

Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea* roxb

Evaluation of plant growth regulators in organogenesis of *Gmelina arborea* roxb.

Álvarez M. Juan C^I.; Beltrán P, Diana M^{II}. y Mesa L. Neftali^{III}.

Resumen. La melina (*Gmelina arborea* R) es una especie leñosa, de gran interés comercial y ecológico debido a su rápido crecimiento y a la calidad de su madera. Su propagación por semilla presenta inconvenientes relacionados con la alta variabilidad genética, que obstaculiza la obtención de poblaciones homogéneas en cultivos forestales. La micropropagación de especies vegetales es una herramienta que permite la obtención de plantas, con características morfológicas ideales, de una manera rápida y económica para el establecimiento de poblaciones homogéneas. En esta investigación se estableció una metodología de propagación *in vitro* para *G. arborea*, partiendo de yemas obtenidas de árboles jóvenes. Se evaluaron diferentes tratamientos para el control de contaminación y oxidación en la etapa de inducción, así como diferentes reguladores de crecimiento vegetal, con el fin analizar la respuesta organogénica de la especie. El tratamiento de desinfección, en el que los explantes fueron tratados con Tween 80 por 5 minutos y una primera esterilización con NaOCl 3% durante 3 minutos, seguido de enjuague con Etanol 75% por 1 minuto y lavados con H₂O destilada estéril en cada paso, fue el mejor. La inducción de brotación de yemas de *G. arborea* se hizo eficiente al utilizar el medio Schenk & Hildebrandt adicionado con BAP 0.5 mg/l. El ANA 1.0 mg/l fue la auxina que presentó mejores resultados en la formación de raíces.

Palabras clave: *Gmelina arborea* R, cultivo in vitro, reguladores de crecimiento, Schenk & Hildebrandt

^{I, II, III} Laboratorio de Protección de Plantas y Cultivo in vitro Universidad del Tolima, Grupo GEBIUT. A. A. 546. Ibagué, Colombia.

Abstract. Melina (*Gmelina arborea* R.) is a woody species of great commercial and ecological interest due to its rapid growth and the timber's quality. Its spread by seed has drawbacks associated with high genetic variability that hampers obtaining homogeneous populations in plantations. Plant's micropropagation is a tool that allows plant's production with an ideal morphological characteristics in a quick and inexpensive form for the establishment of homogeneous populations. This research established a methodology for in vitro propagation of *G. arborea* from buds obtained from young trees. Different treatments were evaluated for control of contamination and oxidation in the induction stage and different plant growth regulators in order to analyze the organogenic response of the species. The disinfection treatment in which the explants were treated with Tween 80 for 5 minutes and a first sterilization with 3% NaOCl for 3 minutes followed by rinsing with 75% ethanol for 1 minute and washed with sterile distilled H₂O at each step, was the best treatment for disinfection. The induction of sprouting buds of *G. arborea* was efficient to use Schenk & Hildebrandt medium added with BAP 0.5 mg/L. The ANA 1.0 mg/L auxin was presented better results in the formation of roots.

Key words: *Gmelina arborea* R, in vitro culture, growth regulators, Schenk & Hildebrandt medium.

1. INTRODUCCIÓN

Los prolongados ciclos de aprovechamiento que presentan la mayoría de especies forestales nativas y los escasos estudios de manejo silvicultural, aparecen como factores que desestimulan los programas de reforestación, con especies nativas, en los agricultores; lo que ha conducido a la búsqueda de alternativas con especies introducidas que presentan un ciclo de producción corto y, además, buena calidad de su madera. Este es el caso de *Gmelina arborea*, especie originaria del sudeste asiático que, debido a sus características maderables y a su corto ciclo de aprovechamiento, ha despertado un gran interés en su propagación.

La multiplicación por semilla es el método de propagación tradicional en *Gmelina*, el cual tiene algunos inconvenientes relacionados especialmente con la viabilidad y la variación genética, que no garantiza una población homogénea, con la consecuente heterogeneidad en porte, crecimiento y calidad de la madera. Por lo tanto, se requiere establecer protocolos de multiplicación rápida y económica que permitan la producción de plantas con mejores características morfológicas; estas herramientas las proporciona el cultivo in vitro, que permite, mediante un pequeño explante, obtener la micropropagación de muchos ejemplares con las características ideales de árboles élites seleccionados.

