

## MICROPROPAGACIÓN DE PILÓN (*Hieronyma alchorneoides*)

Ana Abdelnour<sup>1/\*</sup>, M<sup>a</sup> Elena Aguilar<sup>\*\*</sup>, Lissette Valverde<sup>†\*\*\*</sup>

**Palabras clave:** Micropropagación, cultivo in vitro, pilón, *Hieronyma alchorneoides*, citocininas.

**Keywords:** Micropropagation, in vitro culture, pilon, *Hieronyma alchorneoides*, cytokinins.

Recibido: 05/07/11

Aceptado: 23/09/11

### RESUMEN

El pilón (*Hieronyma alchorneoides*, Euphorbiaceae) es una de las especies nativas maderables de Costa Rica mejor adaptadas a condiciones abiertas de plantación; por sus características de crecimiento y variedad de usos, la demanda por material de siembra se ha incrementado. Esta especie presenta serios problemas en su reproducción sexual: es dioica, la producción de frutos muy variable en el tiempo y entre árboles, que producen gran cantidad de frutos, pero son fuertemente depredados por diferentes aves. En los últimos años el porcentaje de frutos dañados se ha incrementado a niveles considerables debido a avispas y las semillas pierden su capacidad de germinación pocos días después de la cosecha (recalcitrante).

Estos factores hacen que la micropropagación sea una opción atractiva para su multiplicación. En el presente estudio se evaluaron las diferentes etapas del cultivo in vitro. El establecimiento aséptico de los embriones se logró mediante incubación de las semillas con ácido sulfúrico concentrado por 10 min, seguido de la inmersión en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5,5% durante 30 min; los embriones fueron

### ABSTRACT

**Micropropagation of pilon (*Hieronyma alchorneoides*).** Pilon (*Hieronyma alchorneoides*) (Euphorbiaceae) is one of the native timber species of Costa Rica best adapted to conditions of open plantation. Due to its growth characteristics and variety of uses, the demand for planting material has increased. This species presents serious problems with seed reproduction; it is a dioecious, the fruit production varies over time and between trees, trees produce large quantities of fruit but are heavily predated by different birds. In recent years, the percentage of damaged fruit has increased due to wasps and the seeds lose their ability to germinate within days of harvest (recalcitrant). These factors make micropropagation an attractive option for mass propagation of the species. In the present study various stages of in vitro cultivation were evaluated. The aseptic establishment of the embryos was achieved by scarifying the seeds with concentrated sulfuric acid for 10 min, followed by incubation in 5.5% sodium hypochloride (NaClO) for 30 min, then embryos were inoculated on the culture medium described by Murashige and Skoog (MS) without growth regulators. When

<sup>1</sup> Autor para correspondencia. Correo electrónico: aabdelnour@itcr.ac.cr

\* Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Cartago, Costa Rica.

\*\* Laboratorio de Biotecnología, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

\*\*\* Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica.

inoculados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) sin reguladores del crecimiento. La asepsia de material vegetativo se logró con cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0,095% por 5 min, el 50% de las microestacas que brotaron en el medio MS simple. Además, se observó que el pilón no requiere de la adición de reguladores del crecimiento en las etapas de brotación y multiplicación.

El uso de 0,1  $\text{mg.l}^{-1}$  de ácido indolbutírico (AIB) promovió el enraizamiento del 80% de los tallos y el número mayor de raíces por tallo (5,0) de buena calidad. Se logró un 70% de sobrevivencia en la aclimatación de las plantas en condiciones de invernadero.

## INTRODUCCIÓN

El pilón (*Hieronyma alchorneoides*), también conocido como zapatero, palo curtidor, palo rosa, tinto entre otros, pertenece a la familia Euphorbiaceae. Su zona de distribución natural alcanza desde México hasta la cuenca del Amazonas brasileño y las islas de las Indias Occidentales (González 1995). En Costa Rica se encuentra en los bosques lluviosos de las zonas bajas del Norte y del Atlántico, en alturas desde el nivel del mar hasta los 800 m. Se presenta tanto en bosques primarios como secundarios y a lo largo de ríos y quebradas (Torres et al. (2002), González 1995).

