

Regeneración de nogal cafetero (*Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken, a partir de organogénesis indirecta

Regeneration of coffee-shading Walnut (*Cordia alliodora* (Ruiz and Pav.) Oken) from indirect organogenesis

Lina María Londoño-Giraldo^{1*}, Luis Gonzaga Gutiérrez-López²⁺

¹Bióloga, Estudiante de Maestría en Biología Vegetal. Grupo de investigación en Biodiversidad y Biotecnología. Docente Programa de Administración Ambiental. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda, Colombia. ²Biólogo, Dr en Biotecnología Vegetal. Director Escuela de Administración Ambiental. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda, Colombia. *Autor para correspondencia: limalon@utp.edu.co; +luisgon@utp.edu.co.

Rec.: 29.07.12 Acep: 12.12.13

Resumen

En el estudio, utilizando organogénesis indirecta a partir de hoja cotiledonar se evaluó la regeneración de *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav) Oken, un árbol nativo de uso industrial, medicinal y ornamental. Para la desinfección de las semillas se utilizó hipoclorito de sodio al 3% por 15 min acompañado de la adición del preservante para plantas PPM® al medio de cultivo. En la fase de formación de callo fueron evaluados tres reguladores de crecimiento: BAP, Picloram y 2,4-D en concentraciones desde 0.5 hasta 12.5 mg/lit en condiciones de luz (12 h) y oscuridad, obteniendo callo en todas ellos. Los callos fueron transferidos a los medios de cultivo (mg/lit): BAP (1), 2,4-D (7.5), Picloram (7.5) y a medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. Después de 30 días de cultivo la mayoría de los callos se oxidaron, no obstante algunos cultivados en BAP (10 mg/lit) mostraron brotes organogénicos. Los resultados obtenidos sugieren una vía de regeneración *in vitro* posible mediante organogénesis indirecta a partir de hoja cotiledonar y permiten proponer investigaciones posteriores para avanzar en la regeneración exitosa a partir de esta u otras técnicas de regeneración *in vitro*.

Palabras clave: BAP, callogénesis, forestales nativos, organogénesis indirecta, Picloram, 2-4,D.

Abstract

This study, using indirect organogenesis from cotyledonal leaf evaluated *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav) Oken regeneration, a tree native to Colombia with industrial, medical and aesthetic properties. The seeds were first treated with 3% sodium hypochlorite solution during 15 minutes supplemented with PPM® added to the culture medium to remove any bacteria and fungi. Three hormones were tested in the induction phase: BAP, Picloram and 2,4-D in concentrations from 0,5 to 12,5 mg/L in light and dark conditions; production of callus was obtained in all of them. After thirty days most of the callus were oxidized; some callus on BAP 10mg/L showed organogenic shoots. These results suggest a way for *in vitro* regeneration through indirect organogenesis from coffee-shading walnut cotyledonal leaves and suggest that more research proceed in evaluating this regeneration technique and other *in vitro* regeneration techniques.

Key words: BAP, callogenesis, indirect organogenesis, native forest, Picloram, 2-4,D.

Introducción

La diversificación y la creciente demanda de especies tropicales de árboles maderables para reforestación industrial, silvicultura urbana, protección de cuencas y venta de captura de CO₂ a países industrializados, exige el abastecimiento de nuevos materiales de siembra así como el conocimiento de las técnicas adecuadas para su establecimiento y propagación (Farfán y Urrego, 2004). *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (Boraginaceae) es un árbol tropical caducifolio de tamaño mediano a grande (20 - 30 m), también llamado nogal cafetero en Colombia, donde se encuentra en varias regiones y es común en la zona cafetera, sur de la Costa Pacífica, Magdalena medio, nordeste del Chocó, Caquetá y Arauca (Farfán y Urrego, 2004).

El nogal cafetero, por su rápido crecimiento en altura y diámetro, la calidad de su madera, las posibilidades de plantar en asociaciones con cultivos agrícolas y en campañas para la amortiguación de desastres, es una especie promisoría en sistemas agroforestales (Farfán y Urrego, 2004), Además es una planta de alta demanda industrial, medicinal y ornamental y se encuentra dentro de las especies con alto interés en programas de conservación de germoplasma (CONIF, 2005).