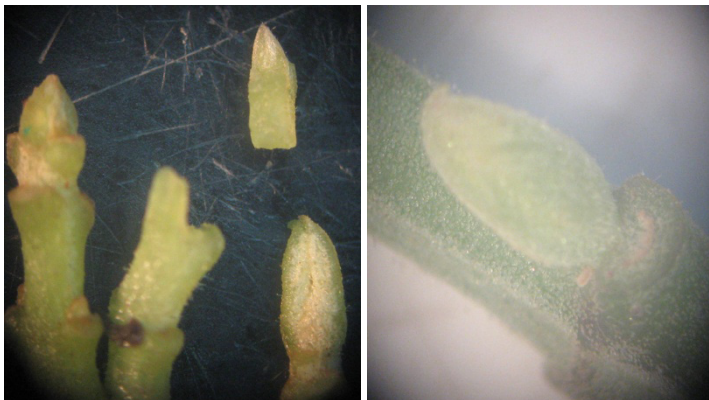
Todos los esfuerzos por propagar masivamente el material base para los programas de reforestación podrían ser más eficientes, si se definen protocolos en la fase de propagación masiva dentro del cultivo *in vitro*. Por eso se hace necesario desarrollar protocolos de multiplicación, que permitan obtener plantas con características morfológicas adecuadas para su traslado a condiciones de campo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el laboratorio de protección de plantas y cultivo de tejidos vegetales de la universidad del Tolima. Los explantes se tomaron de árboles de 2-4 años edad de *Gmelina arborea*, cultivados en la Granja Agroecológica Las Brisas, localizada en la ciudad de Ibagué a 1150 m.s.n.m., con una temperatura de 23°C en la zona de bosque húmedo premontano (Holdridge, 1947).

2.1 Establecimiento de plántulas *In vitro*

Para el experimento, se tuvieron en cuenta las características fenotípicas de los árboles fuente, como edad, altura, fuste, follaje, vigor y sanidad, que garantizaran un proceso exitoso en la etapa de inducción en el cultivo *in vitro*. Se seleccionó como explante las yemas apicales y laterales, con un tamaño de 0.5, 1.0 y 2.0 cm de longitud (figura 1).



A

B

Figura 1. A. Yemas de *G. arborea* vistas a estereoscopio. B. Yema de *G. arborea* utilizada en el proceso de inducción a condiciones *in vitro*.

2.1.1 Desinfección de los explantes

Una vez colectadas las yemas en campo, se introdujeron en una solución desinfectante (NaOCl 0.1%) y un agente antioxidante (0.5 mg/L de Polivinilpirrolidona PVP) para su preservación hasta su transporte al laboratorio. Allí se evaluaron diferentes tratamientos químicos para el control de contaminación (tabla 1). En los tratamientos, donde se empleó una desinfección superficial y otra interna, se aplicó el agente desinfectante de menor concentración (NaOCl) sobre las estructuras más superficiales, como los primordios foliares más externos, y luego se aplicó el agente de mayor concentración (Alcohol 75%). Las estructuras vegetales más externas se retiraron para evitar un posible proceso de oxidación de las yemas. Los desinfectantes químicos se aplicaron en constante agitación y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, luego de aplicar cada uno de los desinfectantes.

Tabla 1. Tratamientos empleados para la desinfección de yemas de *G. arborea*.

Tratamiento	Agente Desinfectante					
	Tiempo en minutos					
	Tween 80°	NaOCl 0.5%	NaOCl 1.5%	NaOCl 3.0%	Etanol 75%	Sulfato de Estreptomicina
Control	5'					
T1	5'				1'	
T2	5'					20'
T3	5'	5'				
T4	5'		3'			
T5	5'			3'		
T6	5'	1'		3'		
T7	5'			3'	1'	

Las yemas se sembraron en el medio Murashige & Skoog (1962) básico, el cual contenía 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar a un pH de 5.7, las que se incubaron a una temperatura constante de 25°C, en un periodo de dos semanas de oscuridad y, luego, se mantuvieron con un fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

2.1.2 Inducción de yemas *G. arborea*

Una vez elegido el mejor tratamiento de control de contaminación y oxidación de las yemas, éstas se cultivaron en los medios Murashige & Skoog (MS) 1/2 y Schenk & Hildebrandt (SH) evaluando, además, tres concentraciones de la citoquinina BAP (0.2, 0.5 y 1.0 mg/L), con el fin de determinar la eficiencia en la respuesta a la brotación (tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos formulados para la inducción de organogénesis en yemas de *G. arborea*.

TRATAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO
Control 1	MS ½
T1	MS 1/2 + BAP 0. 2 mg/L
T2	MS 1/2 + BAP 0. 5 mg/L
T3	MS 1/2 + BAP 1. 0 mg/L
Control2	SH básico
T4	

SH + BAP 0. 2

Las variables evaluadas para este ensayo fueron las siguientes:

- a. *Porcentaje de brotación.*
- b. *Longitud de la planta.*
- c. *Porcentaje de callogénesis.*

Luego de la proliferación de las yemas y la formación de plántulas, se procedió a realizar subcultivos para obtener el material necesario, requerido en los ensayos posteriores de organogénesis; para ello se cultivaron segmentos nodales de plántulas desarrolladas del ensayo anterior en el medio MS básico con 0.5 mg/L de BAP.