En condiciones naturales presenta poblaciones pequeñas, por lo que al aprovecharla se corre el riesgo de amenazar su permanencia en el ecosistema. El pilón es una especie dioica, es decir, presenta árboles macho y árboles hembra, los cuales no pueden ser identificados antes de la floración. No se conoce la relación entre la frecuencia de los árboles macho y hembra y no todos los árboles florecen cada año. Existen árboles que nunca han presentado una floración, lo que

vegetative material was used as initial explant, the use of 0.095% mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) during 5 min, allowed 50% of cuttings to develop shoots under aseptic conditions on a simple MS medium. It was observed that pilon does not require the addition of growth regulators during bud induction nor in the multiplication stages. During rooting, the addition of indole butyric acid (IBA) at concentrations of 0.1  $\text{mg.l}^{-1}$  promoted the highest percentage of rooted shoots (80%), the largest number of roots per stem (5.0) and the best quality of the roots formed. Survival of in vitro plants after acclimation under greenhouse condition reached 70%.

dificulta la identificación de árboles semilleros (COSEFORMA 1998). La producción de frutos es muy variable en el tiempo y entre árboles. Aunque los árboles producen gran cantidad de frutos, estos son fuertemente depredados por diferentes aves y en los últimos años el porcentaje de frutos dañados se ha incrementado a niveles considerables debido a avispas de la familia Eurytomidae (Moya et al. 2009). Un problema adicional que presentan las semillas es que pierden su capacidad de germinación pocos días después de la cosecha (semillas recalcitrantes) (COSEFORMA 1998).

El pilón es una de las especies nativas que mejor se ha adaptado a condiciones abiertas de plantación, muestra poca exigencia con respecto a la calidad del sitio, buena forma de fuste y rápido crecimiento durante los primeros años, además su madera es muy apreciada en el mercado por su amplio rango de usos (Solis y Moya 2004). Se utiliza en construcciones, tanto en interiores como exteriores para puentes, pisos, carrocería de camiones, soportes, postes, barriles para sólidos, durmientes de ferrocarril, barcos y construcciones marinas (Carpio 1992). El conocimiento de

estas características ha incrementado la demanda de pilón por parte de los reforestadores (Moya et al. 2009), por lo tanto, se espera contar en un futuro cercano, con materiales de siembra de calidad para cubrir esta demanda. Sobre la micropropagación de pilón, solamente se encontraron 2 referencias de trabajos realizados en Costa Rica (Valverde 1998, Gamboa 1998); sin embargo, la metodología propuesta debió ser revisada y completada. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue establecer una metodología eficiente para la micropropagación de pilón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para los ensayos de introducción y establecimiento *in vitro* se utilizaron semillas y estacas procedentes de árboles seleccionados. Las semillas de pilón fueron suministradas por la Organización de Estudios Tropicales (OET) y el Banco de Semillas Forestales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). El material vegetativo para la introducción *in vitro* de brotes consistió de esquejes o estacas tomados de plantas ubicadas en el jardín clonal del Instituto Tecnológico de Costa Rica en la Zona Norte y en el vivero de la Escuela de Agricultura de la Región del Trópico Húmedo (EARTH). Estas estacas fueron mantenidas en el invernadero para estimular la brotación de las yemas y se asperjaron semanalmente con una mezcla de Agrimicin® y Benlate® (estrep-tomicina y benomil, respectivamente), en una concentración de 1 g.l<sup>-1</sup> de cada uno para reducir la contaminación una vez introducidas *in vitro*.

### Desinfección, establecimiento y multiplicación *in vitro*

Durante la desinfección, las semillas maduras fueron lavadas con agua y detergente, seguidamente se enjuagaron con agua corriente y se sumergieron en alcohol de 70° por 5 min. Posteriormente se incubaron en hipoclorito de

sodio (NaOCl) en varias concentraciones y tiempos de inmersión (2,75% durante 20 min, 4,12% durante 20 min, 5,5% durante 20 y 30 min). Un último tratamiento consistió de la escarificación de las semillas con ácido sulfúrico concentrado por 10 min seguida de la desinfección en 5,5% de NaOCl por 30 min. Todos los tratamientos se colocaron en agitación. Después de la desinfección, las semillas fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar y los embriones disectados y distribuidos en viales (11 cm de largo x 8 cm de diámetro) con 10 ml del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con 3% de sacarosa y 1,8 g.l<sup>-1</sup> de gelrite® como gelificante. El pH del medio fue ajustado a 5,7 antes de la esterilización por autoclave (1,2 atm de presión y 121° de temperatura durante 20 min). Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con una temperatura de 27±2°C, un fotoperiodo de 16 h luz y una intensidad lumínica de 2000 lux.

