

**ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE
SEGMENTOS NODALES DE *CORDIA TRICHOTOMA* (VELL.)
ARRÁB. EX STEUD (BORRAGINÁCEAS).**

Autor:

VELAZCO, SANTIAGO JOSÉ ELÍAS¹

Coautores:

PATRICIA ROCHA² FERNANDO NIELLA.²

¹ Ingeniero Forestal Egresado de la Facultad de Ciencias Forestales, UNaM. Calle América 26 Eldorado, Misiones. Argentina. (CP 3380), sjvelazco@gmail.com Celular: (0054) 03751 15441283

² Docente investigador. Facultad de Ciencias Forestales, UNAM. Bertoni 124 (3380) Eldorado, Misiones, Argentina. fniella@arnet.com.ar - lpv@facfor.unam.edu.ar

Resumen:

A fin de lograr el establecimiento y multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de *Cordia trichotoma* (Vell), se evaluaron diversos protocolos de desinfección para brotes provenientes de plantas madres de 4 años de edad. Los protocolos consistieron en la combinación de distintas concentraciones y tiempos de exposición de diferentes sustancias. Se realizó el estudio del aislamiento de las plantas madres con polietileno, y se evaluó si el grado de juvenilidad de los brotes es un factor determinante en los niveles de contaminación. En la fase de multiplicación se estudiaron el efecto de la combinación de dos hormonas (BAP y ANA) y el efecto de la frecuencia de repique junto con al aumento de la concentración de sacarosa. Los mejores resultados fueron obtenidos con el establecimiento de los brotes apenas alcanzados 5 cm de longitud, en cuyo protocolo se utilizó tween 20, alcohol, fungicida, solución de antibióticos y ClHg. Para la fase de multiplicación los resultados obtenidos no promovieron una mayor multiplicación, ni con el uso de hormonas, ni el aumento de los niveles de sacarosa o frecuencia de subcultivos.

Palabras claves: *Cordia trichotoma*, establecimiento, hormonas, multiplicación, desinfección, sacarosa, segmentos nodales, subcultivos.

Abstract

In order to achieve the Peteribí establishment and multiplication *in vitro* of nodal segments *Cordia trichotoma* (Vell.) various disinfection protocols were assessed for shoots obtained from mother plants of four years old. The protocols consisted of a combination of different concentrations and exposure times of substances. The insulation of mother plants with polyethylene, and whether the degree of juvenility of outbreaks is a key factor in the levels of contamination of the explants was also evaluated. The effect of a combination of two hormones (BAP and NAA) and the subculture frequency with the increasing concentration of sucrose were studied. The best results were obtained whith establishment just shoots reached 5cm in length, and whose protocol was used Tween 20, alcohol, fungicide, antibiotic solution and ClHg. For the multiplication phase were not achieved results that benefit a greater multiplication, or the use of hormones and increased levels of sucrose or frequency of subculture.

Keywords: *Cordia trichotoma*, establishment, hormones, multiplication, disinfection, sucrose, nodal segments, subcultures.

Introducción

Como otras especies valiosas pertenecientes a la Selva Misionera, ***Cordia trichotoma*** (Peteribí), a causa del atractivo de su madera y sus propiedades físicas–mecánica, ha sufrido una explotación que llevó a la reducción de sus poblaciones naturales; sumado además una extracción donde generalmente se escogen a los mejores individuos, causando a lo largo del tiempo, lo que se denomina una erosión genética de la especie, este hecho impulsa a buscar

métodos de propagación donde es posible masificar material valioso, la cual puede ser lograda, mediante técnicas de multiplicación *in vitro*.

En experiencias previas se ha observado que ***Cordia trichotoma*** presenta inconvenientes en su establecimiento debido a la contaminación de los explantes; por lo que torna a esta especie conveniente para el estudio de su desinfección, para lograr su establecimiento *in vitro* y posterior multiplicación. MONTAVANI (2001) realizó el establecimiento de segmentos nodales provenientes de brotes de plantas madres de seis meses mantenidas en invernáculo pero no especifica el porcentaje de pérdidas debidas a contaminación y fenolización. SCHENDELBEK (2007) estudió el efecto que tiene la época de recolección, lavandina y antibióticos sobre la contaminación de los explantes; FICK (2007) realiza estudios de germinación multiplicación *in vitro* de esta especie.

En este contexto los objetivos del presente trabajo fueron el de lograr un protocolo de desinfección eficiente para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Cordia trichotoma*, y analizar distintas variables de condiciones de cultivo, que promuevan una mayor proliferación de brotes.

