3, los árboles de *T. rosea* aumentaron su TVM. Por ejemplo, para el árbol 41 en el ciclo M1 su TVM fue de 0,25 explantes/día, en M2 fue de 0,54 explantes/día, es decir, dos veces la TVM de M1, y en M3 asciende a 0,9 explantes/día, o sea dos veces la TVM de M2. De lo anterior se deduce que la capacidad morfo genética aumenta a través de los subcultivos (Hartmann *et al.*, 1997).

Al analizar el comportamiento de los explantes provenientes de los 5 árboles de *Tabebuia rosea* durante todo el proceso, se observa que la TVM muestra una tendencia creciente (figura 6). Para el árbol 24 los resultados son excepcionales, pues el total de copias producidas se obtuvieron en el ciclo M2, mientras que para los demás árboles fue necesario extender el proceso en un ciclo adicional (M3).

Fase 5. Enraizamiento in vitro. En la fase de enraizamiento se presentó pérdidas de material vegetal en *C. alliodora*, sin observarse el efecto de la procedencia sobre las TP, pero sí el efecto de la especie; la TP en *T. rosea* tiende a ser nula.

Fase 6. Aclimatación ex vitro. *Fase 7. Endurecimiento y Fase 8. Lignificación.* En las tres últimas fases no se presentaron pérdidas significativas de material vegetal, solamente hubo pérdidas de plantas con tamaño inferior a 1 cm, lo que representa un 1% de pérdida.

Tasa de eficiencia. Con base en la TE para cada árbol de *T. rosea* y de *C. alliodora* (figura 7) se concluye que *T. rosea* muestra un mejor comportamiento comparada con *C. alliodora*, con base en el protocolo de propagación clonal *in vitro* establecido en este estudio; dado que no se dispone de información sobre la eficiencia de propagación para esta especie por métodos convencionales, los resultados

obtenidos en este estudio no pueden compararse con los anteriores.

El árbol 24 de *T. rosea* se destaca por su comportamiento durante todo el proceso de propagación. Sin embargo, se hace necesario corroborar esta afirmación con el uso de herramientas moleculares.

El árbol CaRM presentó una TE inferior y significativamente diferente a los demás árboles de *T. rosea*, de acuerdo con los resultados de un estudio (Conif, 2003; Conif, 2004; Ramírez *et al.*, 2004), parece ser que *C. alliodora* es una especie recalcitrante en cultivo de tejidos (Marulanda *et al.*, 2000), con baja capacidad morfogénica.

A partir de 300 plantas y con una TE de 7,89 es posible obtener 2840 plantas en 10 meses, lo que significa que para producir 28800 plantas se requieren 3650 plantas al inicio del proceso, teniendo en cuenta que no se suceden pérdidas en la fase de introducción.

Con la TP promedio en la fase de introducción *in vitro* se puede calcular el porcentaje de pérdidas del material vegetal introducido; es decir, de 300 PN, 52 plantas fueron eliminadas por diferentes causas; este 18% representa pérdidas sobre la cantidad inicial de explantes; entonces, para lograr la producción de 28800 plantas se requieren 5184 plantas (PN) iniciales o explantes, de acuerdo con el protocolo a seguir.

Diseño e implementación de la base de datos. La base de datos diseñada por el proyecto permitió el seguimiento de los resultados asociados a un lote de explantes, lo cual facilita el manejo de la información del proceso de micropropagación, desde la fase de introducción hasta la fase de aclimatación *ex vitro*. Con base en la información consignada en el *screen shot* de la figura 8, es posible dar seguimiento al lote de la planta núcleo 3 del árbol 41 de *T. rosea*, iniciando con el lote ID 3136 en la fase de introducción y terminando en el lote ID 4702 en la fase de aclimatación.

Tabla 4. TP y TE estimadas para el cálculo de producción durante 10 meses

Tasa de pérdida (TP)		Tasa de eficiencia (TE)	
Árboles	Explantes/Lote	Árboles	Plantas/D
Tr041 A	0,375	Tr024 A	11,613
Tr035 B	0,183	Tr047 B	8,5105
Tr047 B	0,166	Tr041 B	7,5673
Tr044 B	0,156	Tr035 CB	6,6255
Tr024 C	0	Tr044 C	5,1458
Σ =	0,88	Σ =	39,4621
TP promedio	0,18	TE promedio =	7,89
	TE promedio * 300 D (10 meses) = 2367 plantas		

Formulario de resultados. Este formulario lo componen campos categorizados (figura 9), mediante los cuales se hace el registro de un resultado a un lote específico, teniendo en cuenta la codificación del material y la respuesta en cada fase, con el fin de disponer de manera actualizada del estado de los lotes de explantes de producción.