2.1.3 Inducción de rizogénesis *in vitro* mediante la aplicación de auxinas

Para evaluar el efecto que tienen las auxinas en el desarrollo organogénico de las vitroplántulas de *G. arborea*, en especial en el desarrollo radical, se seleccionaron brotes mayores de 1 cm, provenientes de la fase de multiplicación, colocándolos en un medio de cultivo MS ¼ y evaluando tres tipos de auxina: Ácido Naftalenacético (ANA), Ácido indolacético (AIA) y el Ácido Indolbutirico (AIB) en concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/l cada una. tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos evaluados en la rizogénesis *in vitro* de plántulas de *G. arborea*

Tratamiento	Medio de cultivo	Regulador de crecimiento (mg/l)
CONTROL	MS	-
T1	MS	ANA 0. 5
T2	MS	ANA 1. 0
T3	MS	AIA 0. 5
T4	MS	AIA 1. 0
T5	MS	AIB 0. 5
T6	MS	AIB 1. 0

En esta última etapa se realizaron observaciones cada 8 días, durante un lapso de 8 semanas, y se analizaron las siguientes variables:

Longitud total: longitud en centímetros, desde el ápice caulinar hasta el ápice de la raíz mayor.

Número de raíces emitidas: número total de raíces primarias emitidas por plántula.

Longitud raíz mayor. Medida desde el cuello hasta el ápice radical. La evaluación de los resultados, para esta etapa de rizogénesis, se realizó mediante un análisis unidireccional de varianza ANOVA, con 10 unidades experimentales por tratamiento, con dos réplicas cada una.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Establecimiento de plántulas *in vitro*

3.1.1 Selección del explante

La utilización de tejidos somáticos, como yemas y segmentos nodales, es una buena fuente de explantes en la micropropagación de tejidos vegetales, debido a que se conservan las características fenotípicas de los árboles donadores. Tanto la edad de la planta madre, como la edad fisiológica y fase de desarrollo y tamaño del explante, determinan el éxito de un proceso (George & Sherrington, 1984).

En estudios realizados por Naik *et al* (2002) se encontró que la tasa de proliferación disminuye en *G. arborea* debido a las repetidas exposiciones a reguladores de crecimiento vegetal en el medio de cultivo, y que existe un gradual decline en la formación de brotes y raíces adventicias a medida que se hacen sucesivos subcultivos. Por estas razones, en este estudio se optó por tomar material nuevo, directamente de campo, para evitar sesgos o interferencias debidas a este fenómeno.

Como explante, se utilizaron yemas apicales y laterales de árboles de *G. arborea* de 4 años de edad, teniendo en cuenta las consideraciones de McCown (2000), en el sentido de que la principal dificultad para la reproducción vegetativa de las especies leñosas está directamente relacionada con la edad del material seleccionado, ya que la maduración y el envejecimiento de los tejidos generan mayores porcentajes de contaminación y oxidación, junto con la pérdida de la capacidad regenerativa de los explantes.

3.1.2 Desinfección de los explantes

De acuerdo con el tamaño de las yemas utilizadas (0.5, 1.0, 2.0 cm) se presentan diferencias en la respuesta al control de contaminación. Las que mejor comportamiento presentaron en condiciones *in vitro* fueron las de 0.5 cm, exhibiendo el menor porcentaje de contaminación (40%), oxidación (60%) y la mayor brotación (60%), tabla 4. Según Preece (1988) existen áreas en un vegetal donde el contenido nutricional es abundante, como son los nectarios, los tejidos senescentes, los tejidos vasculares, las heridas, las vellosidades y las superficies mucilaginosas, que son adecuadas para sostener altas poblaciones de microorganismos y que, además, pueden escapar de los efectos de los agentes desinfectantes. Las yemas son adecuadas por el poco desarrollo de los tejidos vasculares, y más específicamente en los meristemos, donde no hay presencia, o hay mínimo desarrollo, de hongos, virus y bacterias.

Tabla 4. Comportamiento general de las yemas de *G. arborea* a los distintos tratamientos de control de contaminación en la etapa de inducción.

Tamaño de la yema (cms)	% Contaminación	% Oxidación	% de Brotación
0.5	40	60	60
1.0	100	0	0
2.0	100	0	0

3.1.3 Control de contaminación

Al evaluar los protocolos de desinfección aplicados en el laboratorio, se observó que aquellos tratamientos que poseían NaOCl en concentraciones de 3% proporcionaron los mejores resultados; así mismo, se evidenció que el efecto desinfectante se potencializó al combinar los agentes químicos. El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento número 7, el cual consistió en someter las yemas a lavado con Tween 80 por 5 minutos, seguido de desinfección con NaOCl 3% durante 3 minutos, y posteriormente Etanol 75% por 1 minuto, realizando enjuagues con H₂O destilada estéril en cada paso (figura 2).