Para las pruebas de desinfección y establecimiento *in vitro* de material vegetativo se tomaron los rebotes de las estacas mantenidas en invernadero y se eliminaron las hojas, y se dejó solo una pequeña parte del pecíolo. Se utilizaron explantes de aproximadamente 3 a 4 cm con 1 a 3 nudos. Se procedió a hacer un lavado con agua y detergente y luego se incubó el material en los diferentes tratamientos de desinfección. Como desinfectante se utilizó cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) en concentraciones de 0,095, 0,1 y 0,2% durante 5 a 7 min.

Una vez desinfectados los rebotes, para inducir la brotación de las yemas axilares y la producción de nuevas plántulas *in vitro*, microestacas de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm, con un nudo, fueron cultivadas en el medio de cultivo MS al 100% de su concentración en sales minerales. Posteriormente, durante la fase de multiplicación los brotes obtenidos fueron seccionados en pequeñas microestacas de un nudo y cultivados en el medio de cultivo MS al 100 y 50% de su concentración en sales minerales, suplementado con diferentes concentraciones de zeatina (Z:0,0; 0,5; 1,0-1,5 mg.l<sup>-1</sup>), cinetina (K: 0,5-1,0 y 1,5

mg.l<sup>-1</sup>) y benciladenina (BA 0,0; 0,05; 0,10; 0,50; 1,0 y 1,5 mg.l<sup>-1</sup>) en experimentos independientes. Tanto en el medio de inducción como de multiplicación se adicionó 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y 2 g.l<sup>-1</sup> de gelrite como gelificante y los cultivos se colocaron en un cuarto de crecimiento en las condiciones descritas arriba.

### Efecto de las auxinas en el enraizamiento

Los brotes de 1,5 cm de longitud producidos in vitro, indistintamente de su origen (del cultivo de microestacas o embriones), fueron colocados en el medio de cultivo MS con la concentración de sacarosa y gelificante similares al anterior medio, con la concentración de sales completa (100% MS) y a la mitad de su concentración (50% MS) con 1 de 4 concentraciones (0,1-0,2-0,3-0,4 mg.l<sup>-1</sup>) de ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA), en experimentos independientes. Los cultivos se colocaron en las mismas condiciones que el ensayo anterior.

### Aclimatación de las plantas en el invernadero

Para la aclimatación de las plantas en el invernadero se utilizó suelo de bosque, (Guápiles, Costa Rica) el cual se distribuyó en bolsas plásticas de polietileno (15 cm x 25 cm) para el trasplante de las plantas producidas in vitro. Para este ensayo se utilizó un total de 100 plantas enraizadas in vitro con un tamaño entre 3 y 5 cm, se lavó el exceso de gelificante de las raíces y las plantas se mantuvieron en una cámara con una temperatura de 30°C. El riego fue manual cada 2 ó 3 días y después de un período de 60 días en invernadero, las plantas fueron evaluadas con base en el porcentaje de supervivencia.

### Diseño experimental y análisis de datos

En todos los experimentos se empleó un diseño irrestricto al azar, un total de 20 explantes por tratamiento, un explante por tubo y cada tubo de ensayo representó una unidad experimental. Cada experimento fue repetido 2 veces. Las variables evaluadas fueron sobrevivencia al agente de desinfección (%), asepsia (%), brotación

(%), número promedio de brotes; enraizamiento (%), número promedio de raíces y porcentaje de aclimatación (%).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Desinfección, establecimiento y multiplicación in vitro

El material de campo está expuesto a gran cantidad de agentes contaminantes, de ahí que el éxito o fracaso en la micropropagación de una especie, en muchas ocasiones, dependerá de un adecuado sistema de desinfección del material inicial (George et al. 2008). Para la desinfección superficial de los explantes se utiliza productos variados, como el alcohol, los cloruros de sodio, calcio y mercurio entre otros, sin embargo; el etanol es uno de los desinfectantes que se utiliza comúnmente, previo al tratamiento con hipoclorito de sodio, considerándose efectivo contra bacterias y hongos (Lummerding 2001). Cuando las semillas fueron incubadas por 20 min en concentraciones crecientes (2,75%, 4,12% y 5,5%) de NaOCl (Cuadro 1) se observó un incremento en el porcentaje de embriones asépticos establecidos in vitro (13%, 20% y 38% respectivamente). Los embriones que fueron incubados en la mayor concentración de NaOCl (5,5%, durante 30 min), presentaron el mayor porcentaje de asepsia (61%). Sin embargo, cuando previo al tratamiento de desinfección se realizó la escarificación de las semillas, se observó el 100% de embriones establecidos in vitro, lo que podría indicar que el ácido sulfúrico utilizado en combinación con el desinfectante provocó una mejor remoción de los agentes contaminantes. La contaminación que se encontró en los tratamientos fue principalmente bacteriana.