Figura 8. Información de seguimiento.

Figura 9. Formulario de registro de resultados.

La información debe ser coherente con los ingresos anteriores, por ello cada vez que se genera un nuevo resultado se registra con un número que hace referencia a un lote de explantes, al tipo de resultado y a la fecha en la cual ocurrió. Así, el programa determina automáticamente la duración en días para calcular las tasas posteriormente.

Como resultado de este componente se deben tener en cuenta la base de datos en CD, manual de la base de datos, informes de resultados de la base de datos, tablas de datos consolidados en Excel para análisis estadísticos (SAS), inventarios en Excel de material vegetal en aclimatización procedentes de la base de datos de Access.

Formulario de consulta de datos.

Con este formulario (figura 10) se emitieron los informes, los cuales arrojaron información organizada sobre cantidades de lotes de explantes, resultados y sus causas, tipos de fase, y combinaciones de los anteriores.

En la figura 11 se observa el modelo de los informes generados automáticamente de las tasas de multiplicación de cada PN y de cada árbol en resumen. Se presenta el cálculo de los lotes de explantes con el mismo código, en fechas distintas, y se obtiene así el valor promedio de la TVM.

La base de datos estuvo sujeta a cambios a medida que el proceso iba adquiriendo niveles de complejidad. El actual diseño de la base funciona y se aplica al modelo planteado.

Figura 10. Formulario de consulta, programa diseñado en Microsoft Access®.

