

Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell

Dawa Méndez-Álvarez¹
Ana Abdelnour-Esquivel²

Resumen

Terminalia amazonia es una especie nativa utilizada para la reforestación por sus características de rápido crecimiento y madera de buena calidad. El objetivo principal de este trabajo fue determinar las condiciones necesarias para el establecimiento *in vitro* de dicha especie, por lo cual se trabajó con plantas provenientes de campo y de invernadero, a estas últimas se les establecieron condiciones sanitarias, posteriormente se evaluó el efecto de dos agentes desinfectantes, hipoclorito de sodio (NaClO) y cloruro de mercurio, en diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Siendo la doble desinfección con NaClO al 3% por 5 minutos y al 1,5% por 10 minutos, el mejor tratamiento en reducir la contaminación de los explantes y mantenerlos viables. Se utilizaron una serie de antioxidantes, como son ácido cítrico, ácido ascórbico, L-cisteína, PVPP, carbón activado y DTT, además de emplear un tratamiento frío a 4°C con el objetivo de inhibir la fenolización de los explantes. El uso de carbón activado y PVPP dentro del medio de cultivo fueron los mejores tratamientos en cuanto a explantes sobrevivientes y con oxidación leve (53,3% y 66,7% respectivamente). Además, se emplearon reguladores de

Abstract

Terminalia amazonia is a native species used for reforestation because of their rapid growth characteristics and wood quality. The main objective of this study was to determine the conditions for the *in vitro* establishment of that species, the work was with plants from field and from greenhouse, to the last ones sanitary conditions were established prior disinfection. Two disinfectants agents were tested: sodium hypochlorite (NaClO) and mercuric chloride at different concentrations and exposure times. As the dual disinfection of 3% NaClO for 5 minutes and 1,5% for 10 minutes, was the best treatment to reduce contamination of the explants and keep them viable. Also a number of antioxidants was used, such as citric acid, ascorbic acid, L-cysteine, PVPP, activated charcoal and DTT, in addition was used a cold treatment at 4°C in order to inhibit phenolization of the explants. In the culture media, the addition of active charcoal and PVPP were the best treatments evaluated, with the lowest oxidation and the highest survival of explants (53,3% and 66,7% respectively). In addition, growth regulators as BAP and KIN were used to promote sprouting in the explants. The conditions for the establishment *in vitro*

1. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación e Integración Bosque e Industria; damendez@itcr.ac.cr

2. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología; aabdelnour@itcr.ac.cr

crecimiento como BAP y KIN para promover la brotación en los explantes. Las condiciones para el establecimiento *in vitro* dependen directamente de la especie con que se trabaje.

Palabras clave: *Terminalia amazonia*, micropropagación, oxidación, *in vitro*, desinfección, Costa Rica.

Introducción

Entre las especies forestales nativas de Costa Rica, *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell (roble coral, amarillón) ha generado mucho interés por su gran potencial de rápido crecimiento, adaptabilidad a condiciones difíciles, como colinas y planicies costeras, suelos rojos o amarillos, lateríticos profundos, derivados de materiales aluviales o ígneos, características que la convierten en una especie clave para los programas de reforestación (Russo y Speranza, 2001 ; Montero y Kanninen, 2005). Tiene una amplia gama de usos, sin embargo; a nivel natural la especie es poco frecuente en los bosques y las plantaciones están en su etapa inicial (Solís y Moya, 2004). A pesar de que esta especie produce semilla sexual, presenta algunos inconvenientes como baja existencia de árboles semilleros, bajo porcentaje de germinación, largo periodo de germinación y semilla vana (Montero y Kanninen, 2005). En el país, el Programa de Incentivos para la Reforestación ha empleado *T. amazonia* en las zonas Norte y Sur, en el Pacífico Central, en Sarapiquí y en la zona Atlántica (Montero y Kanninen, 2003).

Como el éxito de las plantaciones forestales radica en la producción de maderas de excelente calidad y al igual que toda actividad agrícola, la siembra de material genético sobresaliente es el factor más decisivo en los resultados finales del proceso. Por lo tanto, la tendencia de la forestería moderna está dirigida hacia la siembra y cultivo de clones de alto rendimiento adaptados a ambientes específicos que permitan obtener los mayores rendimientos. La aplicación de técnicas biotecnológicas en este campo ha favorecido la producción clonal masiva y el establecimiento de plantaciones clonales de algunas especies forestales (Suárez, I., Jarma, A., y Avila, M., 2006).

La micropropagación permite la producción de plantas con características genéticas similares a la planta que les dio origen y es una de las técnicas más factibles de utilizar a corto plazo en el sector forestal. El establecimiento *in vitro* permite un rápido aumento en el número de plantas, la producción de plántulas durante todo el año, la obtención de plantas con elevada calidad sanitaria (Scherer, J., Silveira, L., Gomes, B., Peiche, C., y Vasconcelos, A., 2006); además, hace posible la recuperación de caracteres morfológicos juveniles

dependent directly on the species with which they work.

Key words: *Terminalia amazonia*, micropropagation, oxidation, *in vitro*, disinfection, Costa Rica.

mediante la ruptura de relaciones existentes entre el explante y el conjunto de planta madre (Romero, 2004).

Sin embargo, en algunas especies, especialmente leñosas, el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales (explante) está en gran medida limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*. El porcentaje de oscurecimiento de los explantes es consecuencia de la oxidación de compuestos fenólicos presentes en los tejidos por reacción con las polifenoloxidasas (Scherer et al., 2006). Las experiencias en el cultivo *in vitro* de especies forestales tropicales no es abundante y aunque existen antecedentes de investigación para la multiplicación y enraizamiento de especies medicinales del género *Terminalia* (Sarwat, M., Das, S., y Srivastava, P. S., 2010; Ramesh, M., Pavan Umate, K., Venugopal, R. y Sadanandam, A., 2005; Russo y Speranza, 2001), para *T. amazonia* la experiencia es aún menor (Hine, A., Rojas, A., y Daquinta, M., 2013).

Esta investigación fue dirigida a establecer las bases para la propagación *in vitro* de roble coral (*Terminalia amazonia*) y valorar los efectos de diferentes tratamientos antioxidantes en los explantes y plantas donadoras para su introducción y establecimiento *in vitro*.

Materiales y métodos

Para los ensayos de establecimiento *in vitro* se utilizaron como explantes iniciales segmentos nodales o microestacas de 3 cm de longitud de plantas mantenidas en invernadero y plantas procedentes del campo mantenidas en condiciones naturales de crecimiento (Santa Clara de San Carlos, Alajuela, Costa Rica). El material vegetal fue provisto por La Fundación para el Desarrollo de la Cordillera Volcánica Central (FUNDECOR) como parte del proyecto de micropropagación de especies forestales desarrollado en el Centro de Investigación de Biotecnología (CIB) con el apoyo de MICIT-CONICIT.

Para el control sanitario de la plantas donadoras en condiciones de invernadero, se utilizó benomyl (Benlate®), fungicida sistémico, en dosis de 5 a 8 g/l y



Figura 1. A) Plantas donadoras de explantes en invernadero, en condiciones de luz. B) Plantas donadoras de explantes en invernadero en condiciones de oscuridad (etioldadas).

Figure 1. A) Explant donors in light conditions. B) Explant donors in shaded conditions (etiolated). Both treatments in greenhouse.

Agri-mycin® producto sistémico bactericida a base de Estreptomycina y Terramicina, en dosis de 6 a 10 g/l, las aplicaciones se realizaron tres veces por semana, así como dos días antes de la colecta de los explantes para la introducción al cultivo *in vitro*.

En cuanto al riego, se aplicó con manguera en la base de la planta, en una frecuencia de 10 minutos por día, para tratar de reducir el número de microorganismos sobre la superficie vegetal. Así mismo, la mitad del material vegetal se etioló como práctica para reducir la oxidación de los explantes al introducirlos a condiciones *in vitro*, colocándolo bajo un régimen de oscuridad total dentro de una cámara recubierta con una bolsa plástica de color negro en el invernadero (Figura 1.B).

Desinfección de explantes

Los explantes, se trasladaron del invernadero al laboratorio dentro de un beaker cubierto con papel aluminio, al que se agregó una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico (250 mg/l y 500 mg/l respectivamente), con pH de 4,5, con el objetivo de reducir la oxidación. Una vez en el laboratorio, cada explante se redujo a un tamaño de 2,5 cm, eliminándole hojas y ápices, posteriormente se colocaron bajo agua corriente durante 15 minutos con el fin de eliminar suciedad y otros contaminantes superficiales. Posteriormente, los explantes fueron lavados con agua y jabón Bactex® antibacterial con ayuda de un cepillo suave, enjuagados con abundante agua destilada, para ser sumergidos en una solución de Agrimicin/Benlate (8 g/l de cada uno) en combinación con ácido cítrico y ácido ascórbico (250 mg/l y 500 mg/l respectivamente) a un pH de 4,5; durante 1 hora y 30 minutos, en agitación constante.