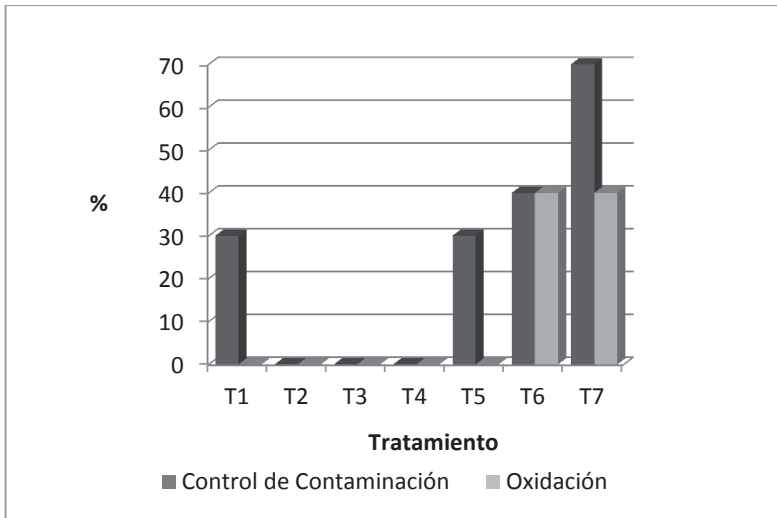


Figura 2. Comparación de los tratamientos aplicados en la etapa de inducción

La etapa de inducción se vio afectada por la oxidación, lo que se debió, tal vez, al estrés de los tejidos al ser sometidos a disecciones y a agentes de desinfección. Según Roca *et al.* (1991) en algunas ocasiones los tejidos producen respuestas hacia ciertos daños mecánicos (cortes, incisiones) químicos (agentes desinfectantes) y físicos (temperatura) que ocasionan cambios en la presión osmótica, balance hídrico y plasmólisis que provocan la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos, produciendo una reacción de hipersensibilidad en los tejidos y a la liberación de agentes oxidantes de una célula a otra, lo que causa desórdenes citológicos en cadena, resultando en el oscurecimiento y la muerte.

Castro *et al.* (2003) afirma que entre los factores físicos que inducen oxidación se encuentra la luz, la cual acelera los procesos de oxidación de radicales oxidativos; efectivamente, luego de haber incubado los cultivos en completa oscuridad durante dos semanas, estos fenómenos disminuyeron en los tratamientos 6 y 7 (40%) permitiendo aumentar el porcentaje de sobrevivencia de los explantes.

3.1.4 Inducción de brotación de yemas *G. arborea*.

La brotación de las yemas, observada al cabo de 4 semanas de cultivo, presentó un porcentaje mayor en los tratamientos con el medio SH (42.5%) en comparación con el medio MS ½ (20%) (tabla 5). Estos resultados muestran que la disminución en la

concentración de los elementos mayores en los medios de cultivo, permite potenciar la brotación de las yemas de *G. arborea*. Analizando todos los tratamientos, se pudo apreciar que el medio SH fue el más eficiente en la morfogénesis; ello se explica probablemente por el hecho de que este medio presenta una regulación nutricional menos concentrada que los otros medios de cultivo. En este sentido, Ziv *et ál* (1987) afirma que los medios de cultivo, ricos en minerales como el MS, causan cierto grado de vitrificación y una paulatina oxidación en varias especies vegetales. Stange *et ál*. (1998) indica que uno de los problemas del cultivo in vitro de embriones en *Pinus radiata*, es que se genera una proporción significativa de brotes con hojas hiperhidratadas (vitrificación) y citan que un adecuado manejo de los factores ambientales, durante el cultivo in vitro, debería ser suficiente para lograr una producción de brotes de óptima calidad. Sin embargo, otros autores mencionan la concentración de reguladores del crecimiento como otro factor importante a considerar (GANBOA & Abdelnour, 1999).

Tabla 5. Efecto de distintas concentraciones de BAP en la etapa de inducción de *G. arborea*.

Tratamiento	% Germinación	% Callogénesis
MS	25	5
SH	40	5
MS BAP 0. 2	15	10
MS BAP 0. 5	25	20
MS BAP 1. 0	15	30
SH BAP 0. 2	25	10
SH BAP 0. 5	85	15
SH BAP 1. 0	20	20

Cuando se compararon los medios de cultivo con los tratamientos de reguladores de crecimiento vegetal, se observó que al aplicar citoquinina en diferentes concentraciones se produjeron fenómenos de callogénesis (figura 3). Según Valverde *et ál*. (2004) algunas especies presentan ciertas respuestas a la adición de citoquininas, resultando en la formación de callo y oxidación de algunos explantes. George (1993) menciona que concentraciones muy altas de citoquininas pueden causar la producción de una gran cantidad de brotes pequeños, que usualmente no se alargan y que en algunas especies presentan una forma, inusual llegando a ser hiperhídricos.

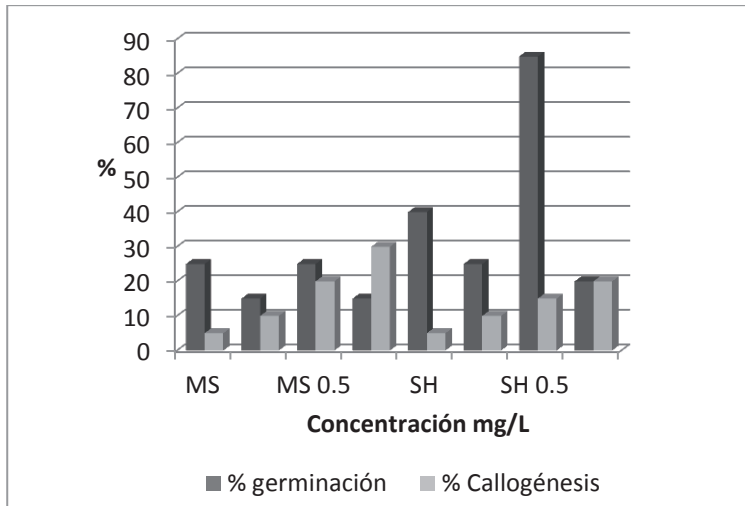


Figura 3. Porcentaje de brotación y Porcentaje callogénesis en los dos medios de cultivo utilizados en la inducción de yemas de *G. arborea*.