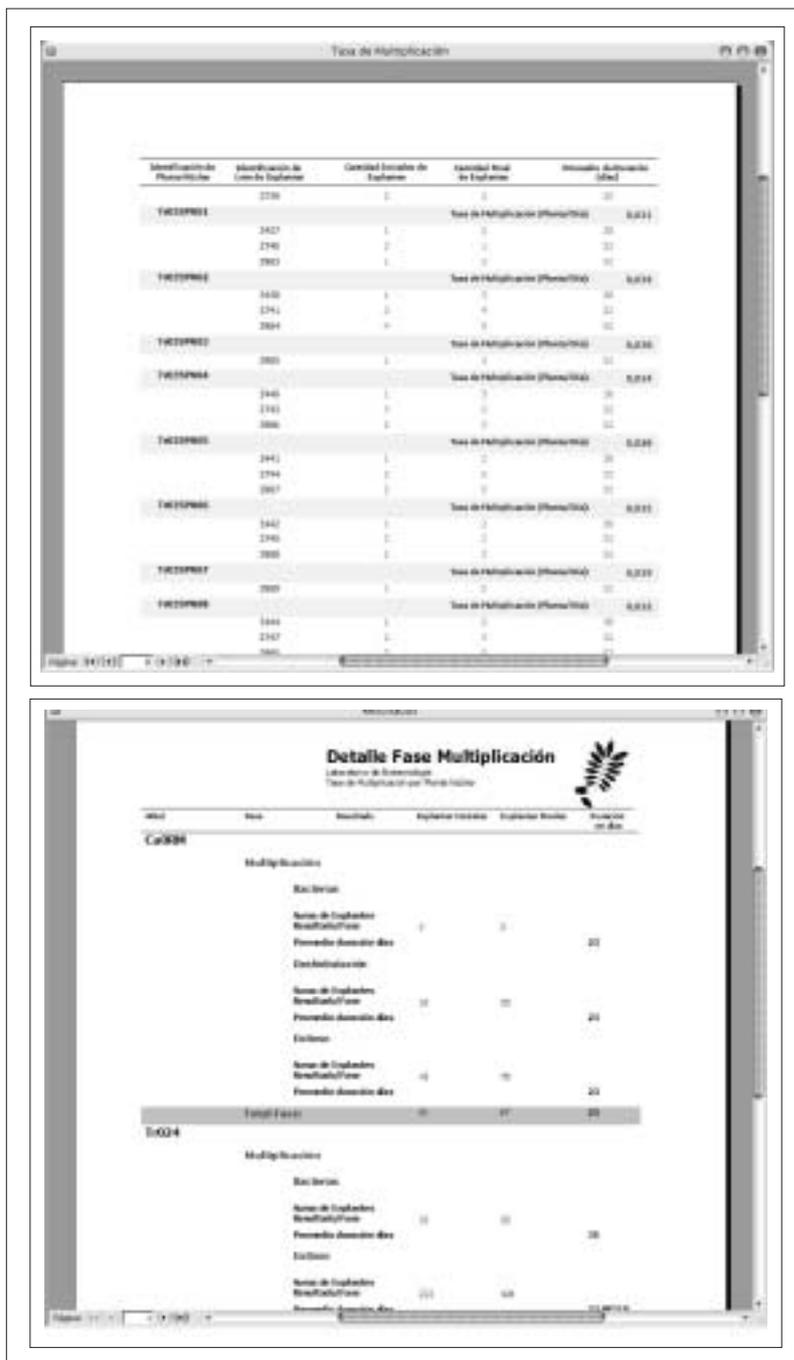


Figura 11. a) Informe de tasas de multiplicación. b) consolidados para la fase de multiplicación.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo constituyen un aporte técnico y productivo al Programa de Mejoramiento Genético Forestal de Conif, el cual incluye las especies

forestales de este estudio. La producción *in vitro* de material vegetal seleccionado de *T. rosea* confirma la pertinencia de la micropropagación de especies forestales seleccionadas y mejoradas que presentan dificultades de propagación a través del uso de técnicas convencionales.

Un total de 1296 plantas de *T. rosea* se obtuvieron *in vitro* a partir de 300 PN de cinco árboles plus (24, 35, 42, 44 y 47) y 134 plantas de *C. alliodora* a partir de 60 PN del árbol plus RM. Este material vegetal fue aclimatizado, endurecido y rustificado en la estación experimental “Bambusa”, en Pacho (Cundinamarca), y allí será plantado como la primera colección de origen *in vitro* de estas especies.

El uso de la biotecnología para la propagación clonal de especies forestales constituye una estrategia de apoyo a la silvicultura con estructura familiar. Igualmente, la construcción de la base de datos para el monitoreo de la micropropagación de estas especies permitió la consulta oportuna sobre el comportamiento de cada individuo en cada etapa del proceso y en consecuencia la toma de decisiones para la optimización del mismo. Es de señalar que los resultados que arroja la base de datos en cada una de las etapas coincide con los datos estadísticos obtenidos.

De los árboles evaluados de *T. rosea*, el árbol 24 presentó las más bajas TP y resultados superiores a los demás árboles en términos de la TVM durante todo el proceso. Esto permite identificar al árbol 24 como candidato para programas de conservación y clonación masiva, dada su alta capacidad morfogénica. Por el contrario, *Cordia alliodora* mostró ser una especie recalcitrante para el cultivo *in vitro*, dada su baja TVM y alta TP, lo que coincide con otros resultados obtenidos.

El análisis estadístico aplicado permite afirmar que la eficiencia del proceso en las fases de

introducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *T. rosea* y *C. alliodora* puede verse afectada por factores como especie, procedencia del material vegetal, contaminación por microorganismos endófitos, número de ciclos de propagación y por la interacción entre éstos.

Como perspectivas se sugiere evaluar nuevas alternativas de propagación como la embriogénesis somática para *Cordia alliodora*, dada su importancia como fuente maderable para el sector forestal. Además, el uso de marcadores moleculares se hace necesario, con el fin de establecer diferencias entre los árboles seleccionados y entre estos y sus progenitores que constituyen la colección. Así será posible determinar la base genética para estas especies disponible en el país, como fuente para el programa de mejoramiento y fomento forestal.