Para evaluar la respuesta de los explantes a la desinfección superficial, inicialmente se evaluaron como desinfectantes el hipoclorito de sodio (NaOCl) a una concentración de 1,5% en dos tiempos diferentes (10 y 15 min) para cada concentración y cloruro de mercurio (HgCl₂) a dos concentraciones diferentes 0,1% y 0,2% en tres tiempos (2,5, 5 y 7 min) para cada concentración. También se evaluó una doble desinfección con NaOCl al 3% durante 5 min seguida de NaOCl al 1,5% por 10 min.

Pasado el periodo de exposición al desinfectante, los explantes de cada tratamiento fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril, durante 3 minutos, en la cámara de transferencia de flujo laminar. Finalmente, los explantes nodales de 2,5 cm de longitud fueron cultivados en los medios descritos por Murashige y Skoog (MS) (1962) y Lloyd y McCown (WPM) (1981) complementados con 30 g/l de sacarosa, 4,5 g/l de Phytigel® como gelificante y el pH se ajustó a 5,1. El medio fue dispensado en tubos de ensayo (150 x 25 mm), dispensando 7ml por tubo y esterilizado por autoclave (121 °C, 1,2 atm, durante 20 minutos).

Los cultivos fueron colocados en el cuarto de crecimiento (22 ± 2 °C) y mantenidos en oscuridad durante una semana, posteriormente se transfirieron a una intensidad lumínica de 2000 lux generados con tubos fluorescentes, tipo luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas luz.

Antioxidantes

Una vez definida la desinfección, se procedió a evaluar la respuesta de los explantes a diferentes tratamientos de antioxidantes (usando el mejor agente desinfectante). Los diferentes agentes antioxidantes, concentración y tiempos de exposición se muestran en el Cuadro 1. La descripción de cada tratamiento se detalla a continuación.

Cuadro 1. Tratamientos antioxidantes evaluados en los explantes de roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell para el establecimiento *in vitro*.

Table 1. Anti-oxidant treatments evaluated in explants of roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell for *in vitro* establishment.

Agente antioxidante	Tratamiento	Concentración	Tiempo de incubación
Choque térmico a 4°C	(T1)	-	2 h
	(T2)	0,01%	10 min
	(T3)	0,05%	10 min
PVPP*	(T4)	0,10%	10 min
	(T5)	0,01%	10 min
Cisteína	(T6)	0,05%	10 min
	(T7)	0,10%	10 min
	(T8)	0,01%	10 min
Ácido cítrico + ácido ascórbico	(T9)	0,50%	10 min
	(T10)	0,10%	10 min
DTT**	(T11)	0,01%	10 min
	(T12)	0,05%	10 min
Carbón activado (medio de cultivo semisólido)	(T13)	0,10%	10 min
	(T14)	500 mg/l	-
PVP (medio de cultivo semisólido)	(T15)	250 mg/l	-
	(T16)	5 g/l	-
PVP*** (medio de cultivo líquido)	(T17)	10 g/l	-
	(T18)	5 g/l	-
Control (sin antioxidante)	(T19)	10 g/l	-
	(T20)	-	-

*PVPP: Polivinilpirrolidona, **DTT: dithiothreitol, ***PVP: Polivinilpirrolidona

Finalmente, los explantes nodales de 2,5 cm de longitud fueron cultivados en medio MS, sin hierro ni cobre, complementado con 30 g/l de sacarosa, 5 ml/l de benciladenina (BA) y un pH de 5,1 ajustado. Para los tratamientos T1 al T13 en que los explantes fueron incubados en la solución antioxidante después de la desinfección, se dispensaron 7ml del medio de cultivo en cada tubo de ensayo (25 x150 mm) y se colocó un puente de papel de filtro (Whatman # 100), el medio fue esterilizado por autoclave (121 °C, 1,2 ATM/cm² de presión durante 20 min). Por otra parte, para los tratamientos en los cuales el antioxidante se agregó al medio, igualmente se utilizó el medio MS sin hierro ni cobre, complementado con 30 g/l de sacarosa, 5 ml/l de BA, la concentración del antioxidante a evaluar y el pH fue ajustado a 5,1. En cuanto a los tratamientos T14 al T17, en los que se utilizó medio semisólido, se agregó 4,5 g/l de Phytigel como gelificante. Los medios de cultivo se esterilizaron por autoclavado.

Todos los tratamientos se colocaron en el cuarto de crecimiento climatizado a 22 ±2 °C, cubiertos con una manta negra, manteniéndolos en oscuridad durante una semana, posteriormente se les removió la manta dejándolos bajo una intensidad lumínica de 2000 lux generados con tubos fluorescentes, tipo luz blanca, por un fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de 22±2 °C.

Promoción de brotación

Una vez determinado el tratamiento que permitió la mayor reducción de oxidación, se procedió a evaluar la promoción de la brotación de los explantes, utilizando varios reguladores de crecimiento tipo citocinina adicionados al medio de cultivo en varias concentraciones: BA (benciladenina) a 10, 20 y 30 mg/l, 2ip (isopenteniladenina) a 10, 20 y 30 mg/l, K (kinetina) a 10, 20 y 30 mg/l y TDZ (tidiazuron) a 0,1, 0,5 y 1 mg/l.

El medio de cultivo empleado en estos ensayos de brotación fue un MS sin hierro ni cobre, complementado con 500 mg/l de carbón activado y el regulador de crecimiento a evaluar. Los explantes recibieron el procedimiento de doble desinfección con NaOCl al 3% durante 5 min y 1,5% de NaOCl durante 10 min, una vez cultivados en el medio de cultivo se colocaron en el cuarto de crecimiento a 22 ± 2°C y en oscuridad durante 15 días, posteriormente se colocaron en condiciones de 25°C en luz difusa.

Para cada ensayo se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), con seis repeticiones para la determinación del mejor agente desinfectante, tres repeticiones para la determinación del agente antioxidantes y del regulador de crecimiento. Para comparar las medias se realizó un análisis de variancia

ANDEVA; además, al ser datos no continuos se realizó una prueba no paramétrica de k medias Friedman (Steel y Torrie, 1985) con el paquete estadístico SPSS 17.0.

Las variables evaluadas en los diferentes ensayos experimentales fueron: a) La asepsia de explantes, para lo cual se realizaron observaciones cada 5 días para determinar el porcentaje de incidencia de hongos y bacterias hasta los 15 días. La determinación de la presencia de contaminantes fungicos se basó en la identificación visual del micelio generalmente saliendo de la yema del explante, las bacterias se identificaron por su apariencia lechosa y su color amarillo/anaranjado las cuales se manifestaron dentro del medio de cultivo o alrededor el explante en contacto con el medio de cultivo. b) La evaluación de la oxidación de los explantes se realizó por medio de observaciones visuales, una observación al día siguiente del cultivo, posteriormente las observaciones se realizaron cada 5 días para determinar el grado de oxidación hasta los 15 días. Para determinar la severidad de la oxidación se realizó la siguiente clasificación: Grave: el explante se encuentra totalmente pardo y el medio de cultivo sufrió un cambio de coloración; Intermedia: el explante tiene en su mayoría partes verdes, principalmente cerca de las yemas y el medio de cultivo sufrió un cambio de coloración; Leve: el explante tiene un mínimo de oxidación, generalmente solo los bordes inferior y superior y el medio de cultivo no ha sufrido ningún cambio de color. c) Porcentaje de mortalidad, que se determinó con base en el grado de oxidación y la incidencia de contaminantes, una vez el explante se catalogó con oxidación grave se consideró un explante muerto, así mismo, si por el grado de contaminación el explante no era rescatable se consideró como explante muerto. d) La brotación se evaluó una vez cada semana, después de colocados en el cuarto de crecimiento a 25°C bajo luz difusa, se consideró brotación la presencia o bien ausencia de un brote en el explante.

Resultados

Desinfección

Las observaciones durante los 15 días de evaluación de los tratamientos de desinfección permitieron determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Se observó que el grupo de tratamientos con NaOCl al 3%, para ambos tiempos (10 y 15 minutos) (Figuras 2 y 3) presentaron el mayor porcentaje de contaminación de los explantes con un valor promedio de 41,1% y 50%, respectivamente, con relación a los otros grupos en ambos medios de cultivo. El tratamiento que consistió de la doble desinfección presentó los mayores porcentajes de explantes asépticos, con valores de 62,5% y 50% en los medios WPM y MS respectivamente.