De acuerdo con el efecto de las concentraciones de BAP, los mejores resultados, en porcentaje de brotación y longitud total, se presentaron cuando las yemas se cultivaron con 0.5 mg/L de BAP, tanto en el medio MS como en el medio SH. Se evidenció que al aumentar las dosis de BAP en ambos medios de cultivo, se produjeron fenómenos de hiperhidratación y callogénesis a partir de la segunda semana de cultivo. Se puede concluir que la concentración adecuada de citoquinina para inducir organogénesis, debe ser inferior a 1.0 mg/L. Según el análisis de varianza de dos vías para longitud total, existen diferencias significativas en el efecto, tanto del medio de cultivo como de la concentración de BAP, para este parámetro evaluado.

Según Debergh (1987) niveles altos en los requerimientos especiales del cultivo *in vitro*, como nutrientes (minerales y carbohidratos) humedad, potencial hídrico, reguladores de crecimiento e intensidad lumínica, son las principales causas de malformaciones e hiperhidricidad de los brotes. De acuerdo con Pierik (1990) el material vegetal joven y tierno es más susceptible a la vitrificación, y el grado de translucidez se asocia a muchos factores, entre los que se encuentran los anteriormente mencionados, y principalmente los altos niveles de citoquininas. Navarrete (2001) estudió los efectos de este tipo de reguladores en *Oryza sativa L.*, y encontró que altas concentraciones de kinetina (2mg/L) produjeron un tipo de intoxicación en el material, hallando plántulas etioladas y hojas poco desarrolladas; y cuando se redujo la con-

centración de kinetina (1mg/L) arrojó mejores resultados. En este mismo trabajo se evaluó un tratamiento suplementado con BAP, con una concentración de 5 mg/L, el cual arrojó buenos resultados, obteniendo diferenciación de callos, pero presentó el fenómeno de vitrificación.

De acuerdo con los resultados expuestos, la formulación del medio SH con BAP 0.5 mg/L se presenta como una alternativa en la brotación de yemas en condiciones *in vitro*.

3.1.5 Efecto organogénico de las auxinas en la multiplicación *in vitro* de *Gmelina*

Crecimiento Caulinar. El análisis univariado de varianza para la variable respuesta de crecimiento caulinar, mostró que la aplicación de auxinas no ejerció un efecto significativo a nivel de caulogénesis en las plántulas, en comparación con el tratamiento control. De acuerdo con lo reportado por García y Martel (1992) quienes encontraron que la presencia de ANA en el medio de regeneración, afectó la formación de brotes en discos de hojas de diversos cultivares de papa. En todos los tratamientos de *G. arborea* se presentó la formación de brotes adventicios desde la primera semana de cultivo, pero este desarrollo se estancó en las semanas posteriores. A pesar de que la proliferación de callo fue común en todos los tratamientos con auxinas, se observó un mejor crecimiento caulinar en aquellos tratamientos que poseían el ANA como regulador de crecimiento figura 4.

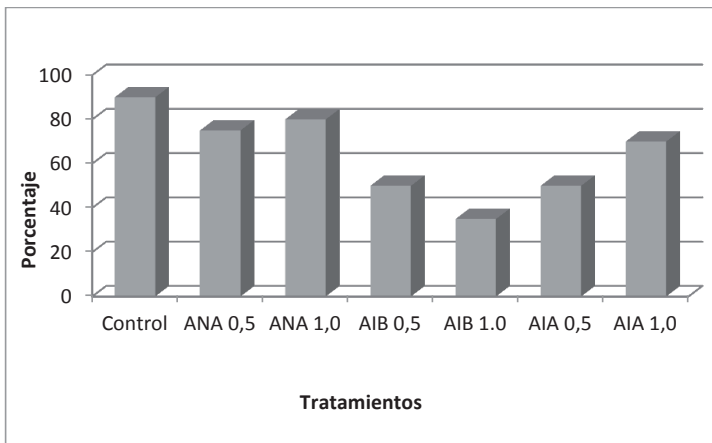


Figura 4. Porcentaje de brotación de *G. arborea* en presencia de auxinas.

El tratamiento que alcanzó un comportamiento más cercano al del control (figura 5) fue 1.0 mg/L de ANA, y el de menor brotación fue AIB a 1.0 mg/L.