Es importante señalar que durante la disección de los embriones, el 35% de las semillas desinfectadas fueron desechadas, debido a la presencia de diferentes estadios larvales y adultos de la avispa *Eurytoma* sp., familia Eurytomidae (Hymenoptera) (Figura 1A). Al parecer la avispa ovoposita en el fruto y la larva se alimenta del

Cuadro 1. Establecimiento in vitro de embriones de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) después de la incubación en alcohol de 70° durante 5 min y diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaOCl) y escarificación con ácido sulfúrico concentrado seguido de NaOCl.

| Tratamiento                       | Embriones establecidos<br>asépticamente*<br>(%±E.S) |
|-----------------------------------|---|
| 2,75% NaOCl 20 min                | 13±1,4  |
| 4,12% NaOCl 20 min                | 20±2,1  |
| 5,5% NaOCl 20 min                 | 38±1,4  |
| 5,5% NaOCl 30 min                 | 61±1,4  |
| Escarificación, 5,5% NaOCl 30 min | 100±0,0   |

\* Promedio de 20 unidades por tratamiento y 2 ensayos±Error Estándar.

embrión causándole la muerte, lo que podría explicar los bajos porcentajes de geminación que frecuentemente se observan en las semillas (COSEFORMA 1998). En estudios previos se observó que los porcentajes de germinación varían entre frutos de diferentes árboles y el daño por la avispa es mayor en la primera cosecha del año (Abdelnour et al. 2007, COSEFORMA 1998).

Con respecto al establecimiento de microestacas in vitro, el mayor problema encontrado se presentó durante la etapa de desinfección, el uso de cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) permitió el establecimiento aséptico de las estacas pero en algunos tratamientos se incrementaron los niveles de mortalidad. El mayor porcentaje de brotación de yemas fue del 50%, cuando se utilizó la menor concentración de  $HgCl_2$  (0,095%) durante 5 min de incubación y además la contaminación y mortalidad se redujeron al 13% y 37%, respectivamente. Al utilizar la misma concentración de  $HgCl_2$  pero con el material inicial incubado durante 7 min, el porcentaje de contaminación disminuyó al 10%, pero la mortalidad aumentó al 52% y el porcentaje de yemas brotadas disminuyó al 38% (Cuadro 2).

Las mayores concentraciones de  $HgCl_2$  evitaron la contaminación, pero provocaron una mortalidad del 100% en la mayoría de los casos.

Este desinfectante ha sido utilizado con efectos positivos en la introducción de semillas y brotes de otras especies forestales y leñosas (Ostrolucka et al. 2007, Abdelnour y Muñoz 2005, Gamboa 1998, Monteuis et al. 1998). El Cloruro de mercurio se incluye entre los desinfectantes que presentan metales pesados y se caracterizan porque son muy tóxicos y activos en muy bajas concentraciones y actúan sobre enzimas claves inactivándolas al reaccionar específicamente con grupos sulfidriilo (SH) (Flores 2001, CIAT 1991).

Durante la inducción de brotes a partir de las microestacas establecidas asépticamente, se observó que, tanto los tratamientos con zeatina, como el tratamiento testigo (sin zeatina) mostraron una respuesta muy similar, sin existir diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey  $p=0,01$ ) (Cuadro 3). Sin embargo, la adición de zeatina indujo efectos indeseables como la formación de gran cantidad de yemas hiperhídricas cuando el medio fue enriquecido con concentraciones superiores a 0,5 mg y en algunos casos las yemas presentaron deformaciones. Resultados similares fueron observados cuando se adicionó BA. El mayor porcentaje de estacas brotadas (85%), se observó en ausencia de este regulador del crecimiento. En presencia de BA los porcentajes de brotación disminuyeron hasta alrededor del