CONIF (2005) y Schuler *et al.* (2005) consideran que esta especie debe ser motivo de estudios detallados sobre su propagación *in vitro*; no obstante en algunos estudios de cultivo de tejidos se encontró que aparentemente es recalcitrante en este medio, presentando baja capacidad morfogénica (Marulanda *et al.*, 2000). El objetivo en este estudio fue evaluar aspectos relacionados con la inducción de la organogénesis de *C. alliodora in vitro* partiendo de cotiledones, lo cual exigió la estandarización de protocolos para obtener la desinfección de semillas y de embriones cigóticos, evaluar la inducción de una respuesta callogénica y morfogénica y describir algunos aspectos relacionados con la conversión de estructuras organogénicas a plantas completas.

Materiales y métodos

Como material vegetal se emplearon semillas certificadas de *C. alliodora* y como soluciones

minerales completas se utilizaron: MS (Murashige y Skoog, 1962), Gelrite® 2.7 g/lt, 3% de sacarosa y ácido ascórbico (0.1 g/lt) a pH 5.8, y 2 ml/lt de la mezcla de preservantes para plantas PPM®.

Inicialmente las semillas fueron sumergidas en agua durante 24 h y lavadas con agua y jabón durante 15 min. Para la desinfección fueron sumergidas en una solución de agua destilada, hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, el fungicida Agrodine® 5 ml/lt y 2 gotas de Tween 20® por 10 min y posterior enjuague. Enseguida fueron sumergidas en Etanol (70%) durante 1 min y después de tres enjuagues, fueron tratadas con NaClO al 3% durante exposiciones de 5, 10 y 15 min. Para la extracción del embrión las semillas fueron colocadas en cabina de flujo laminar donde se sometieron a un último enjuague antes de extraer el embrión el cual fue ubicado en medio de cultivo con 6 - Bencilaminopurina (BAP) en concentración de 1 mg/lt.

Formación de callo

En esta fase se utilizaron embriones cigóticos completos, algunos cortados longitudinal y otros transversalmente. Cada tratamiento consistió de 10 frascos inoculados con 3, 4 ó 5 embriones. Para la inducción de callo se evaluó un rango relativamente amplio de concentraciones de reguladores de crecimiento, solos o con adición de BAP y auxinas Picloram y 2,4-D, cada uno en concentraciones de 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 mg/lt, para un total de 18 tratamientos. La mitad de los tratamientos se realizó con un fotoperíodo de 12 h y la otra mitad en condiciones de oscuridad a una temperatura de 28 ± 1 °C; como control se inocularon explantes en medio sin hormonas. Treinta días más tarde se evaluó la aparición y estado de los callos, incluyendo número de inducidos y con estructuras similares a masas proembriogénicas (PEM's).

Regeneración de plantas vía organogénesis

Para esta regeneración se utilizaron sólo callos con presencia de cuerpos de aspecto similar a masas proembriogénicas (PEM's) identificados en estereoscopio, con un peso aproximado de 0.45 g, los cuales fueron inoculados en medios

de cultivo, de la forma siguiente: una tercera parte de los callos inducidos con auxinas (Picloram y 2,4-D) fueron colocados en un medio que contenía BAP (1 mg/lit); una cantidad igual fueron multiplicados en medios con las concentraciones originales de auxinas; y los restantes fueron inoculados en medios sin reguladores de crecimiento. En todos los casos los tratamientos se colocaron en condiciones de luz o de oscuridad.

Un tercio de los callos generados con BAP fueron multiplicados en medios con Picloram (7.5 mg/lit) y 2,4-D (7.5 mg/lit), concentraciones de auxinas que produjeron el mayor número de callos con presencia de cuerpos similares a PEM's. Los callos restantes se multiplicaron en medio con las concentraciones originales de la citoquinina. Durante la fase de inducción la temperatura se mantuvo constante a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 30 días de aplicados los tratamientos se hicieron observaciones sobre oxidación, aparición de estructuras organogénicas en partes aéreas y raíces. En cada tratamiento se emplearon entre 10 y 20 callos.