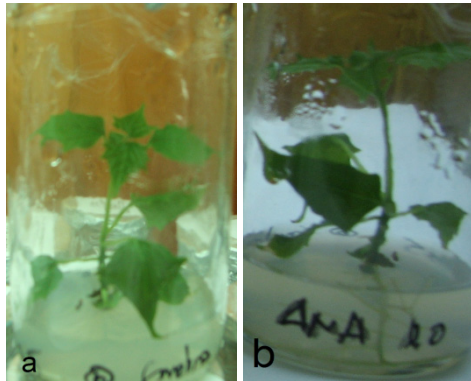


Figura 5. Crecimiento de plántulas en el control (a) y en ANA 1. 0 mg/L (b).

En el análisis de medias (figura 6) se encontró que el efecto de ANA en la longitud total fue superior a los demás tratamientos. Adicionalmente, el hecho de que su comportamiento fuese similar al del control, evidencia que su efecto inhibitorio sobre la caulogénesis de *G. arborea* es menor en comparación con las otras auxinas, lo que lo hace útil en futuros ensayos de micropropagación.

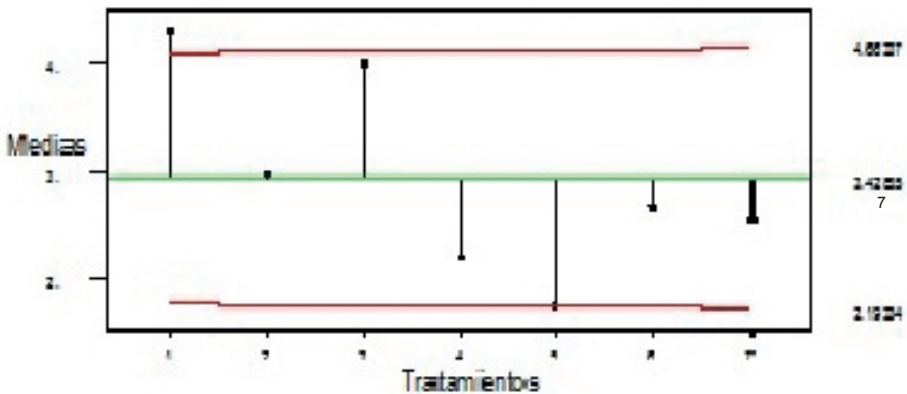


Figura 6. Análisis de Medias para longitud Total en el cultivo in vitro de *Gmelina*

Los tratamientos que involucraron AIA y AIB inhibieron en gran manera el desarrollo de las estructuras caulinares, debido a la sobreproducción de callo que inicialmente se presentó en la base del explante, y que luego creció hasta cubrir el resto de las estructuras como hojas y segmentos nodales. Díaz y Mogollón (2005) realizaron estudios en *Solanum tuberosum L.*, en los que hallaron que las auxinas fueron indispensables

para la formación de callo, en donde el 2,4-D produjo mejor respuesta que el AIA; esto se debe a que, al parecer, existen unas proteínas asociadas con la capacidad de regeneración de células *in vitro* que activan la formación de callo (SaKer, 1998; Díaz y Mogollón, 2005). En el proceso de rizogénesis es normal la producción de callos, debido al proceso de desdiferenciación de los tejidos para que se pueda realizar una posterior organogénesis, pero el tipo de regulador y determinadas concentraciones del mismo, pueden influir para que la callogénesis aumente de manera tal, que los explantes desarrollen demasiado callo en las demás estructuras.

Longitud raíz mayor. En esta etapa se evidenció, en general, la formación de estructuras callogénicas en los tejidos ubicados en la base de los explantes, los cuales realizaron un proceso inicial de desdiferenciación que resultó originando estructuras radicales. En algunos tratamientos, la producción de este tipo de callos aconteció con tal intensidad que la formación de estructuras de tipo caulinar se vio comprometida.

Según el análisis de varianza de una vía para longitud de la raíz mayor, existieron diferencias significativas respecto de las medias de los tratamientos, evidenciándose que cada tipo de auxina tiene un grado de influencia positiva sobre el alargamiento y desarrollo de la raíz. Esto se contrasta al comparar los distintos tratamientos con el control que presenta el menor desarrollo radical.

En cada uno de los tratamientos analizados se mostró una relación directa entre la concentración de auxina y el desarrollo de la raíz; es decir, a mayor dosis, la longitud de la raíz principal se incrementó (figura 7). El mejor tratamiento fue AIA 1.0 mg/L (figura 8).

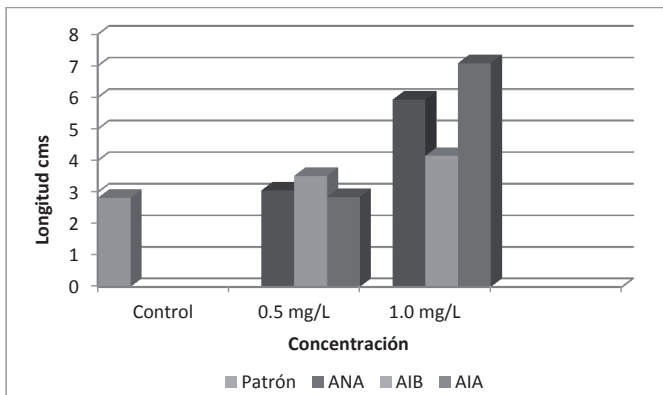


Figura 7. Efecto de las auxinas sobre el crecimiento de la raíz mayor.