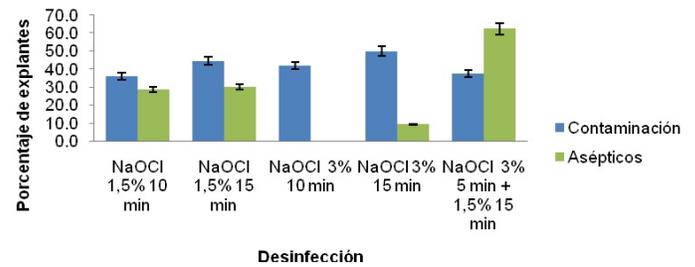


Figura 2. Contaminación y asepsia de microestacas de *Terminalia amazonia* desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl) y cultivadas en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) después de 15 días de cultivo, expresados en porcentajes de explantes.

Figure 2. Percentage of contamination and asepsia of microstems of *Terminalia amazonia* sterilized with sodium hypochlorite (NaClO) and cultivated in Murashige and Skoog medium (MS) after 15 days of been cultivated.

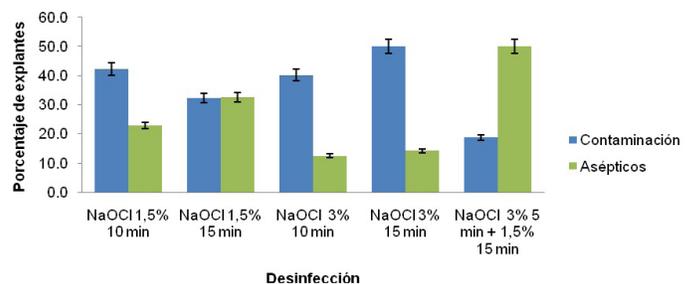


Figura 3. Contaminación y asepsia de microestacas de *Terminalia amazonia* desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl) y cultivadas en el Woody Plant Medium (WPM) después de 15 días de cultivo.

Figure 3. Contamination and asepsia of microstems of *Terminalia amazonia* sterilized with sodium hypochlorite (NaClO) and cultivated in Woody Plant Medium (WPM) after 15 days of been cultivated.

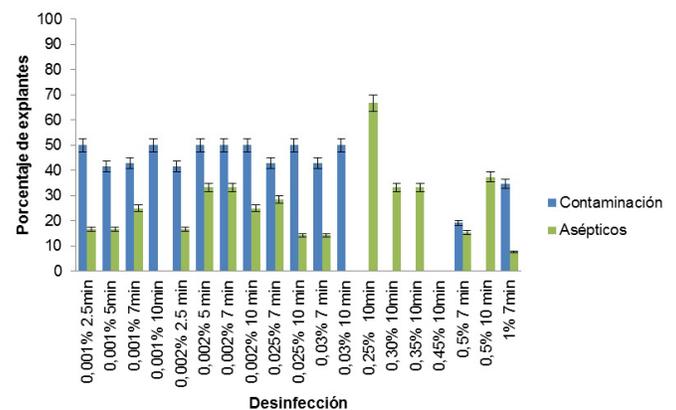


Figura 4. Efecto de los tratamientos de desinfección con cloruro de mercurio ($HgCl_2$) en las microestacas de *Terminalia amazonia* cultivadas en el medio de cultivo MS después 15 días de cultivo.

Figure 4. Effect of sterilization treatments with mercury chloride ($HgCl_2$) on *Terminalia amazonia* microstems cultivated in MS after 15 days of been cultivated.

Cuadro 2. Mortalidad y oxidación, expresados en porcentajes de explantes, de microestacas de *Terminalia amazonia* desinfectadas con NaClO, después de 15 días de cultivo en el Woody Plant Medium (WPM).

Table 2. Percentage of mortality and oxidation of microstems of *Terminalia amazonia* sterilized with NaClO, after 15 days of been cultivated in Woody Plant Medium (WPM).

Concentración de NaOCl y duración del tratamiento									
1,5% 10 min		1,5% 15 min		3% 10 min		3% 15 min		3% 5 min + 1,5% 15 min	
M	Ox	M	Ox	M	Ox	M	Ox	M	Ox
77,1	70,8	67,4	65,3	87,5	93,7	85,8	84,2	50	50

Cuadro 3. Mortalidad y oxidación, expresados en porcentajes de explantes, de microestacas de *Terminalia amazonia* desinfectadas con NaClO, después de 15 días de cultivo en el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (MS).

Table 3. Percentage of mortality and oxidation of microstems explants of *Terminalia amazonia* sterilized with NaClO, after 15 days of been cultivated in Murashige and Skoog medium (MS).

Concentración de NaOCl y duración del tratamiento									
1,5% 10 min		1,5% 15 min		3% 10 min		3% 15 min		3% 5 min + 1,5% 15 min	
M	Ox	M	Ox	M	Ox	M	Ox	M	Ox
75,0	71,4	76,8	70,1	100	100	93,8	90,8	62,5	37,5

Cuadro 4. Mortalidad y oxidación, expresados en porcentajes de explantes, de microestacas de *Terminalia amazonia* desinfectadas con cloruro de mercurio (HgCl₂), después de 15 días de cultivo en el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (MS).

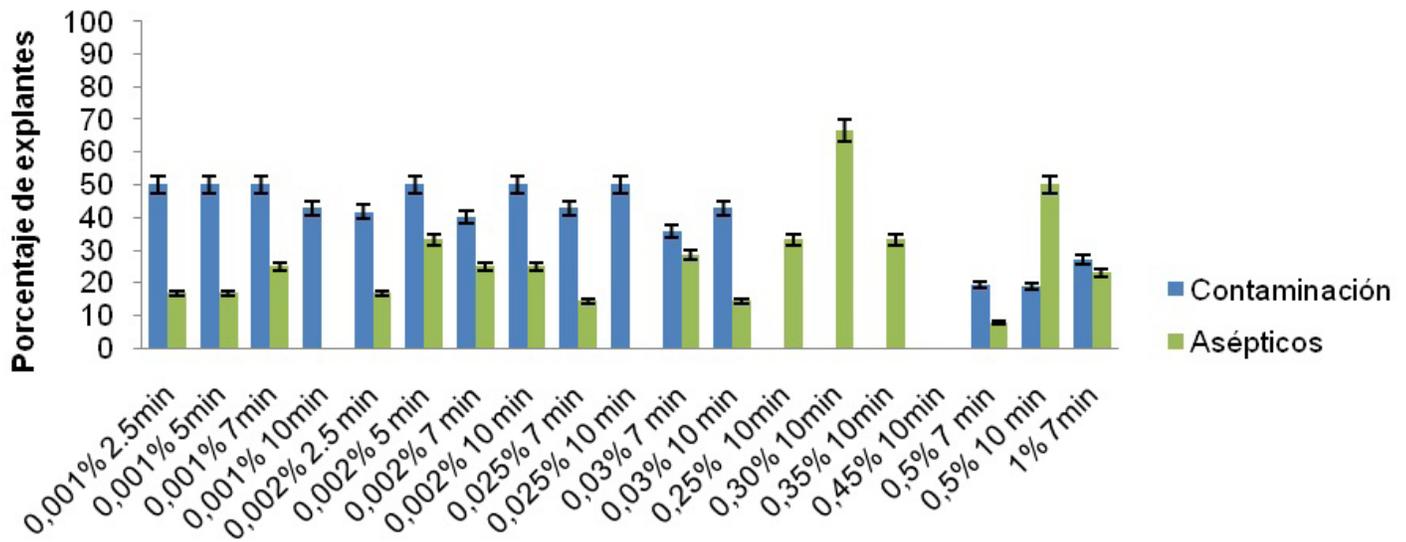
Table 4. Percentage of mortality and oxidation of microstem explants of *Terminalia amazonia* sterilized with mercury chloride (HgCl₂), after 15 days of been cultivated in Murashige and Skoog medium (MS).

Concentración HgCl ₂ (%)	Duración del tratamiento (min)							
	2,5		5		7		10	
	M	Ox	M	Ox	M	Ox	M	Ox
0,001	83,3	83,3	83,3	83,3	75	100	100	100
0,002	83,3	83,3	66,7	66,7	66,7	100	75	100
0,005					71,4	85,7	85,7	100
0,006					85,7	85,7	100	85,7
0,025							33,3	100
0,030							66,7	100
0,035							66,7	100
0,045							100	100
0,050					84,6	76,9	62,5	87,5
0,100					92,3	84,6		

Cuadro 5. Mortalidad y oxidación, expresados en porcentajes de explantes, de microestacas de *Terminalia amazonia* desinfectadas con cloruro de mercurio (HgCl₂), después de 15 días de cultivo en Woody Plant Medium (WPM).