Análisis estadístico

Para la fase de inducción se utilizó un diseño de bloques al azar, donde cada recipiente contenía entre 3 y 5 explantes con 10 repeticiones por tratamiento. Previamente los datos fueron comprobados con los supuestos del análisis de varianza (normalidad, homogeneidad e independencia) y fueron sometidos a un análisis de varianza (Anova) utilizando la prueba de Tukey de rangos múltiples ($P < 0.05$). El programa utilizado para este análisis fue Statgraphics® Centurion XV.

Resultados y discusión

Con el tratamiento de hipoclorito de sodio (NaClO 3%) durante 15 min la contaminación de semillas fue de 36% y la supervivencia de 70% (Figura 1), lo cual permitió disponer de una cantidad suficiente de material limpio al comienzo del ensayo. La aplicación de este desinfectante en mezcla con aditivos comerciales como PPM® en concentración de 2 ml/lit es efectiva para controlar la contaminación tanto por bacterias como por hongos (Mroginski *et al.*, 2010).

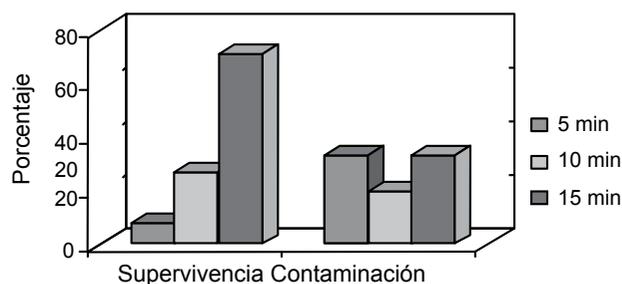


Figura 1. Porcentajes de contaminación y supervivencia de explantes de *Cordia alliodora* en tres tiempos de exposición de NaClO

Regeneración de callo

La rápida germinación de la semilla de *C. alliodora* (Foto 1A) impidió la respuesta directa del embrión cigótico en la inducción de callo, esto fue debido a que los explantes iniciaban su germinación en un tiempo corto (5 ó 6 días) (Foto 1B), por tanto, la callogénesis fue inducida a partir de material cotiledonar, tanto en el embrión completo como en el segmentado. En la multiplicación de especies con frecuencia se emplean embriones cigóticos como explantes, debido a la respuesta favorable que estos ofrecen en la inducción de callo. Algunas plantas leñosas como *Eucalyptus* spp., entre otras, han mostrado respuestas que involucran regeneración organogénica y embriogénica, cuando se utiliza como material hoja cotiledonar (Glocke *et al.*, 2006).

Cuando la inducción *in vitro* de los cotiledones de *C. alliodora* se hizo utilizando BAP y las auxinas 2,4-D y Picloram, se encontró formación de callo en todos los tratamientos tanto en condiciones de fotoperiodo como de oscuridad (Cuadro 1). Manjkhola *et al.* (2005) y Chithra *et al.* (2005) trabajando con aplicaciones de diferentes reguladores de crecimiento, tanto auxinas (2,4-D, AIB, ANA) como citoquininas (BAP) encontraron formación de callo, respectivamente en *Arnebia euchroma* y *Rotula aquatica* de la familia Boraginaceae.

La formación de callo a partir de hoja cotiledonar, segmentada o entera, de *C. alliodora* se presentó 8 días después del establecimiento de los explantes expuestos a auxinas (Foto 1C), estos callos presentaban consistencia friable y color blanco a amarillo.

Los callos inducidos por BAP se originaron 4 semanas después del establecimiento y aparecieron tanto en hoja segmentada como entera y en condiciones de fotoperiodo y oscuridad (Cuadro 1), su consistencia era friable y su color predominantemente blanco (Foto 1D). Las características morfológicas de los callos en *C. alliodora* son similares a los producidos por *Lithospermum erythrorhizon*, *A. euchroma* y *R. aquatica* (Hee-Ju *et al.*, 1997; Manjkhola *et al.*, 2005; Chithra *et al.*, 2005, respectivamente), pertenecientes a la misma familia botánica.