Figura 8. Plántula de *Gmelina* enraizada in vitro utilizando AIA 1.0 mg/L.

Número de raíces emitidas: Para este parámetro se consideró el número de raíces emitidas por plántula, discriminando entre raíz primaria o raíces adventicias. Según los porcentajes de plántulas que desarrollaron raíces adventicias, se halló que existen diferencias para cada uno de los tratamientos (figura 9). El mayor efecto en la producción de raíces se presentó al utilizar el AIB 0,5 mg/L (40%); dentro de este tratamiento, el máximo número de raíces generadas en una plántula fue de 20 y el menor fue de 8. La formación de raíz se observó al cabo de dos semanas de cultivo; se presentó enraizamiento en cada uno de los tratamientos, variando significativamente del 35-90%, de acuerdo con el tipo de auxina y su concentración en el medio (tabla 6). Los porcentajes más altos en el análisis se dieron con la adición de ANA, y los más bajos en AIA 0.5 mg/L. Al aumentar las concentraciones se presentaron mejores comportamientos en el desarrollo de la raíz.

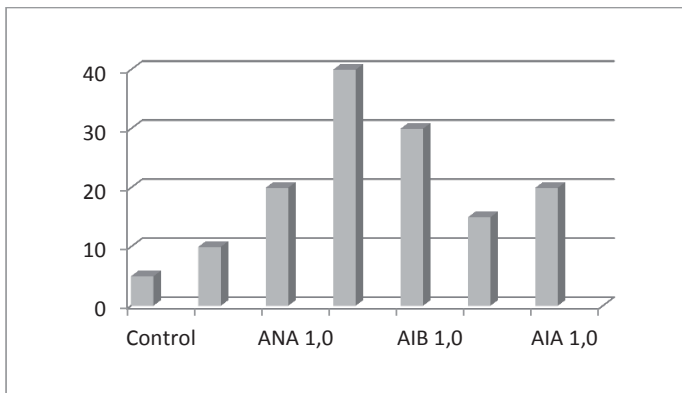


Figura 9. Porcentaje de plántulas de *G. arborea* que desarrollaron raíces adventicias.

El comportamiento de la auxina ANA, tanto en el desarrollo caulinar como rizogénico, fue el más estable en todos los análisis, lo que permite tomar este regulador como base en futuros programas de propagación, y aún más, en ensayos de aclimatación de plántulas de *G. arborea* a condiciones *ex vitro*.

Tabla 6. Efecto hormonal en el enraizamiento general *in vitro* de las plántulas de *G. arborea*

Regulador de Crecimiento	Concentración mg/L	% de enraizamiento
Control	-	30
ANA	0.5	70
ANA	1.0	70
AIB	0.5	50
AIB	1.0	55
AIA	0.5	35
AIA	1.0	60

En general, se observó la formación de callo en la base de los explantes y de raíces en todos los tratamientos analizados; las características del enraizamiento fueron distintas, de acuerdo con el regulador; por ejemplo, en los tratamientos que involucraron ANA, se evidenció una menor producción de callo, acompañado de un buen proceso de formación caulinar, el cual fue el menos inhibitorio de todo el análisis. Cuando se adicionó AIA en el medio de cultivo, el porcentaje de plántulas que generaron rizogénesis fue el menor de todos los ensayos; pero se apreció que este regulador posee la capacidad de desarrollar una adecuada raíz principal de buena consistencia; este efecto sólo pudo ser igualado cuando se utilizó ANA 1.0 mg/L. La producción de raíces adventicias fue notable con la aplicación de AIB a 0,5 mg/L, pero estuvo acompañado de una excesiva producción de callo, lo que comprometió la formación de brotes de tipo caulinar, demorando el crecimiento total de las plantas. Muchos estudios demuestran que el AIA o el AIB son muy efectivos en la formación de callos y embriones somáticos y que han proporcionado una alta resolución respecto a la formación de raíces adventicias y en la inhibición de yemas axilares. Cuando se compara el efecto que tuvieron todas las auxinas con el control, se comprueba que la especie *Gmelina arborea* requiere de un balance adecuado de estos reguladores, para un desarrollo radical que permita obtener plántulas que van a ser sometidas a la fase final del cultivo *in vitro*, como es la de endurecimiento o rusticación, necesaria para su posterior traslado a campo.