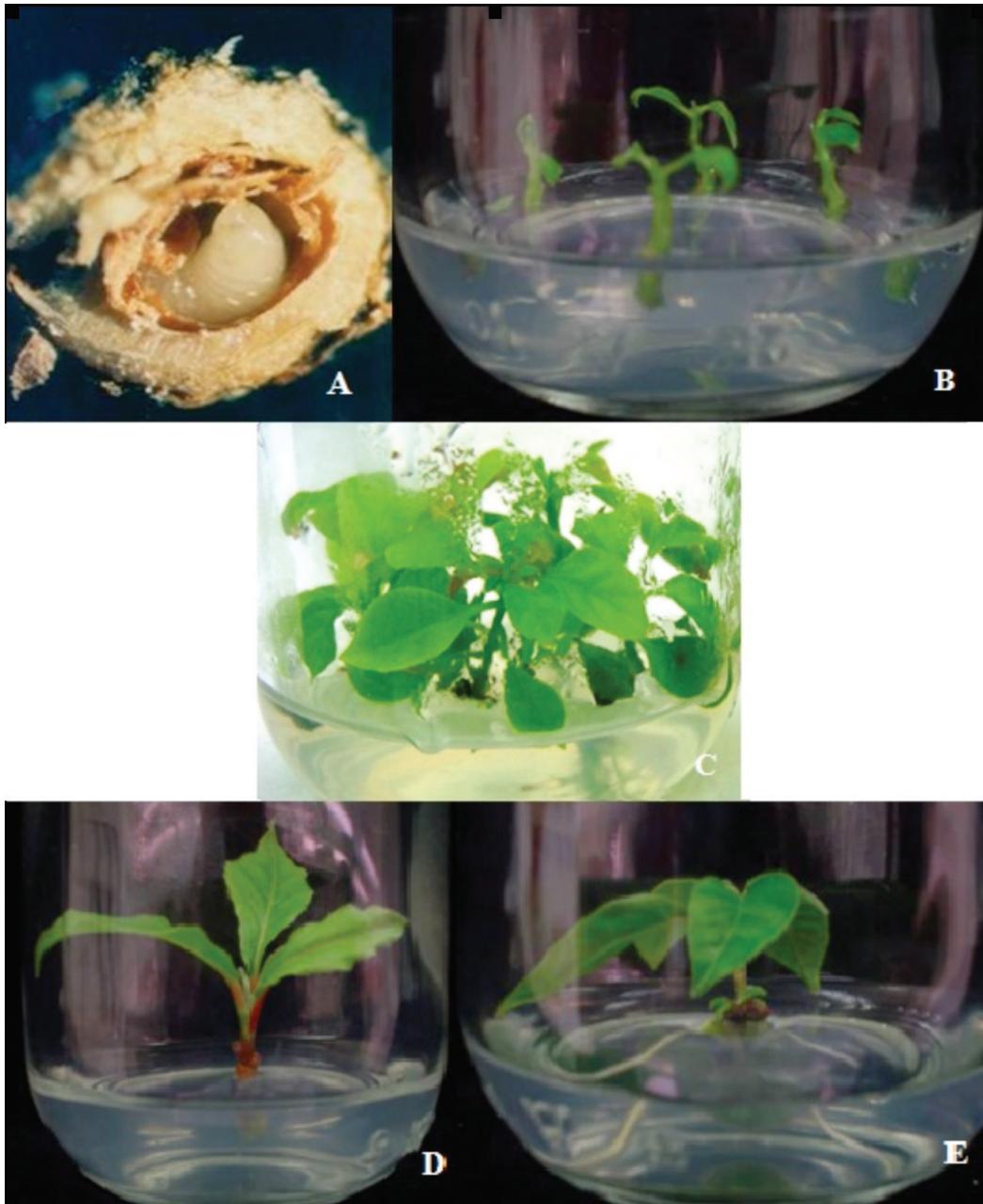


Fig. 1. A) Fruto de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) que muestra el daño ocasionado por la larva de la avispa *Eurytoma* sp. B) Microestacas en fase de multiplicación. C) Brotes formados durante la multiplicación D) Brote en el medio de inducción de raíces E) Planta enraizada.

Cuadro 2. Contaminación, mortalidad y brotación in vitro de microestacas de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) sometidas a diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> y tiempos de inmersión previo al cultivo en medio MS (1962) sin reguladores del crecimiento.\*

| Tratamiento de desinfección |              | Contaminación (%) | Mortalidad (%±ES) | Brotación (%) |
|-----------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|
| HgCl <sub>2</sub> (%)       | Tiempo (min) |                   |                   |               |
| 0,2                         | 5            | 75±3,5            | 0                 | 25±1,7        |
| 0,2                         | 7            | 0                 | 100               | 0             |
| 0,1                         | 5            | 0                 | 100               | 0             |
| 0,1                         | 7            | 0                 | 100               | 0             |
| 0,095                       | 5            | 13±1,0            | 37±1,4            | 50±1,0        |
| 0,095                       | 7            | 10±1,0            | 52±2,0            | 38±2,0        |

Cuadro 3. Brotación de yemas de pilón (*Hieronyma alchorneoides*), durante la multiplicación de microestacas con varias concentraciones de zeatina (Z) y benciladenina (BA).