La mejor respuesta en la inducción de callo se observó en los tratamientos que contenían 2,4-D (12.5 mg/lit) y Picloram (7.5 mg/lit) (Cuadro 1); siendo en el primero superior en los explantes expuestos a oscuridad, mientras que en el segundo lo fueron aquellos explantes en condiciones de fotoperiodo (Cuadro 1). La mejor concentración de BAP para la inducción de callo fue de 7.5 mg/lit y un fotoperiodo de 12 h (Cuadro 1).

En el tratamiento control se presentó formación de callo en los explantes segmentados (Cuadro 1), lo que coincide con los ha-

llazgos de Chithra *et al.* (2005) en estudios de embriogénesis somática a partir de hoja cotiledonar de *A. euchroma*. Este fenómeno es explicado como el efecto de la reacción al corte del tejido y muy probablemente es consecuencia también de la aparición de polifenoles que provocan estrés oxidativo en el explante (Bhojwani y Razdan, (1996), Radice (2010).

En los tratamientos que incluyeron auxinas (2,4-D y Picloram) y en todas las concentraciones (0.5 - 12.5 mg/lit) se observaron masas similares a PEM's (masas proembriogénicas) (ver Fotos 1E y 1F). En el medio que contenía 7.5 mg/lit de 2,4-D en condiciones de oscuridad se presentó el mayor número de PEM's ($P < 0.05$) (Cuadro 1). En este caso se destaca la función de estas auxinas en el estímulo de la dediferenciación celular y el consecuente crecimiento del callo, no obstante en dosis altas es posible que interfieran la maduración de los embriones somáticos u órganos vegetales generados por organogénesis y el efecto mutagénico o de variación somaclonal. Con Picloram en concentración y condiciones similares a las anteriores, la formación de PEM's también fue significativa