Materiales y métodos

Los explantos fueron obtenidos del rebrote de plantas madres de cuatro años, ubicadas en intemperie con riego por microaspersión, Durante el período de crecimiento de los brotes fueron aplicadas semanalmente un fungicida de contacto (Captan® 15 mg/l). Los explantos fueron segmentos uninodales entre 1 y 2 cm de largo, tomados de los primeros 15 cm superiores de los brotes. En el momento de la colecta de los brotes, estos fueron pulverizados previamente con alcohol 96 % (v/v). En los experimentos de la fase de establecimiento fueron utilizados medios de cultivos provistos de sales de Murashige y Skoog (MURASHIGE, 1962), mientras que para los experimentos de multiplicación se recurrió al uso de medios WPM (Woody Plant Medium). Ambos tipos de medios fueron suplementado con 20 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar, el pH de 5.8±0.05, y autoclavados por 20 minutos a 1 atm de presión. Las condiciones de la cámara fueron de una temperatura de 25°C fotoperíodo de 16 hs y una intensidad lumínica de 43,75 $\mu\text{moles/m}^2/\text{seg}$, los primeros 7 días de siembra los cultivos fueron mantenidos bajo oscuridad.

Experimentos fase de establecimiento

Experimento 1

El diseño fue completamente aleatorizado con 20 repeticiones por cada uno de los dos tratamientos, la diferencia entre el T1 y el T2 es que en este último, como paso final del protocolo, los segmentos fueron expuestos a una solución de lavandina. El protocolo consistió en dos lavados de agua destilada estéril y Tween 20®. Inmersión en etanol (70% v/v) durante 30 seg, inmediatamente se transfirieron a una solución de Captan® al 0.5 g/l, durante 30 min. Sumersión en una solución de antibióticos 50 mg/l (sulfato de estreptomina, cefotaxima y sulfato de gentamicina), durante tres horas. Exposición de los brotes a ClHg al 0.03% p/v durante 10 min, entre cada inserción a diferentes sustancias siempre se realizaron enjuagues. Para el tratamiento T2 se expone los explantes a una solución de lavandina al 20% v/v por 10 min.

Experimento 2

A las plantas madres se aplicaron dos tratamientos diferentes, en los tratamientos T1a y T1b, luego de la decapitación de las plantas madres y la posterior aplicación de Captan® (20 mg/l), se procedió a envolver las plantas madres con polietileno transparente (ver tabla 1 y figura 1). En los tratamientos T2a y T2b, se realizó solamente la decapitación de las plantas madres, para luego comenzar con la aplicación semanal de Captan® (20 mg/l) una vez que los brotes tuvieron una longitud de 0.5 cm.

El diseño fue completamente aleatorizado con 25 repeticiones por tratamiento, con una distribución factorial de los mismos. En los tratamientos T1b y T2b como último paso de la desinfección se realizó una inmersión de los explantes en una solución de fungicida, antibióticos y antioxidante sin posterior enjuague, en los tratamientos T1a y T2a no se realizó inmersión en la solución antes mencionada. La desinfección consistió en dos lavados agua destilada estéril y Tween 20®. Inmersión en etanol (70% v/v) durante 30 seg. Exposición a Captan® 5 g/l, durante una hora. Inmersión en una solución de 50 mg/l (sulfato de estreptomicina, cefotaxima y sulfato de gentamicina), durante tres horas y exposición por 10 min a ClHg al 0.03% p/v, siempre se realizaron enjuagues entre cada paso del protocolo. Para los tratamientos T1b y T2b los explantes fueron inmersos en una solución de 250 mg/l Alliette®, sulfato de gentamicina y 50 mg/l ácido ascórbico, sin posterior enjuague.

Experimento 3

El diseño fue completamente aleatorizado con 150 repeticiones por tratamiento, se tomó como unidad experimental al explante. Luego de la decapitación de las plantas madres se procedió en la aplicación semanal de Captan® (20 mg/l), el tratamiento T1 consistió en la recolección y establecimiento de los brotes una vez que esto alcanzaron 5cm de longitud, el tratamiento T2 la recolección se realizó a los diez días de haberse efectuado el tratamiento uno.

El protocolo consistió en dos lavados con agua destilada estéril y Tween 20®. Inmersión en etanol (70% v/v) durante 30 seg. Inmediatamente se transfirieron a una solución de Agrimicina® (0.6 gr/l) y Alliete® (2 gr/l) durante una hora con su posterior enjuague con agua destilada estéril. Inmersión en una solución de antibióticos. 50 mg/l de sulfato de estreptomicina, cefotaxima y sulfato de gentamicina), durante tres horas. Inmersión en ClHg al 0.03% p/v durante 10 min, posteriormente para eliminar el mercurio de los tejidos se realizó dos enjuagues en Cl₂Ca al 3%. Se realizaron enjuagues posteriores a cada inmersión de las diferentes sustancias.

Fase de multiplicación

Experimento 1

El diseño fue completamente aleatorizado al azar con 36 repeticiones por tratamientos con una distribución factorial. Los tratamientos consistieron en la utilización de tres concentraciones de BAP (0, 2.5 y 5 mg/l), combinados con dos concentraciones de ANA (0 y 0.01 mg/l). De esta manera quedaron establecidos

un total de 6 tratamientos, fue considerado como testigo el tratamiento en el que no se usaba ninguna de las dos hormonas.