| Tratamiento                   | Brotación (%) | Brotos por explante (Nº. promedio) |
|-------------------------------|---------------|------------------------------------|
| Zeatina (mg.l <sup>-1</sup> ) |               |                                    |
| 0                             | 90a           | 2,5a                               |
| 0,5                           | 85a           | 2,4a                               |
| 1                             | 80a           | 2,6a                               |
| BA (mg.l <sup>-1</sup> )      |               |                                    |
| 0                             | 85a           | 2,1a                               |
| 0,5                           | 62b           | 2,0a                               |
| 1                             | 62b           | 1,5b                               |

Datos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes (Tukey p=0,01).

60%, aunque el número de brotes desarrollados por estaca fue similar a los mostrados en ausencia de BA (Cuadro 3). La longitud de los brotes varió de 7 a 4 cm después de 8 semanas de cultivo. La ventaja del uso de BA con respecto a la zeatina fue que los brotes presentaron mayor conformidad morfológica y no mostraron hiperhidricidad.

La hiperhidricidad es un desorden fisiológico que se da en cultivo in vitro producto de diferentes condiciones de estrés ocasionadas por elevados niveles de humedad, potencial hídrico, concentraciones de reguladores de crecimiento, intensidad lumínica y acumulación de gases en la atmósfera de cultivo. Las plantas presentan brotes

delgados de apariencia vidriosa, quebradiza y deformaciones en el tejido vascular y epidérmico (Deberegh et al. 1981, Ziv 1991, George 1996). Estudios más recientes evidencian que el estrés oxidativo es uno de los principales factores responsables de la hiperhidricidad in vitro (Saher et al. 2004).

Cuando las microestacas fueron cultivadas sin citocininas en el medio MS con 100% de la concentración de sales (Cuadro 4, Figura 1B) se observó 62% de brotación y un número de rebrotos por microestaca de 3,6. Sin embargo, cuando se utilizó el medio MS al 50% de la concentración de sales, el porcentaje de brotación

Cuadro 4. Efecto de la concentración de sales de Murashige y Skoog (MS) en la multiplicación in vitro de microestacas de pilón (*Hieronyma alchorneoides*), después de 8 semanas de cultivo.

| Sales minerales (MS) | Brotación (%) | Nº. promedio Brotes por explante |
|----------------------|---------------|----------------------------------|
| 100%                 | 62ab          | 3,6ab                            |
| 50%                  | 69a           | 4,9a                             |

Datos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $p=0,01$ ).

fue mayor (69%) y el número de rebrotes por estaca aumentó a 4,9. Los resultados observados parecen indicar que con un medio muy simple y en ausencia de citocininas, el pilón es capaz de rebrotar y producir un importante número de brotes de buena calidad por microestaca (Figura 1C). Estos resultados coinciden con lo recomendado para la multiplicación in vitro del cedro colorado (*Toona ciliata*), donde un MS con un 25% de la concentración de sales fue el tratamiento más eficiente en esta etapa (Mroginski et al. 2003). El medio de cultivo MS se caracteriza por ser rico en nutrientes, principalmente en nitrógeno y la favorable respuesta obtenida, aún sin la presencia

de suplementos adicionales, nos indica que el pilón posee una buena respuesta in vitro.

### Enraizamiento

Los primeros indicios de formación de raíces en los tallos de pilón se observaron después de 18 días de cultivo y a los 27 días se observó la formación de raíces en todos los tratamientos evaluados (Cuadro 5). Aquellos tallos cultivados en el medio de cultivo MS al 50%, en presencia de AIB, mostraron en la mayoría de los casos, mayores porcentajes de enraizamiento que los cultivados en el medio MS con la concentración de sales completa. Estos tallos alcanzaron hasta

Cuadro 5. Efecto de la concentración de sales del medio de cultivo MS (1962) suplementado con AIB y ANA en el porcentaje de enraizamiento y número promedio de raíces por brote de pilón (*H. alchorneoides*).