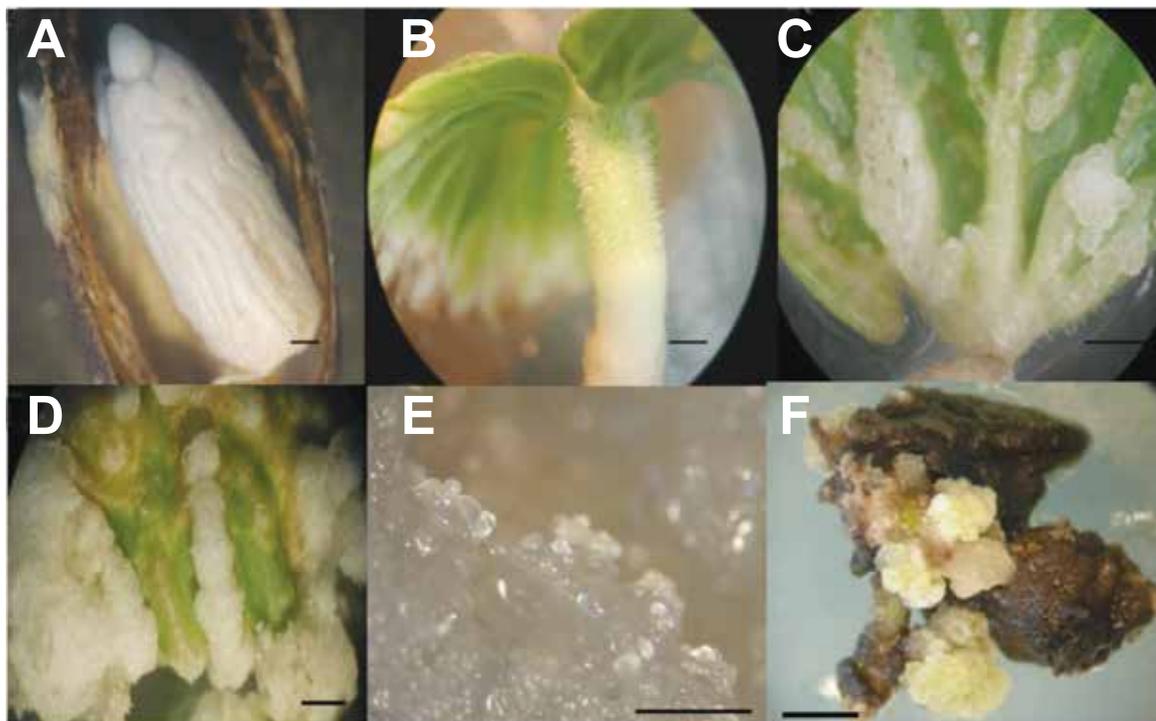


Foto 1. Formación de callo a partir de cotiledones de *Cordia alliodora*. **A.** explante (embrión cigótico), **B.** plántula germinada, **C.** callo inicial inducido bajo la acción de la auxina Picloram, **D.** callo producido bajo la acción del BAP, **E.** reconocimiento de masas similares a proembriogénicas PEMs, **F.** Callo en proceso de necrosis. Barra = 1 mm.

Cuadro 1. Reguladores de crecimiento, condiciones de cultivo, número de callos formados y con presencia de masas proembriogénicas (PEMs) de *Cordia alliodora*.

Regulador de crecimiento	Concentración (mg/lit)	Condiciones de cultivo ^a	Callos formados (± E.E.)	Callos con PEMs (± EE)	
2,4-D	0.5	Luz	2.2 ± 0.7	1.6 ± 0.5 a*	
		Oscuridad	1.0 ± 0.7	0.5 ± 0.2 a	
	2.5	Luz	2.3 ± 0.4	1.4 ± 0.4 a	
		Oscuridad	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.3 a	
	5.0	Luz	0.2 ± 0.2	0 a	
		Oscuridad	1.0	0.5 ± 0.5 a	
	7.5	Luz	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.3 b	
		Oscuridad	4.6 ± 0.4	4.2 ± 0.5 b	
	10	Luz	2.6 ± 0.6	3.0 ± 0.6 b	
		Oscuridad	2.7 ± 1.2	2.7 ± 1.2 b	
	12.5	Luz	3.2 ± 0.6	2.0 ± 0.4 b	
		Oscuridad	4.5 ± 0.6	4.0 ± 0.3 b	
	Picloram	0.5	Luz	2.3 ± 0.4	1.6 ± 0.6 a
			Oscuridad	2.6 ± 0.3	1.6 ± 0.6 a
2.5		Luz	2.6 ± 0.3	2 ± 0.5 a	
		Oscuridad	0.6 ± 0.6	1.6 ± 0.8 a	
5		Luz	2.6 ± 0.8	1.3 ± 0.8 b	
		Oscuridad	2.5 ± 0.6	2.5 ± 0.5 ab	
7.5		Luz	5.5 ± 0.4	4.5 ± 0.3 c	
		Oscuridad	3 ± 0.4	2.6 ± 0.4 c	
10.0		Luz	4.3 ± 0.3	3.3 ± 0.3 bc	
		Oscuridad	2.5 ± 0.9	2.7 ± 0.2 bc	
12.5		Luz	5 ± 0.5	4.3 ± 0.8 c	
		Oscuridad	4.3 ± 0.6	3.6 ± 0.6 c	
BAP		0.5	Luz	2.0	2.0 a
			Oscuridad	0.5 ± 0.5	1.0 ± 1 a
	2.5	Luz	2.0	2.0 ab	
		Oscuridad	3.0	2.0 ab	
	5	Luz	1 ± 1	1.0 ± 1 a	
		Oscuridad	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.4 a	
	7.5	Luz	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.4 c	
		Oscuridad	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2 c	
	10.0	Luz	1.3 ± 0.5	1.5 ± 0.5 ab	
		Oscuridad	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.3 ab	
	12.5	Luz	0.6 ± 0.4	1 ± 0.4 a	
		Oscuridad	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.4 a	
	Control		Luz	2.5 ± 0.5	0
			Oscuridad	1.5 ± 0.5	0

a = Luz: fotoperiodo de 12 h. osc.= condiciones de oscuridad.

E.E. = error estándar.

*Valores en una misma dosis de regulador seguidos de letras diferentes difieren estadísticamente ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey.