Table 5. Percentage of mortality and oxidation of microstem explants of *Terminalia amazonia* sterilized with mercury chloride (HgCl₂), after 15 days of been cultivated in Woody Plant Medium (WPM).

Concentración HgCl ₂ (%)	Duración del tratamiento (min)							
	2,5		5		7		10	
	M	Ox	M	Ox	M	Ox	M	Ox
0,001	83,3	100	83,3	100	75	100	100	100
0,002	83,3	100	66,7	100	75	100	75	100
0,005					85,7	100	100	100
0,006					71,4	71,4	85,7	85,7
0,025							66,7	66,7
0,030							33,3	66,7
0,035							66,7	33,3
0,045							100	100
0,050					92,3	92,3	50	100
0,100					76,9	84,6		



Desinfección

Figura 5. Evaluación del efecto de los tratamientos de desinfección con HgCl₂ en las microestacas de *Terminalia amazonia* cultivadas en el medio de cultivo WPM (1981) con 15 días de cultivo.

Figure 5. Sterilization treatment effect assessment with HgCl₂ on *Terminalia amazonia* microstems cultivated in WPM culture medium (1981) with 15 days of been cultivated.

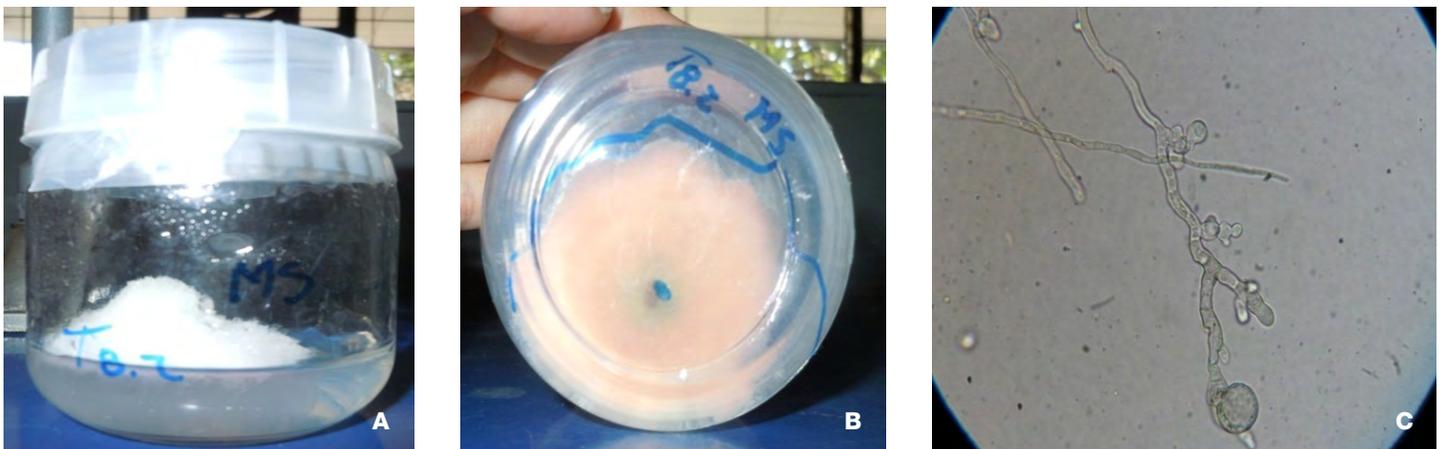


Figura 6. A) Vista macroscópica del hongo en medio de cultivo MS. B) Vista macroscópica del hongo alrededor del explante. C) Vista microscópica 100X de los conidios de *Colletotrichum* sp.

Figure 6. A) Macroscopic view of the fungus in MS culture medium. B) Macroscopic view of the fungus surrounding the explant. C) Microscopic view (100X) of *Colletotrichum* sp. conidia.

Así mismo, se evaluaron los porcentajes de oxidación causada por la desinfección con NaOCl en los explantes según el tipo de medio de cultivo empleado. Los tratamientos con hipoclorito de sodio al 3% en ambos tiempos (10 y 15 minutos) presentaron los mayores porcentajes de explantes oxidados (93,7% y 84,2% respectivamente), además, se observó que el ensayo de doble desinfección presentó los menores porcentajes de mortalidad y oxidación de explantes (50%) (Cuadro 2).

En el medio de cultivo MS, los porcentajes más altos de oxidación se presentaron para los ensayos con NaOCl

al 3% durante 10 minutos y 15 minutos de exposición al desinfectante, asimismo, la doble desinfección presentó el menor porcentaje de mortalidad y oxidación de explantes (62,5% y 37,5% respectivamente) (Cuadro 3).

Por otra parte, el tratamiento con cloruro de mercurio fue efectivo para el control de contaminantes, obteniéndose en promedio un 32% de los explantes contaminados en ambos medios de cultivo y hasta 67% de explantes supervivientes en el tratamiento con 0,25% de HgCl₂ por 10 min, en el medio MS (Figuras 4 y 5). Sin embargo, este

tratamiento mostró el mayor número de explantes muertos (78,5%), a diferencia de los tratamientos con NaOCl (73,8%) para ambos medios de cultivo (Cuadro 4 y Cuadro 5).

En cuanto a los porcentajes de contaminación (bacteria y hongo) obtenidos utilizando $HgCl_2$, con ambos medios de cultivo, se observó que las concentraciones más bajas (0,001% a 0,03%) mostraron los mayores porcentajes de contaminación (en promedio un 46%) en los cuatro tiempos de exposición. Sin embargo al ir aumentando la concentración y con un tiempo de exposición de 10 minutos se obtuvo el mayor porcentaje de explantes asépticos en ambos medios de cultivo (Figura 4 y 5).

Con el incremento de la concentración del $HgCl_2$ también aumentó el porcentaje de oxidación y por ende su mortalidad (Cuadros 4 y 5) en ambos medios de cultivo.

El análisis estadístico para cada desinfección realizada, separadas por tipo de agente desinfectante y medio de cultivo, mostró una diferencia altamente significativa (p -value <0,05) en todos los tratamientos, siendo el mejor tratamiento desinfectante la doble desinfección con hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos de inmersión, seguido por hipoclorito de sodio al 1,5% en 10 minutos de inmersión, con un nivel medio de asepsia (56,25% de explantes limpios a los 15 días de la siembra) y el menor porcentaje de explantes muertos debido a oxidación (50%).

Para los dos desinfectantes en sus diferentes concentraciones y tiempos utilizados la presencia de hongos fue casi el doble a la de bacterias. Se logró identificar el contaminante fúngico presente en la mayoría de los explantes, siendo este *Colletotrichum sp* (Figura 6). Las bacterias observadas aunque presentaban una misma coloración en la mayoría de explantes, no se logró identificar.

Tratamientos antioxidantes

Al evaluar los tratamientos antioxidantes después de un día de cultivo (24 horas) se observó presencia de oxidación en el 100% de los explantes. Sin embargo, la intensidad de la oxidación fue diferente entre los tratamientos evaluados (Figura 7). Se observó el grado de oxidación, expresado como el porcentaje de explantes en cada una de las clases cualitativas evaluadas para cada tratamiento. Los menores porcentajes de oxidación se presentaron en los tratamientos con antioxidantes adicionados al medio de cultivo, en especial con la adición de carbón activado (500mg/l) con un 53,3% de explantes clasificados con un bajo índice de oxidación o como leves. También se observó que los tratamientos con DTT mostraron los mayores porcentajes de explantes clasificados con un alto índice de oxidación (73,3%), lo que lo definió como un tratamiento ineficiente para el control de este fenómeno en los segmentos nodales de roble coral. Los tratamientos con PVPP antes de la desinfección o la combinación de ácido cítrico y

ácido ascórbico presentaron los mayores porcentajes de explantes ubicados en la clase intermedia con bajos niveles clasificados como leves o graves, (73,3% y 60% respectivamente), sin embargo no pueden considerarse como tratamientos eficaces para evitar el fenómeno de fenolización de los explantes.

Según la intensidad de oxidación se determinó que, después de 24 horas de cultivo se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, según el análisis de varianza (Steel y Torrie 1985) con un nivel de confianza del 95%. Para corroborar las diferencias significativas dadas en la ANDEVA se realizó un análisis no paramétrico de medianas a los tratamientos, según la prueba de Friedman (p -value <0,05).