| AIB (mg.l <sup>-1</sup> ) | MS 100%           |   | MS 50%            |   |
|---------------------------|-------------------|---|-------------------|---|
|                           | Enraizamiento (%) | Nº. promedio raíces.brote <sup>-1</sup> | Enraizamiento (%) | Nº. promedio raíces.brote <sup>-1</sup> |
| 0,1                       | 73,0a             | 5,0a                                    | 80,0a             | 5,0a                                    |
| 0,2                       | 53,0 b            | 3,6b                                    | 80,0a             | 5,0a                                    |
| 0,3                       | 66,0b             | 3,6b                                    | 60,0b             | 4,6a                                    |
| 0,4                       | 33,0c             | 1,7c                                    | 53,0b             | 4,7a                                    |
| ANA (mg.l <sup>-1</sup> ) |                   |   |                   |   |
| 0,1                       | 26,0bc            | 1,9bc                                   | 80,0a             | 1,7b                                    |
| 0,2                       | 40,0b             | 2,5b                                    | 66,0b             | 2,5b                                    |
| 0,3                       | 40,0b             | 2,8b                                    | 26,0c             | 1,6b                                    |
| 0,4                       | 40,0b             | 2,2b                                    | 33,0c             | 1,2bc                                   |

Datos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $p=0,01$ ).

un 80% de enraizamiento en presencia de 0,1 y 0,2 mg.l<sup>-1</sup> de AIB. Por otra parte, el mayor porcentaje de enraizamiento con ANA se observó cuando los tallos fueron cultivados en el medio MS al 50% con 0,1 mg.l<sup>-1</sup>. Cuando se incrementaron las concentraciones tanto de AIB como de ANA, se observó una tendencia a disminuir el porcentaje de tallos enraizados y se promovió la formación de grandes masas de callo en la base del tallo, lo que desfavoreció la formación de raíces. Excepto en el medio de cultivo al 100% suplementado con ANA, se observó que el porcentaje de enraizamiento se incrementó en la concentración de 0,2 mg.l<sup>-1</sup>, pero se mantuvo constante a concentraciones mayores. De la información obtenida se concluye que las mejores condiciones de enraizamiento se lograron con el medio de cultivo MS al 50%, suplementado con 0,1 y 0,2 mg.l<sup>-1</sup> de AIB (Figura 1 D-E). Estos tratamientos también permitieron el mayor número de raíces por planta (5,0). El AIB resultó mejor enraizador que el ANA, no solo por el número promedio de raíces por planta y el porcentaje de enraizamiento, sino también por la morfología de las raíces, ya que en algunos tratamientos en presencia de ANA, las raíces formadas fueron muy gruesas y mostraron algunas deformidades en las concentraciones más elevadas de esta auxina. Se ha observado que para muchas especies forestales, los requerimientos nutricionales en la etapa de enraizamiento son inferiores a los de las etapas de brotación y multiplicación, que al disminuir la concentración del medio de cultivo en esta etapa, favorece el enraizamiento (Gamboa y Abdelnour 1999, González y Vilca 1998). Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, ya que se mostró que para el enraizamiento de tallos, *H. alchorneoides* responde mejor a un medio de cultivo MS con la mitad su concentración de sales.

### Aclimatación de las plantas

En algunos casos, el uso de la micropropagación para la multiplicación rápida de especies vegetales se ha visto limitado por el alto porcentaje de plantas perdidas o dañadas durante

la transferencia a condiciones ex vitro, ya sea en invernadero o campo. Las condiciones in vitro (envases herméticamente cerrados, condiciones asépticas, alto suplemento de fuentes de carbono y energía, alta humedad del aire e intensidad lumínica relativamente baja), hacen que las vitroplantas presenten algunas malformaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas y tengan que pasar por un periodo de adaptación gradual a condiciones ex vitro para corregir anomalías, favorecer el desarrollo de las hojas, raíces y reducir la mortalidad ante el cambio de condiciones ambientales (Pospisilova et al. 1999).

En este trabajo, el 70% de los tallos de pilón enraizados in vitro lograron sobrevivir cuando se llevaron al invernadero para su aclimatación. En algunos casos, en la transferencia de plantas desarrolladas in vitro a suelo se obtiene muy poco éxito, porque pueden formarse raíces débiles que no responden bien a las condiciones de campo. Cuando las especies forestales muestran bajos porcentajes de sobrevivencia, principalmente en aquellos casos en que los árboles crecen en suelos poco fértiles o que no son sus suelos de origen, la inoculación de micorrizas al sustrato confiere beneficios a las plantas, éstos forman una asociación mutualista que no solo favorecería la sobrevivencia ex vitro sino también el desarrollo y vigor de las plantas (Puthur et al. 1998). Se menciona que la planta aumenta considerablemente la superficie radicular y su capacidad de absorber agua y nutrientes, por lo que se estimula significativamente el crecimiento y pueden llegar a ser mayores al 30% (Ascón-Bieto y Talón 2008). Por los resultados obtenidos en esta investigación, el proceso de aclimatación podría ser mejorado y la práctica de inoculación con hongos micorrízicos podría ser evaluada en esta especie.

### LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR A., MUÑOZ A. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis*). (en línea) Kurú: Revista Forestal. 2(5):1-11. Consultado 20 octubre de 2005. Disponible en [http://www.itcr/publicaciones/revista\\_kuru/pdf/ABDELNOUR31Ago05.pdf](http://www.itcr/publicaciones/revista_kuru/pdf/ABDELNOUR31Ago05.pdf).

- ABDELNOUR A., ROJAS G., ALFARO U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*. 20(1):98-103.
- ASCÓN-BIETO J., TALÓN M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2ª. Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España. pp. 154-157.
- CARPIO I. 1992. Maderas de Costa Rica, 150 especies forestales. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 338 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones, pp. 26-30. In: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds). Cali, Colombia.
- COSEFORMA 1998. Pilón en la Zona Norte de Costa Rica. MINAE/GTZ/ITCR/CCF. San José, Costa Rica.
- DEBEREGH P.C., HARBAOUI Y., LEMEUR R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant* 53:181-187.
- 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 Mag. Scientiae. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. 71 p.
- GAMBOA J.P., ABDELNOUR A. 1999. Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). *Agronomía Costarricense* 23:69-76.
- GAMBOA K. 1998. Propagación in vitro de *Hyeronima alchorneoides*, especie maderable nativa de Costa Rica. Práctica de Especialidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- GEORGE E. 1996. Plant Propagation by Tissue Culture, part 2. In: Practice. Exegetics Ltd, Edington.
- GEORGE E., HALL M.A., DE KLERK G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. 3 ed. Springer. pp. 2-3.
- GONZÁLEZ J. 1995. Manual para la flora de Costa Rica. Euphorbiaceae. Instituto Nacional de Biodiversidad. San José, Costa Rica.
- GONZÁLES C., VILCA J. 1998. Micropropagación vegetativa "in vitro" de aliso (*Alnus acuminata*). Red Andina de Semillas Forestales (RADEFOR-COSUDE). Cajamarca, Perú. 41 p.
- LUMMERDING P. 2001. Micropropagation Protocol Development for Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). En línea. Selection for Commercial Orchard Production. Canada. Disponible en: <<<http://www.agr.gov.sk.ca/afif/Projects/19980162.pdf>>> (15/08/2006).
- MONTEUUIS O., BON M.C., BGOH D.K.S. 1998. Teak propagation by in vitro culture. *Bois et Forêts des Tropiques*. 256:1-11.
- MOYA R., LEANDRO L., MURILLO O. 2009. Wood characteristics of *Terminalia amazonia*, *Vochysia guatemalensis* and *Hyeronima alchorneoides* planted in Costa Rica. *Revista Bosques* 30(2):78-87.
- MROGINSKI E., REY H.Y., MROGINSKI L.A. 2003. In vitro plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliata*, Meliaceae). *New Forests* 25:177-184.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- OSTROLUCKA M., GAJDOSOVA A., LIBIAKOVA G., HRUBIKOVA K., BEZO M. 2007. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp., pp. 445-455. In: S.M. Jain, H. Haggman (ed). *Protocols for micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer.
- POSPISILOVA J., TICHA I., KADLECEK P., HAISEL D. 1999. Acclimatization of micro propagated plants to ex vitro conditions. *BIOLOGIA PLANTARUM* 42:481-497.
- PUTHUR J.T., PRASAD K., SHARMILA P., SARADHI P. 1998. Vesicular arbuscular mycorrhizal improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53:41-47.
- SAHER S., PIQUERAS A., HELLIN E., OLMOS E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia plantarum* 120:152-161.
- SOLIS M., MOYA R. 2004. *Hyeronima alchorneoides* en Costa Rica. Fondo Nacional de Financiamiento San José, Costa Rica. Forestal. Ministerio de Energía y Minas. Gobierno de Costa Rica. 106 p.

- TORRES G., LUJÁN R., BARCA S.A. 2002. Especies forestales nativas para la reforestación en las regiones Brunca y Pacífico Central de Costa Rica. In: Taller seminario de especies forestales nativas. Universidad Nacional, INSEFOR. Heredia, Costa Rica. 160 p.
- VALVERDE CERDAS L. 1998. Embriogénesis somática en pilón (*Hyeronima alchorneoides*). In: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO/FAO, La Habana, Cuba. (Junio 1-5).
- ZIV M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro shoots, pp. 45–69. In: P.C. Debergh y R.H. Zimmerman (eds) Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