($P < 0.05$) (Cuadro 1). Con el uso de BAP, los callos desarrollaron PEM's (Foto 1E) en todas las concentraciones, no obstante el mayor número ocurrió con la concentración de 7.5 mg/lit en condiciones de luz.

Según Bhojwani y Razdan (1996) y Glocke *et al.* (2006), el éxito en la regeneración de plantas por medio de cultivo de tejidos en muchas especies que alguna vez fueron con-

sideradas recalcitrantes se debe, en buena medida, a cambios en la manipulación del medio y la selección del tipo de explante, ya que la mayoría de las plantas con baja respuesta morfogénica expresan su totipotencia celular solamente en cultivos de explantes embriogénicos. Esta respuesta puede estar relacionada con factores tan importantes como el origen, la edad y la calidad de la

planta donadora. En el presente estudio, el explante inicial de nogal cafetero se obtuvo de semillas conservadas y manejadas en condiciones de humedad y almacenamiento controladas, lo cual unido a la utilización de cotiledones, probablemente influyó de manera favorable en la inducción de callo con los tipos y concentraciones de reguladores utilizados.

Regeneración de plantas vía organogénesis

La proliferación de callos fue afectada en todos los tratamientos por la oxidación (Cuadro 2), además de la deshidratación que afectó su peso (Foto 1F). Los callos en todas las concentraciones originales de los reguladores de crecimiento, tanto en la oscuridad como en la luz, mostraron oxidación, siendo ésta de 100% en aquellos formados en 2,4-D, lo cual coincide con los hallazgos de Hee-Ju *et al.* (1997), Manjkhola *et al.* (2005) y Chithra *et al.* (2005) quienes sugieren el pardeamiento como un proceso previo a la aparición de embriones somáticos. Por otra parte, Glocke *et al.* (2006) en estudios *in vitro* con especies de

eucalipto consideran que el oscurecimiento de los callos está relacionado con varios factores que incluyen la composición del medio, la exposición a la luz, la temperatura del área de crecimiento; entre otros factores, los cuales no siempre están relacionados con una posterior regeneración de embriones somáticos.

Los callos mantenidos en 0.5 mg/lt de los reguladores 2,4-D y Picloram, en condiciones de fotoperiodo y de oscuridad, se caracterizaron por la formación de raíces probablemente como respuesta complementaria a la formación de callo. Como se sabe, las auxinas endógenas o en concentraciones bajas son utilizadas en micropropagación para inducir la formación de raíces en los callos no diferenciados así como para estimular la división de células.

La respuesta organogénica indirecta se observó en los callos mantenidos en BAP (10 mg/lt), que presentaron baja o nula oxidación (Foto 2) y escasa formación de yemas adventicias (Fotos 2C y 2D) y brotes aéreos (Cuadro 2 y Fotos 2A, 2B, 2E y 2F) los cuales fueron

Cuadro 2. Grado de oxidación y respuesta morfogénica de callos de *Cordia alliodora* en diferentes reguladores de crecimiento y condiciones de cultivo.

Auxina ^a original	Regulador de crecimiento	Condiciones del cultivo ^b	Oxidación (%)	Respuesta morfogénica	
				Raíces	Parte aérea
Picloram	BAP 1mg/L	Luz	97	SI	NO
		Oscuridad	100	NO	NO
	Picloram	Luz	96	SI	NO
		Oscuridad	100	NO	NO
2,4-D	Sin hormonas	Luz	97	SI	NO
		Oscuridad	90	SI	NO
	BAP 1 mg/lt	Luz	100	NO	NO
		Oscuridad	100	NO	NO
2,4-D	Sin hormonas	Luz	100	NO	NO
		Oscuridad	100	NO	NO
	Sin hormonas	Luz	87	SI	NO
		Oscuridad	83	SI	NO
BAP	Picloram 7.5 mg/lt	Luz	50	NO	NO
		Oscuridad	66	NO	NO
	2,4-D 7.5 mg/lt	Luz	90	NO	NO
		Oscuridad	100	NO	NO
	BAP	Luz	28	NO	SI
		Oscuridad	100	NO	NO

a = dosis de 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mg/lt.

b = Luz: fotoperiodo de 12 h. osc.= condiciones de oscuridad.