Sin embargo, al realizar la última evaluación del grado de oxidación después de 15 días de cultivo, la cantidad de explantes clasificados como graves e intermedios aumentaron, disminuyendo el porcentaje de explantes categorizadas con oxidación leve (Figura 8). Tratamientos como el 6 y 7 (con L-cisteína) y 11 (con DTT) alcanzaron un 100% de explantes clasificados con oxidación grave y en los tratamientos L-cisteína no se observó sobrevivencia.

Después de 15 días de cultivo se determinó que, la presencia del antioxidante dentro del medio de cultivo, benefició la reducción de la oxidación en los explantes, observándose la mayor cantidad de explantes categorizados en el nivel leve de oxidación cuando se adicionó carbón activado (500mg/l) tratamiento que mostró un 53,3% de explantes con oxidación leve (Figura 8).

Según la intensidad de oxidación se determinó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos mediante el análisis de varianza (Steel y Torrie 1985) con un nivel de confianza del 95%. Igualmente se corroboró las diferencias significativas dadas en la ANDEVA según la prueba de Friedman (p -value <0,05).

Una vez determinada la existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos y visualizando la cantidad de explantes se lograron determinar los mejores tratamientos, es decir, aquellos que presentaron los mayores porcentajes de explantes clasificados con oxidación leve y con mayor porcentaje de sobrevivencia, siendo estos el T14 y T15 (250 y 500 mg/l de carbón activado) y el T17 (PVPP 10g/l en medio semisólido) y el T18 (PVPP 5g/l en medio líquido).

Promoción de la brotación

Para los ensayos de inducción de brotación en las microestacas, se realizaron seis introducciones, tres con material de invernadero y tres con material de campo. Las introducciones de material de campo se vieron afectadas principalmente por el alto porcentaje de contaminación, lo que causó la muerte de los explantes y por consiguiente resultados negativos en la brotación de yemas.

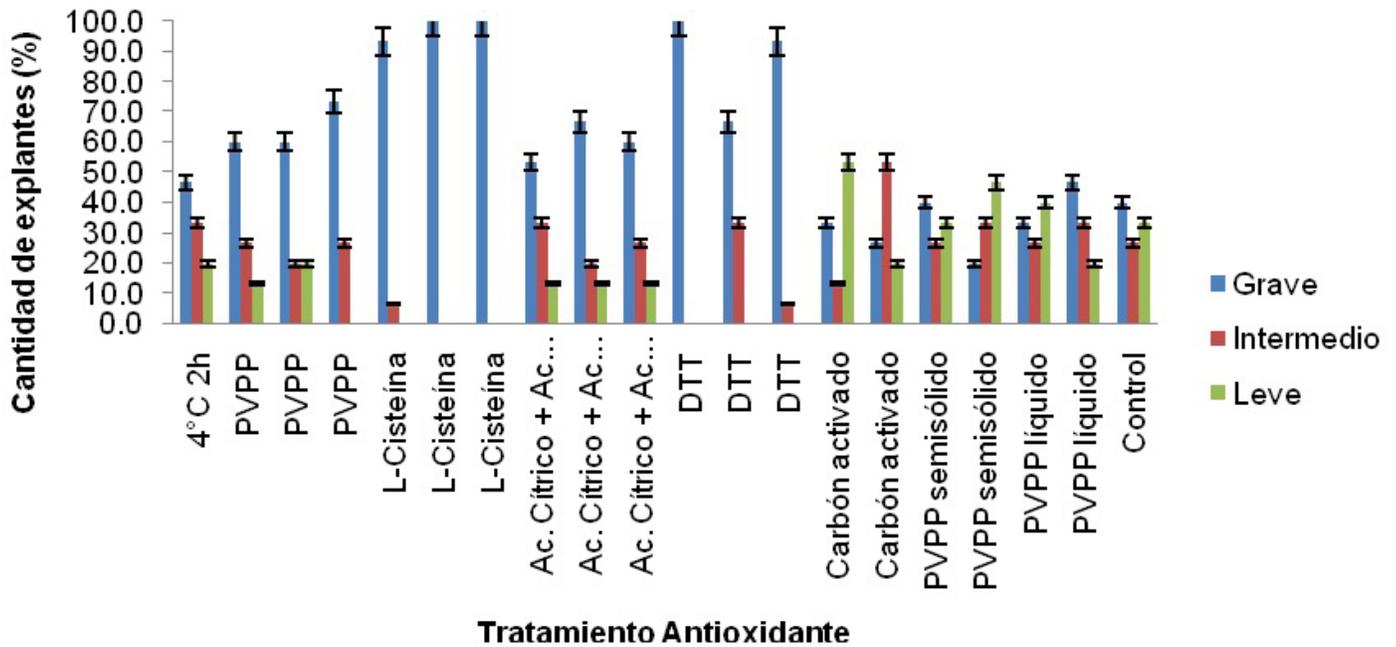


Figura 7. Nivel de oxidación presentado en los explantes de roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell) después de la aplicación de distintos tratamientos antioxidantes a las 24 horas de cultivo *in vitro*.

Figure 7. Oxidation level shown by explants of roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell) after different antioxidant treatments at 24 hours of been cultivated *in vitro*.

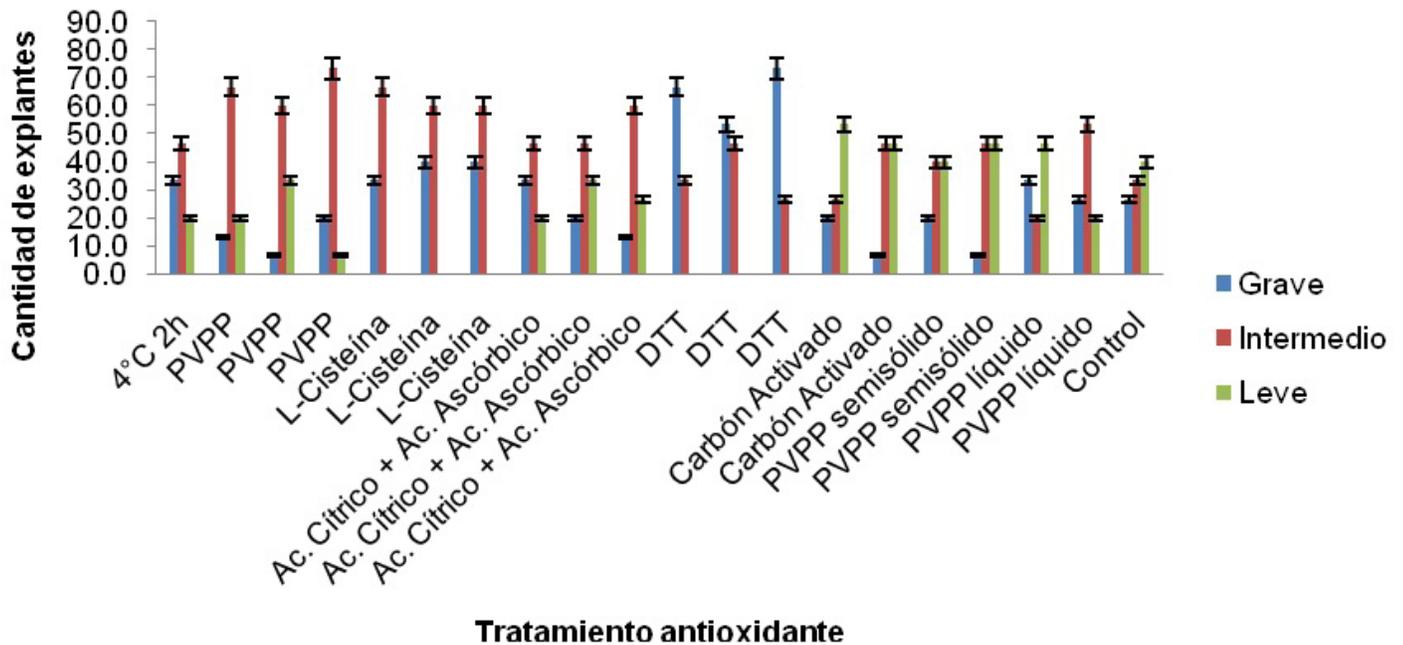


Figura 8. Nivel de oxidación presentado en los explantes de roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell) después de la aplicación de distintos tratamientos antioxidantes a los 15 días de cultivo *in vitro*.

Figure 8. Oxidation level shown by explants of roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell) after different antioxidant treatments at 15 days of been cultivated *in vitro*.