Por último, se debe continuar con el perfeccionamiento de la base de datos, a fin de homologarla para otras especies y en otros procesos *in vitro* e incluso para sistemas de propagación vegetativa por miniestacas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de este trabajo a través del Convenio MADR-CONIF 042-03. Igualmente a la empresa Geoambiente Ltda. por el apoyo logístico y por conceder invernaderos para los ensayos de aclimatización y establecimiento en campo de la colección.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. 2002. Cultivar los mercados antes de cultivar la madera. *Actualidad Forestal Tropical*. 10 (4): 19-20.
- Baker, R. 1994. El modelo rntidad-relación CASE* Method. Massachusetts, USA: Addison- Wesley Publishing Company, Inc, Reading. 241 p.
- BIRF-Minambiente-Acofore. 1999. *Boletín SITEP*. Año 3 (5). Bogotá D. C.: Minambiente. 41 p.
- Carrizosa, M. S.; Serrano C. 1996. *Sistemas modelo para la micropropagación y conservación de especies forestales*. En: Memorias de IV Congreso "La investigación en la Universidad Javeriana". Bogotá D. C.: Pontificia Universidad Javeriana, pp. 261-272.
- Conif-MADR. 1998. *Plan estratégico para el mejoramiento genético de Cordia alliodora y Tabebuia rosea en Colombia*. Serie de documentación N° 29. Bogotá D. C.: Conif. 40 p.
- Conif. 2004a. *Informe anual*. Bogotá D. C.: Conif. 81 p.
- Conif. 2003. *Reporte sobre avances técnicos 2002*. Bogotá D. C.: Conif. 14 p.
- Conif. 1998. *Guía para plantaciones forestales comerciales-Córdoba*. Serie de Documentación N° 34. Bogotá D. C.: Conif. 48 p.
- Conpes. 2003. *Documento No. 3237 - Política de estímulo a la reforestación comercial en Colombia: 2003-2006*. Bogotá D. C.: Departamento Nacional de Planeación. 18 p.
- Conpes. 2002. *Documento No. 3126 - Estrategia para la consolidación del Plan Nacional de Desarrollo Forestal*. Bogotá D. C.: Departamento de Nacional Planeación. 17 p.
- Donnelly, D. J.; Tisdall, L. 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: *Micropropagation of woody plants*. Netherlands: M. R Ahuja Kluwer Academic Publishers, pp. 153-166.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Dovies, J. T.; Geneve E, R. L. 1997. *Plant propagation principles and practices*. 6th ed. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice Hall Inc. 770 p.
- Hodson de Jaramillo, E.; Ramírez, C.; Schuler, I. 2004. *Biotecnología y producción forestal sostenible*. En: Conferencia Internacional de Bosques, Colombia: País de Bosques y Vida, Santa Marta. Memorias. Bogotá D. C.: Saile, P. y M. Torres (eds), pp. 251-256.
- Ipinza, R. 1998. *Mejoramiento genético forestal*. Serie técnica N° 242. Bogotá D.C.: Conif. 162 p.
- ITTO. 1997. Biotechnology and the sustainable production of tropical timber. *Forest Genetics Tesources*. 25, 7 (2): 16-17.
- ITTO. 2001. *International Tropical Timber Organization*. Plan Action 1998 to 2001. <http://www.itto.or.jp>.
- Liegel, L. H.; Stead, J. W. 1990. *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Oken. Laurel. Capá prieto. In: Burns R. M.; Honkala, B. (eds.). *Silvs of North America: 2. Hardwoods*. Agric. Handb. 654. Washington D.C., USA: Department of Agriculture, Forest Service, pp. 270-277.
- Marulanda, M. L.; Gutiérrez, L. G.; Vallejo, A. Selección y propagación de nogal cafetero (*Cordia alliodora*), Aliso (*Alnus acuminata*) y Mora (*Rubus glaucus*) por cultivo de tejidos *in vitro*. En: Colciencias. 2000. Publicaciones y formación de personal en proyectos cofinanciados por Colciencias en el periodo de 1991 a 2000.
- Ramírez, C.; Vega, E.; Salazar, A.; Baquero, I. S.; Nieto, V.; Rodríguez, J.; Hodson de Jaramillo, E. 2004. Evaluación del proceso productivo y estandarización de protocolos para la propagación *in vitro* de *Tabebuia rosea* Bertol. D.C. (ocobo) y *Cordia alliodora* (R. & P) Oken (nogal cafetero). *Memorias Segundo Congreso Colombiano de Biotecnología*. Bogotá D. C.: Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, pp. 419-420.
- Ritcher H. G.; Dallwitz, M. J. (2000 onwards). Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German, and Spanish. Version: 18th October 2002.
- Ziv, M. 1991. Quality of micropropagated plant-vitrification. *In vitro Cell Developmental Biology*. 27: 64-69.