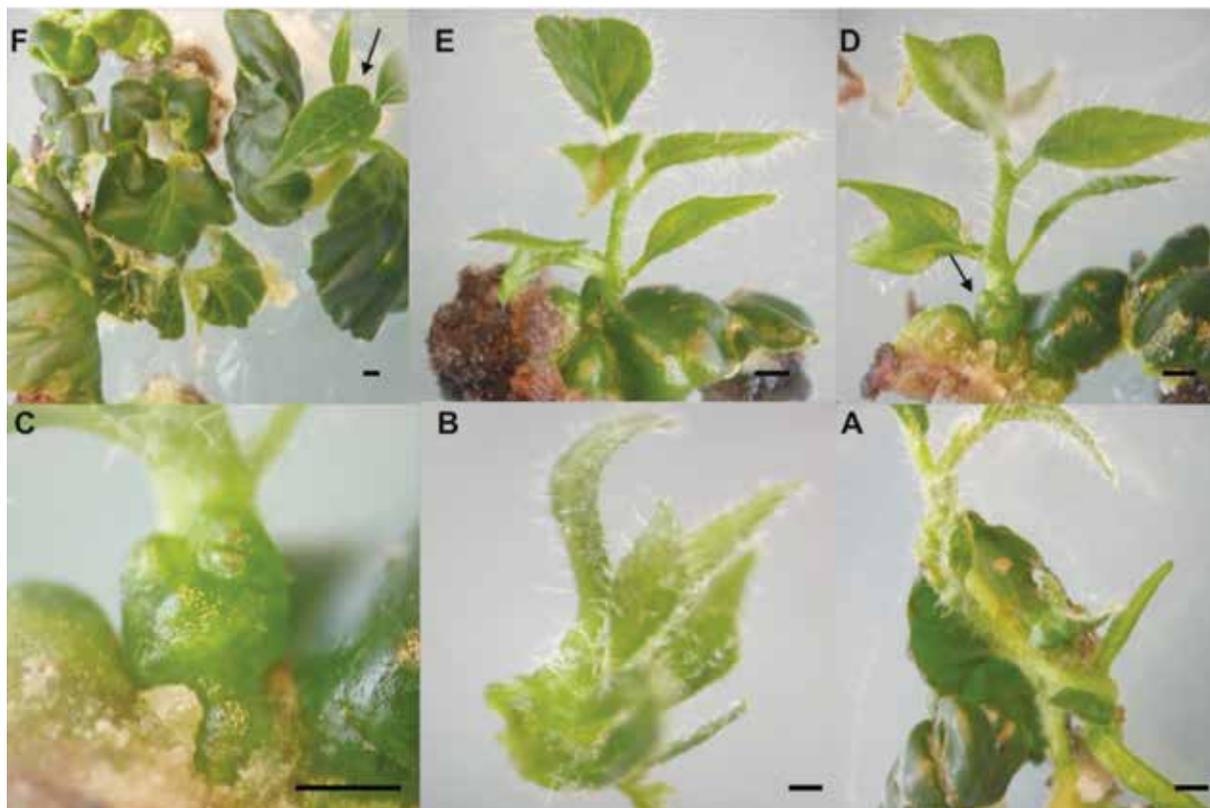


Foto 2. Regeneración in vitro de *C. alliodora* a partir de callos obtenidos y mantenidos en medio con 10 mg/lit de BAP. **A, B, C** = plántulas desarrolladas de yemas adventicias generadas a partir de callo. **D** = acercamiento de yema adventicia en la base del brote organogénico (flecha Foto. 3c). **E y F** = plántulas separadas aisladas de callo. Barra = 2 mm.

inducidos a partir de callo. Estos resultados coinciden con los de Hee-Ju *et al.* (1997) en *L. erythrorhizon* utilizando ANA más kinetina, Manjkhola *et al.* (2005) en *A. euchroma* utilizando IBA más BAP, y Chithra *et al.* (2005) en *R. aquatica*.

En nogal cafetero se ha encontrado organogénesis directa a partir de yemas apicales, nudos y/o brotes, con resultados favorables hasta climatización en vivero (Schuler *et al.*, 2005); por tanto, la organogénesis indirecta observada en el presente estudio es el primer reporte para esta especie.