Cuando se realizó la primera introducción con material de invernadero, se descartó el uso de los reguladores de crecimiento TDZ y 2-ip, por los bajos niveles de sobrevivencia de los explantes, debido al evidente aumento de la fenolización (Figura 9). En las siguientes introducciones de este tipo de material, al utilizarse BA y KIN, se observó que la brotación se indujo únicamente con los tratamientos que incluyeron 30 mg/l de BA o 10 mg/l de KIN. Los brotes obtenidos en presencia de estos reguladores presentaron una coloración verde oscura y de 2 a 5 hojas aproximadamente (Figuras 10 A y B).

Es importante resaltar que durante esta investigación se evidenció la alta contaminación presente en el material proveniente directamente de campo, con respecto al material de invernadero, y los altos porcentajes de contaminación obligaron a desechar gran cantidad de microestacas, limitando la cantidad de material experimental.

Discusión

Desinfección

La presencia de agentes contaminantes ya sean bacterias u hongos en los cultivos *in vitro* se debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del explante a su medio, así como por las condiciones de la introducción y la fuente del material vegetal, de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como explante (Mroginski y Roca 2000). En especies leñosas las tasas de contaminación son mayores ya que en muchos casos, el material proviene de árboles creciendo en el campo donde se han asociado a otros organismos, así mismo el grado de contaminación también está determinado por las condiciones climáticas de la región, por lo que es más difícil de obtener explantes limpios de plantas del trópico húmedo que de las regiones frías o secas (Rathore *et al* 2007). Esta condición fue evidente en la presente investigación, ya que cuando se introdujo material proveniente de campo, los altos porcentajes de contaminación no permitieron su establecimiento *in vitro*, lo que obligó al uso de materiales mantenidos en invernadero, con un régimen sanitario más controlado.

Los desinfectantes se utilizan en un rango en el cual normalmente debe haber un efecto controlador de los contaminantes, sin que haya deterioro de los tejidos, desde luego que el grado de desinfección superficial obtenido depende no solo de la concentración del producto, sino también del tiempo de exposición de los tejidos al desinfectante (Mroginski y Roca 2000), así como de la procedencia del material (Rathore *et al* 2007). La concentración y el tiempo de exposición al desinfectante están totalmente relacionados tanto a la especie como al tipo de explante, siendo el hipoclorito de sodio uno de los más utilizados, ya que se considera

gentil con el tejido vegetal y no con los microorganismos contaminantes, además, es de fácil adquisición y bajo costo en el mercado. De acuerdo con Collado *et al* (2004) para segmentos nodales y ápices de caoba (*Swietenia macrophylla*), el tratamiento con NaOCl al 3,0% con un tiempo de exposición 20 minutos mostró el valor máximo de supervivencia, siendo también el mejor en cuanto a disminución de la contaminación y de los explantes necrosados. Similares resultados obtuvo Peña *et al* (2003) en ápices de guana (*Hildegardia cubensis* Urb) cuando utilizaron NaOCl al 1 y 3%, obteniendo los mejores resultados en cuanto a la disminución de la contaminación (55 y 30%) y la formación de brotes en los explantes (35% y 25%). Otros autores han utilizado exitosamente el cloro en cultivos en los que la contaminación y la fenolización del tejido dificultan el establecimiento de los explantes (Romero 2000a; Romero 2000b). Según Araya (2000), en jaúl (*Alnus acuminata*), a mayor concentración y tiempo de exposición al NaOCl, menor porcentaje de contaminación en segmentos nodales, resultados contrarios a los obtenidos en esta investigación.

Al igual que en roble coral, cuando explantes de teca fueron tomados de plantas mantenidas en invernadero, el tratamiento que permitió el mayor porcentaje de asepsia consistió de la incubación de los explantes en NaOCl al 2,4% durante 10 minutos. Sin embargo, para el establecimiento *in vitro* de brotes de teca provenientes de material de campo, ninguno de los tratamientos que incluyó una o dos desinfecciones con NaOCl en diferentes concentraciones y tiempos de incubación, en agitación o vacío, fue efectivo para lograr explantes asépticos y brotados y el uso de cloruro de mercurio fue necesario para este propósito (Abdelnour y Muñoz 2005). Contrario a lo anterior, ni en esta investigación ni durante el establecimiento *in vitro* de guana (*Paullinia cupana*) (Peña *et al* 2003), en que se utilizó HgCl₂, este tratamiento resultó efectivo por la alta contaminación con bacterias y hongos y la variación en la respuesta a sobrevivencia, que en *T. amazonia* fue menor que en las otras especies mencionadas, poniendo en evidencia la respuesta diferenciada cuando se trata de especies diferentes.

El cloruro de mercurio (HgCl₂) es un desinfectante recomendado especialmente en aquellos casos en que los explantes tienen alto grado de contaminación, como es el caso de leñosas que han pasado años en contacto con organismos variados en su ambiente natural y cuando los desinfectantes más comunes como el hipoclorito de calcio y de sodio no resultan los más adecuados, sin embargo, por el alto grado de toxicidad su manejo por parte del técnico debe ser muy cuidadoso. Por lo anterior, sería recomendable practicar la siembra de las estacas colectadas en el campo en condiciones de invernadero y tratarlas por varias semanas con algunos de los productos fungicidas y bactericidas que se encuentran fácilmente en el mercado, antes de iniciar la fase de establecimiento *in vitro*.

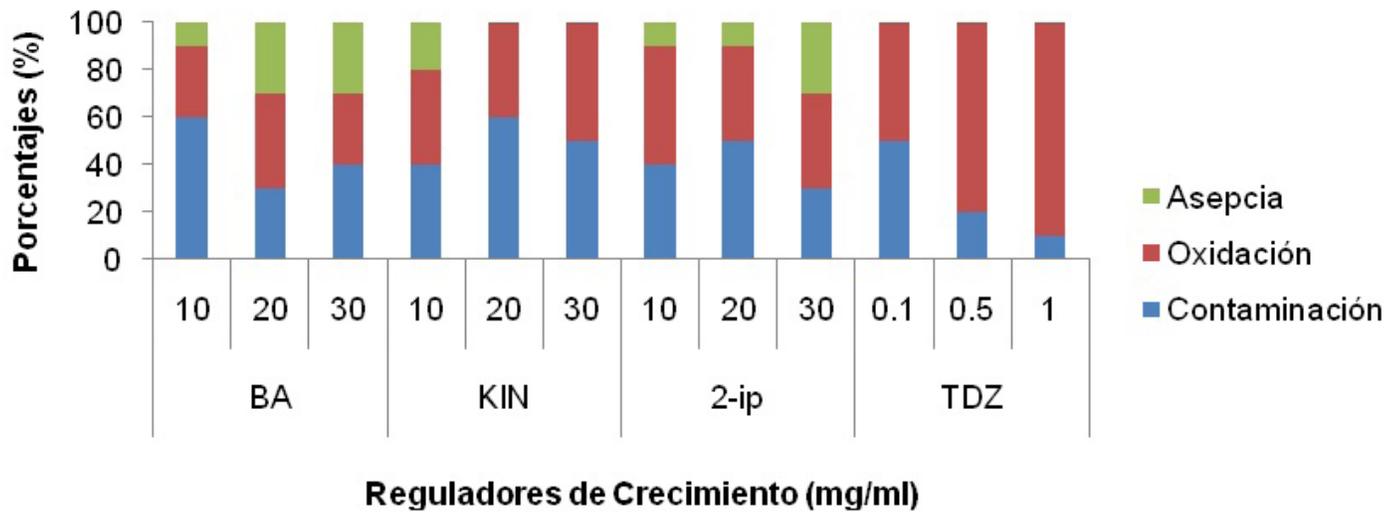


Figura 9. Niveles de contaminación, oxidación y explantes libres de contaminación en microestacas de roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell) provenientes de invernadero, al cultivarlas con diferentes reguladores de crecimiento, después de 15 días de cultivo *in vitro*.

Figure 9. Contamination and oxidation levels, and microstem explants without contamination of roble coral (*Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell) cultivated in greenhouse under different growth regulators after 15 days of been cultivated *in vitro*.



Figura 10. Vista macroscópica de brotes A) Medio de Cultivo MS complementado con 10 mg/l de Kinetina. B) Medio de Cultivo MS complementado con 30 mg/l de Bencilaminopurina.

Figure 10. Macroscopic view of buds A) MS culture medium supplemented with 10 mg/l of Kinetin. B) MS culture medium supplemented with 30 mg/l of Benzylaminopurine.