Según Lara *et al.* (2003) la fase de enraizamiento dentro del proceso de micropropagación, tiene como función desarrollar en la planta producida los mecanismos

necesarios para subsistir, sin suplementos externos de carbohidratos, mediante el desarrollo y funcionamiento de un sistema radical eficiente. Aunque en la mayoría de los casos se busca pasar directamente de la multiplicación a la transferencia *ex vitro*, como una forma de ganar eficiencia, la producción de raíces afecta significativamente las posibilidades de recuperación de especies leñosas, perennes en el estadio IV o aclimatación a condiciones externas. Los análisis de los resultados del presente estudio mostraron la eficiencia del suplemento auxínico para inducir buenos porcentajes de enraizamiento. A pesar de que se evidenciaron efectos fisiológicos paralelos, como la formación excesiva de callo en algunos tratamientos, se han observado efectos similares en el enraizamiento *in vitro* de varias especies leñosas, tales como la Teca (*Tectonagrandis*) y Ocobo (*Tabebuia rosea*).

En algunas especies forestales, el enraizamiento *in vitro* es inducido por la aplicación de impulsos fisiológicos, consistentes en la inmersión temporal de la parte basal de los brotes micropropagados en una solución de auxinas, seguido por el inmediato trasplante de los brotes a un sustrato en condiciones *ex vitro*. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para validar o ajustar la utilidad de estas metodologías a la adaptación *ex vitro* de plantas micropropagadas.

4. CONCLUSIONES

Los mejores controles de contaminación de yemas de *G. arborea*, transferidos a condiciones *in vitro*, se observaron cuando los explantes fueron tratados con Tween 80® por 5 minutos, seguido de desinfección con NaOCl 3% durante 3 minutos y, posteriormente, Etanol 75% por 1 minuto, realizando enjuagues con H₂O destilada estéril en cada paso.

La inducción de brotación de yemas de *G. arborea* se hizo eficiente al utilizar el medio Schenk & Hildebrandt como medio de cultivo, y su efecto se potencializó al adicionar BAP 0.5 mg/l.


La presencia de auxinas en el medio de cultivo es necesaria para aumentar el porcentaje de enraizamiento *in vitro*-plántulas de *G. arborea*, El ANA 1.0 mg/l es la auxina que presenta resultados eficientes, tanto en la caulogénesis como en la rizogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Castro, D., Díaz, J & Yépez, A. (2003) Investigaciones en melina (*Gmelina arborea* Linn.) Universidad católica de oriente, cap. 5. 51-70.
- Debergh, I. L. (1987) Improving micropropagation, *IAPTC News letter* 51: 2-10.
- Díaz, M. J.G. & Mogollón, N. (2005). Organogénesis Somática en papa (*Solanum tuberosum* L. cv.) a partir de discos de hojas de plantas desarrolladas in Vitro. *Cedaf. Vol 02*.
- Ganboa, J.P. & Abdelnour, A. (1999). Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* Roxb). *Agronomía Costarricense. 23 (1)*: 69-76.
- García E; & Martel A. (1992). Formación *in vitro* de brotes adventicios en discos de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L). *Pitón, vol 53, (1)*. 57-64 (16 ref.)
- George, E. F. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Basingstoke, UK. 2° Ed. Springer.
- George, EF & Sherrington, PD. (1984). *Plant propagation by tissue culture*. Basingstoke, UK. Ed 2. Springer.
- Holdridge, L. R. (1947). Determination of World Plant Formations from Simple Climatic. *Data.Science Vol. 105 (2727)*. 367-368.
- McCown, B. (2000). Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants. Dealing with genetic prederterminism. En: *In vitro cell. Vol.36, (3)*. 150.
- Murashige, T & Skoog, F. (1962).A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant. 15*: 437-497.
- Naik, D; Vartak, V & Bhargava, S. (2003). Provenance and subculture depend variation during micropropagation of *Gmelina arborea*. *Plant cell and organ culture* 73: 189-195.
- Navarrete, C. (2001). Regeneración de callos de arroz (*Oryza sativa* L.) por medio de la técnica de inmersión temporal automática (RITA). Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. Pp 1-43.
- Lara, A., Valverde, R., Gómez, L. & Hidalgo A. (2003). Micropropagación de la planta medicinal *Psycotria acuminata* L. *Agronomía Costarricense. 27*:7-20.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid. Editorial Mundi-Prensa.
- Preece, J. E. (1988). Thidiazuron: a potent cytoquinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell* 76. 53-60.
- Roca W. M. & Mroginski L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Centro internacional de agricultura tropical CIAT.
- Stange, C.; Prehn, D.; Gebauer, P. & Johnson, A. (1998). *Caracterización morfológica y mo-*

lecular de clones de Pinus radiata regenerados in vitro. Comunicación presentada al III Encuentro latinoamericano de biotecnología vegetal. Habana, Cuba.

Valverde, L & Alvarado, L. (2004). Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionácea). San José mar. *Rev. biol. Trop.* V. 52 (1). 25-36.

Ziv Meira, Schwartz Ammon y Fleminger Devorah. (1987). Malfuntioning stomata vitreous leaves Carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening, *Plant Science* 52: 127-134 

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Álvarez M. Juan C. ; Beltrán P. Diana M. y Mesa L. Neftali. Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de <i>Gmelina arborea</i> Roxb. Revista Tumbaga (2011), 6, 107-124	Día/mes/año 12/11/2009	Día/mes/año 18/02/2010