Conclusiones

- El tratamiento con hipoclorito de sodio (3%) durante 15 min dio los mejores resultados para la desinfección de semillas de *C. alliodora* utilizadas en cultivo in vitro. Con este tratamiento se alcanzó un nivel de descontaminación de 64% de los explantes.

- Con el empleo de medio MS y reguladores de crecimiento 2,4-D, Picloram y BAP fue posible, en condiciones de oscuridad o luz, producir callo a partir de hoja cotiledonar de *C. alliodora*.
- En los callos obtenidos a partir de los tratamientos que incluían 7.5 mg/lit de 2,4-D y cultivo en oscuridad, Picloram en oscuridad y BAP en luz, se observó la formación de estructuras similares a masas proembriogénicas (PEMs).
- A partir de los callos de *C. alliodora* cultivados en medio MS conteniendo 10 mg/lit de BAP, se produjo regeneración de yemas adventicias y brotes aéreos, lo que muestra una vía de regeneración por organogénesis indirecta.
- Tanto los callos cultivados en medio MS sin reguladores de crecimiento (control) como aquellos provenientes de 2,4-D y Picloram (0.5 mg/lit) originaron rizogénesis en condiciones de luz y oscuridad.

Agradecimientos

A la doctora Marta Marulanda, directora del Grupo de Investigación en Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira, a los integrantes del grupo y al personal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal UTP.

Referencias

- Bhojwani, S. y Razdam, M. 1996. Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition. Elsevier. Holanda. 767 p.
- Chithra, M.; Martin, K. P.; Sunandakumari, C.; y Madhusoodanan, P. V. 2005. Somatic embryogenesis, encapsulation and plant regeneration of *Rotula aquatic* Lour. A rare rheophytic woody medicinal plant. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41:28 - 31.
- CONIF (Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal). 2005. Informe Anual 2004. Bogotá D.C. 120 p.
- Farfán, V. F. y Urrego, J. B. 2004. Comportamiento de las especies forestales *Cordia alliodora*, *Pinus oocarpa* y *Eucalyptus grandis* como sombrío e influencia en la productividad del café. Rev. Cenicafé 55(4):317 - 329.
- Glocke, P.; Collins, G; y Sedgley, M. 2006. Effects of auxins on organogenesis and somatic embryogenesis from juvenile explants of *Eucalyptus erytronema*, *E. stricklandii*, and two inter-specific hybrids. J. Hort. Sci. Biot. 81(6):1009 - 1014.
- Hee-Ju, Y.; Soo Kyung, O.; Man-Ho, O.; Dong-Woog, C.; Young Myung, K., y Sang-Gu, K. 1997. Plant regeneration from callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Reports 16:5:261 - 266.
- Manjkhola, S.; Dhar, U.; y Joshi, M. 2005. Organogenesis, embryogenesis and synthetic seed production in *Arnebia euchroma* - A critically endangered medicinal plant of the Himalaya. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 41:244 - 248.
- Marulanda, M. L.; Gutiérrez, L. G.; y Vallejo, A. 2000. Selección y propagación de nogal cafetero (*Cordia alliodora*), Aliso (*Alnus acuminata*) y Mora (*Rubus glaucus*) por cultivo de tejidos in vitro. En: Colciencias. Publicaciones y Formación de Personal en Proyectos Cofinanciados por Colciencias en el Periodo 1991 - 2000. 50 p
- Mroginski, L.; Sansberro P.; y Flaschland, E. 2010. Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales Pag: 17-25. En: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; y Mroginski L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal 2. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. 644 p.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473 - 497.
- Radice, S. 2010. Morfogénesis. En: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; y Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Cap. 2. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. 644 p.
- Schuler, G. I.; Baquero, O. S.; Gaona, T. D.; Vega, G. E.; Rodríguez, R. J.; Ramírez, S. C.; Nieto R. V.; y Hodson de Jaramillo, E. 2005. Propagación in vitro de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (nogal cafetero). Rev. Colombiana de Biotecnología 7(1):39 - 50.