Tratamientos antioxidantes

Los compuestos fenólicos son exudados por la herida del tejido hacia el medio, a la vez son atrapados por el gelificante y acumulados formando un área negra alrededor del explante, resultando la inhibición del crecimiento (Monzon, 2005). No todos los compuestos que se producen son inhibidores del crecimiento, pero frecuentemente se encuentra que, una vez producida la decoloración, el crecimiento se inhibe y los tejidos se mueren, a no ser que se tomen medidas oportunas (Azofeifa 2009; Uscátegui y Prieto, 2013).

La extensión de la oxidación y la inhibición del crecimiento depende mucho del genotipo, este influye en la cantidad de sustancias fenólicas producidas así como en su toxicidad y es especialmente problemático en especies que contienen niveles altos de taninos y otros hidroxifenoles (Chinchilla 2008), como es el caso del roble coral.

El ácido ascórbico inhibe la oxidación reduciendo el complejo fenólico, este compuesto en la micropropagación puede actuar en dos formas como reductor o como vitamina, en los resultados reportados aquí para roble coral, este compuesto en combinación con el ácido cítrico actuó como reductor de la oxidación, observándose porcentajes intermedios de explantes con una fenolización grave (53,3%, 66,7% y 60%). Resultados similares se observaron en teca, donde el ácido ascórbico se usó junto con otros compuestos durante 24 horas para disminuir los compuestos fenólicos de dicha especie (Akram y Aftab 2009).

Por otro lado el ácido cítrico es un ácido tricarbóxico muy común en las plantas, es utilizado en la preparación de explantes y medios, siendo uno de los compuestos claves del ciclo de Krebs (Monzon 2005). Es aplicado generalmente en concentraciones que varían en el rango de 0,5 a 2% (p/v) para la prevención del oscurecimiento en frutas y vegetales, por ejercer un efecto inhibitorio sobre la PPO (polifenol oxidasa) por disminución del pH, así como por su efecto quelante sobre el cobre en el sitio activo de la enzima (Romero 2004).

La combinación de ambos antioxidantes en roble coral tuvo resultados similares a los obtenidos por Concepción et al (2005) en guayaba (*Psidium guajaba*) y Alonso (2002) en geranio (*Pelargonium* sp), los cuales reflejaron una reducción de la oxidación pero no de manera eficiente. Se reporta que el ácido ascórbico es sólo efectivo durante un corto periodo de tiempo ya que se puede convertir rápidamente en un oxidante muy fuerte (Alonso 2002).

Otro de los compuestos antioxidantes utilizados fue la L-cisteína, un aminoácido que es una solución neutra, se ha usado en el cultivo in vitro de un tipo de leguminosa (*Vicia faba* L.) donde este reactivo se adicionó

directamente al medio de cultivo y los resultados presentados fueron similares a lo obtenido con las tres concentraciones evaluadas en *T. amazonia*, en la cual a los 15 días de cultivo la oxidación fue casi del 100% causando la muerte de los explantes; en el caso del frijol faba la presencia o ausencia de la cisteína en el medio de cultivo no presentó mejora alguna en la disminución de la oxidación de los explantes (Abdelwahd et al 2008).

En cuanto al DTT o reactivo de Cleland, se ha utilizado para retardar la oxidación, especialmente de grupos -SH, ya que reduce disulfidos cuantitativamente (Monzon 2005), igualmente este antioxidante ha sido utilizado *Parakmeria lotungensis* (Mengyun y Jingmin 2004), *Pinus virginiana* (Tang et al 2004) y *Strelitzia reginae* (Zivy Halevy 1983) citados por Azofeifa (2009); sin embargo, este reactivo no resultó eficiente en *T. amazonia* en las concentraciones evaluadas.

En cuanto a los antioxidantes más empleados dentro del medio de cultivo se menciona el carbón activado, este compuesto no es tóxico y teóricamente se puede adicionar en cualquier cantidad al medio cultivo. En esta investigación, las concentraciones utilizadas con roble coral (0,5 y 0,25 g/l); generaron resultados positivos para la reducción de la fenolización en los explantes. Resultados similares reportó Borges y Sosa (2008) para el cultivo in vitro del ñame, al evaluar cuatro concentraciones diferentes (0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 g/l) observaron que las de menores concentraciones presentaron los mejores resultados sin presentar diferencias significativas entre ellos.

El carbón activado no solo reduce la oxidación, sino también en concentraciones bajas promueve el crecimiento o desarrollo en algunas especies como reporta Pedroza y Alonso (2009) en orquídeas, donde además de favorecer los procesos de crecimiento en las orquídeas, se menciona que potencializa el efecto de los fitorreguladores.

El último agente antioxidante evaluado para la introducción del roble coral fue la polivinilpolipirrolidona (PVPP), la absorción de esta sustancia química es más limitada, debido a la complejidad del fenol. Con el uso de PVPP, tanto en el medio líquido como semisólido, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al control de la oxidación y por ende la supervivencia de los explantes de *T. amazonia*. Resultados similares reporta Concepción et al (2005) con la introducción de guayaba y el uso de 500mg/l y 250 mg/l de PVPP, obteniendo un 100% de las yemas sin síntomas de fenolización, mencionando que los resultados se debieron a sus características de polímero, que le confieren funciones de absorción específicas para determinadas moléculas de compuestos orgánicos, como son los fenoles, los cuales son adsorbidos por el PVPP a través de las moléculas de hidrógeno, previniendo así su oxidación y polimerización (Concepción et al 2005).

Además de los compuestos citados, existen varias estrategias para inhibir la oxidación del tejido vegetal una vez introducido al cultivo *in vitro*, el tratamiento con bajas temperaturas o choque térmico, como se reportó para dos especies africanas de carácter medicinal (*O. bullata* y *W. salutaris*), las cuales fueron mantenidas a 4°C durante 24 horas, en una solución antioxidante de ácido cítrico y con ácido ascórbico a un pH de 4,5, esta combinación de tratamientos fue efectivo para *O. bullata* mientras que para *W. salutaris* la necrosis de los explantes fue mayor que sin este tratamiento (Kowalski y Van Staden 2001). Los resultados obtenidos con *W. salutaris* fueron similares a los expresados por roble coral con este mismo tratamiento, la disminución de la temperatura no causó efecto positivo en la inhibición de la oxidación.

Promoción de brotación

Por lo general, la propagación de plantas por cultivo de tejidos requiere de reguladores de crecimiento de tipo auxina y citocininas y en muchos casos, la organogénesis es regulada por una relación de citocinina-auxina, donde una alta relación induce brotes y una baja relación induce raíz. De esta manera, las citocininas promueven el desarrollo de brotes axilares al romper la dominancia apical regulada por la actividad auxínica del ápice. En concentraciones altas (1 a 10 mg/l) inducen la formación de brotes adventicios pero inhiben la formación de raíz (George *et al* 2008). Como se observó en esta investigación, las citocininas BAP y KIN fueron los reguladores del crecimiento que indujeron la brotación de roble coral, estos suministros exógenos de citocininas contribuyeron a obtener estas respuestas posiblemente con efecto sinérgico sobre la buena condición fisiológica de los explantes. Resultados similares se presentaron para *Swietenia macrophylla* (Flores 2001), *Tabebuia rosea* (Suarez *et al* 2006), *Tectona grandis* (Abdelnour y Muñoz 2005; Daquinta *et al* 2002), *Cedrela odorata* (Pérez *et al* 2002) entre otras especies forestales, en las que el uso de citocininas ha contribuido a su brotación; sin embargo, en la mayoría de estas especies, la concentración utilizada no llega a superar los 10 mg/l. Por el contrario, en el caso de *T. amazonia* la concentración de BAP que generó brotes fue 30 mg/l. EL BAP como una citocinina que promueve la proliferación de brotes por explante en concentraciones relativamente bajas, por lo que en el caso de roble coral al tener que usar una concentración elevada se deba a que el tejido vegetal no metaboliza dicha hormona (Flores 2001).

En cuanto a la Kinetina la concentración con la que se obtienen mejores resultados se encuentra dentro del rango normal de uso del regulador como se observa en *Cedrela odorata* (Pérez *et al* 2002). El 2-ip que no resultó efectivo para la brotación de yemas de *T. amazonia* y se menciona como especialmente efectivo para Ericáceas, por otro lado, el TDZ que es un compuesto derivado de la difenilurea, en los últimos años ha sido muy empleado para la inducción de procesos morfológicos (Murthy *et al*

1998). El TDZ ha hecho posible la regeneración de plantas de *Arachis hypogaea* por medio de la organogénesis (Kanyand *et al* 1994) y de la embriogénesis somática (Murthy *et al* 1998), generalmente es empleado para la formación de callo y no así la brotación de yemas en segmentos nodales como sería el caso con *T. amazonia*. Se menciona que se utiliza en la inducción de brotes cuando los materiales no responden a otras citocininas (George *et al* 2008).

Esta investigación indicó que el manejo del material vegetal en invernadero en condiciones sanitarias que reduzcan el inóculo de contaminantes, antes de su desinfección superficial para introducirlo a condiciones *in vitro*, permitiría el uso de desinfecciones menos drásticas y aumentar la posibilidad de lograr explantes asépticos. Además, la doble desinfección con NaOCl al 3% y 1,5%, durante 5 y 10 minutos consecutivamente, fue el mejor tratamiento para controlar la oxidación de los explantes de *T. amazonia*, al combinar las respuestas esperadas: una contaminación baja y una baja mortalidad de los explantes por oxidación. La selección del tratamiento antioxidante depende de la especie con se trabaje. *Terminalia amazonia* posee una gran cantidad de taninos y fenoles, que rápidamente pueden ser oxidados. También presenta pubescencia o tricomas que favorecen y aumentan la oxidación del explante por requerir una fuerte desinfección. Durante este estudio, la evaluación de una variedad de antioxidantes permitió descartar compuestos que dañaron el material, o que no influyeron en la reducción de la oxidación, se logró incluso seleccionar el método más apropiado de adicionarlos, al igual que el método de desinfección que causó menor daño al tejido y mayor porcentaje de explantes asépticos. En general, los resultados obtenidos parecen indicar que el uso de las citocininas BAP y Kinetina sería el camino a seguir para promover la brotación de yemas en explantes de *Terminalia amazonia* y que sería conveniente evaluar otras concentraciones y mezclas de citocininas

Agradecimientos

Al MICIT-CONICIT y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Un especial agradecimiento a FUNDECOR por el apoyo financiero y logístico.

Referencias

- Abdelnour, A., y Muñoz, A. (2005). Micropropagación de teca (*Tectona grandis*). Revista Forestal Mesoamericana Kurú, 2(5). Recuperado de <http://www.tec-digital.itcr.ac.cr/servicios/ojs/index.php/kuru/article/view/541/467>
- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M., & Udupa, S.M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology, 7(8), 997-1002. ISSN 1684-5315.

- Akram, M., & Aftab, F. (2009). An efficient method for clonal propagation and in vitro establishment of softwood shoots from epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.). *For. Stud. China*, 11(2), 105-110. doi:10.1007/s11632-009-0018-1
- Alonso, M.M. (2002). *Biología aplicada a mejora de Pelargonium sp.* (Trabajo de doctorado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid, España.
- Araya, E. (2000). Establecimiento y multiplicación in vitro de jaúl (*Alnus acuminata*). (Trabajo de Bachillerato) Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Borges, M., y Sosa, Y. (2008). Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación in vitro de ñame. *Biología Vegetal*, 8(2), 87-90.
- Chinchilla, I. (2008). Establecimiento y cultivo in vitro de *Pouteria sapota* (jacquin) H.E. moore y stearn. (Trabajo de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología.
- Collado, R., Barbón, R., Agramonte, D., Jiménez, F., Pérez, M., Gutiérrez, O., y Ramírez, D. (2004). Establecimiento in vitro de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King. *Biología Vegetal* 4(3): 143-146.
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A., Hernández, M., Peralta, N. & Trujillo, N. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.), relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Revista Cultivos Tropicales*, 26(1), 33-39.
- Daquinta, M., Ramos, L., Capote, I., Lezcano, Y., Rodríguez, R. y Escalona, M. (2002). Morfogénesis in vitro de teca (*Tectona grandis* L.). *Invest. Agr: Sist. Recur. For.*, 11(1), 1-8.
- Flores, A. (2001). Establecimiento de las etapas iniciales de la micropropagación de Caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de microestacas tomadas de plantas de invernadero. (Tesis de Maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- George, E.F., Hall, M.A., & Deklerk, G. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Springer, the netherlands (3ra ed., pp. 412-413).
- Hine, A., Rojas, A., & Daquinta, M. (2013). Establecimiento in vitro de dos especies nativas de Costa Rica, *Terminalia amazonia* (amarillón) y *Vochysia allenii* (botarrama blanco). IX Congreso Internacional de Biología Vegetal. Ciego de Ávila, Cuba. 7-9 Mayo.
- Kanyand, M., Dessai, A.P., & Prakash, C.S. (1994). Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants in vitro. *Plant Cell Reports*, 14, 1-5.
- Kowalski, B., & Van Staden, J. (2001). In vitro culture of two threatened South African medicinal trees – *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. *Plant Growth Regulation*, 34, 223-228.
- Lloyd, G., & Mccown, B. (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant. Prop. Soc.*, 30, 421-437.
- Mengyun, S., & Jingmin, J. (2004). A study on techniques of inducing callus and controlling browning of stem segments of *Parakmeria lotongensis*. *Forest Research*, 17, 757-762.
- Montero M. M. y Kanninen, M. (2003). Índice de sitio para *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell en Costa Rica. *Revista Agronomía Costarricense*, 7(1), 29-35. Recuperado de: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v27n01_029.pdf
- Montero M.M y Kanninen, M. (2005). *Terminalia amazonia*; ecología y silvicultura. Serie Técnica, Informe Técnico no. 339. CATIE, Turrialba, Costa Rica. ISBN 9977-57-404-9
- Monzon, J. (2005). Propagación in vitro de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) por medio de la multiplicación de ápices de brote. (Trabajo de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mroginsky, L., y Roca, W. (2000). Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales in vitro. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Recuperado de http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo2.pdf
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J., & Saxena, P.K. (1998). Review-Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 34, 267-275.
- Pedroza, M., y Alonso, J. (2009). Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. *Revista Colombiana De Biología*, 11(1), 17-32.
- Peña, P., Acosta, E., Galindo, L. y Bango, J. (2003). Alternativas del establecimiento in vitro en la micropropagación de la Guana. *Biología Vegetal*, 3(1), 20, 43-46.
- Pérez, J., Mesén, F., Aguilar, M. y Hilje, L. (2002). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. *Revista Forestal Centroamericana*, 38, 67-71.
- Ramesh, M., Pavan Umate, K., Venugopal, R. & Sadanandam, A. (2005). Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb. -A sericulture and medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41, 320-323.
- Rathore, J.S., Rathore, M.S., Singh, M., Singh, R.P. & Shekhawat, N.S. (2007). Micropropagation of mature tree of Citrus limon. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 239-244.
- Romero, D. (2000a). Una metodología para la desinfección y el control de la oxidación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). *Acta Científica Venezolana* 51(Sup. 2), 7.
- Romero, D. (2000b). Control de la oxidación y contaminación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). *Acta Científica Venezolana* 51(Sup. 2), 7.

- Romero, D. (2004). Cultivo in vitro de Guayaba (*Psidium guajava* L.). (Proyecto de investigación). Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Russo, R., y Speranza, M. (2001). *Terminalia arjuna* (Combretaceae) y otras especies del género: mitos, realidades y oportunidades en la terapia cardiovascular. *Rev. Costarric. Cardiol*, 3(3).
- Sarwat, M., Das, S., & Srivastava, P. S. (2010). Estimation of genetic diversity and evaluation of relatedness through molecular markers among medicinally important trees: *Terminalia arjuna*, *T. chebula* and *T. bellerica*. *Molecular Biology Reports*. Recuperado de <http://www.springerlink.com/content/84127t175u072227/> <04/02/2011>
- Scherer, J., Silveira, L., Gomes, B., Peiche, C., & Vasconcelos, A. (2006). Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.)). *Ciência Florestal*, Santa Maria, 16(4), 381-390.
- Solís, M., y Moya, R. (2004). Manual *Terminalia* amazonia en Costa Rica. Recuperado de http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Especies_plantaciones/Amarillon/Manual%20Terminalia%20amazonia%20en%20Costa%20Rica.pdf <03/02/2011>
- Steel, R., y Torrie, J. (1985). *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2 ed. Bogotá, Colombia: McGraw Hill.
- Suárez, I., Jarma, A., y Avila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de Roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Revista Temas Agrarios*, 11(2), 52-62.
- Tang, W., L.C., H., V, O., & R.J., N. (2004). Antioxidants enhance in vitro plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* mill.). *Plant Cell Rep*, 22, 871-877. doi:10.1007/s00299-004-078-1-3
- Uscátegui, Y., y Prieto, R. (2013). Bioactividad de hidrosoles, aceites esenciales y mezclas de extractos de especies vegetales para el control de *Rhizoctonia Solani*, *Phytophthora Infestans* y *Fusarium Oxysporum* en el cultivo de papa (*Solanum Tuberosum*). (Tesis de Maestría). Universidad de La Sabana, Cundinamarca, CO. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10818/9330>