Experimento 2

El diseño fue completamente aleatorizado al azar con 50 repeticiones por tratamiento, se evaluó dos dosis de sacarosa (30 y 40 mg/l), combinados con dos frecuencia de subcultivos (cada 7 y 14 días), el testigo consistió en la utilización de 30 mg/l de sacarosa y sin la realización de subcultivos, comprendiendo un total de cinco tratamientos. La duración del experimento fue de dos meses.

Resultados y discusión

Fase de establecimiento

Experimento 1

No se logró la desinfección de hongos, obteniéndose explantes infectados de 100% y 95%. Al contrario la descontaminación de bacterias si fue posible obteniéndose valores de contaminación del 0% para el T1 y 5% para el T2. En cuanto a la presencia de explantes fenolizados fueron elevados, 45% y 70% (ver tabla 1).

Según los resultados obtenidos, la inmersión en la solución de tres antibióticos y el uso de cloruro de mercurio resulta ser efectivo para lograr la descontaminación bacteriana. Resultados semejantes fueron obtenidos por POSADAS *et al.* (2004) en la desinfección de brotes de papaya, en el que para controlar la contaminación bacteriana el mejor tratamiento consistió además de la utilización de NaOCl la sumersión previa de los ápices en una mezcla de antibióticos semejantes a la de este trabajo. SCHENDELBEK (2007) logró la descontaminación de segmentos nodales peteribí utilizando una solución de tres antibióticos más la inmersión en NaOCl. SINGH *et al.* (1997), emplearon uno solo o la combinación de diferentes antibióticos para eliminar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro*, en algunas especies de plantas y alcanzaron altos valores de establecimiento (78 %). Los porcentajes de fenolización obtenidos podrían deberse a la fitotoxicidad del ClHg e inconvenientes de fenolización natural de la especie, estos fueron aún mayores para el tratamiento T2, pudiéndose deber a la utilización de lavandina como último paso del protocolo.

Experimento 2

En todos los tratamientos el porcentajes de explantes contaminados por hongos fueron bajas (entre 0 y 12%), no se detectaron diferencias estadísticas para ningunos de los tratamientos, la contaminación bacteriana fue superior a los de hongos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el T1a, siendo el tratamiento con mayor contaminación bacteriana (52%), y el T2b con un mínimo de contaminación (4%). No se observaron diferencias estadísticas respecto al número de explantes ennegrecidos, estas se encontraban en un rango entre 4% (T2a) y 24% (T1b). La sobrevivencia se observaron entre un 40 y un 84% para los tratamientos T1a y T1b respectivamente, los cuales presentaron diferencias estadísticas entre sí. El T1b no presento diferencias significativas con los tratamientos T1b y T2a (ver tabla 2).

Según estos resultado el aislamiento de las plantas madres con polietileno no contribuye en forma significativa en disminuir las cargas microbianas de los brotes cuando se trabaja con material juvenil, esto sumado a la laboriosidad que presenta la tarea de envolver las plantas madres, hacen que los tratamientos T2a y T2b sean de poca practicidad. Estos resultados se condicen con el trabajo realizado por BONKIEVICZ (2007), en el cual no detectó diferencia estadísticamente significativa, en los porcentajes de contaminación, entre los explantes provenientes de plantas madres de incienso aislada con polietileno, respecto a los segmentos de las plantas madres no envueltas.

Experimento 3

Los porcentajes de contaminación por hongos fueron entre 7.3 y 6.6% y para bacterias de 1.3% (ver tabla 3) sin detectarse diferencias significativas en la comparación de las medias para los dos tratamientos. Respecto a la fenolización aunque se detectaron diferencias significativas, estas fueron de una muy bajo porcentaje, 0 % para el T1 y 6.6% para el T2. La sobrevivencia fue exitosa, 91,3% y 85,3% para los tratamientos T1 y T2 respectivamente, para las cuales no se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

En este experimento se trató de evaluar, el tiempo de permanencia del brote en la planta madre, una vez decapitadas. Esto puede resultar de suma importancia debido a una característica morfológica de los brotes, los cuales presentan una abúndate cantidad de tricomas (ver figura 2) por lo que posiblemente, los brotes de peteribí, a comparación con otras especies, acumulen abundante cantidad de esporas y bacterias a medida que transcurre el tiempo; más aún, cuando las plantas madres son mantenidas en intemperie y riego por microaspersión. Por lo que se podría inferir que el tiempo de permanencia del brote en la planta madre, sea un factor determinante para lograr el establecimiento exitoso de segmentos nodales de esta especie.

En la desinfección de segmentos nodales de incienso BONKIEVICZ (2007) evaluó diferentes tiempos de recolección, a los 22 días de decapitado la plantas y brotes de 6 meses de edad, con la cual los mejores resultados de asepsia fueron obtenidos con los explantes provenientes de los brotes de menor edad, con mayores sobrevivientes y menores porcentajes de contaminación (ver figura 3).

Fase de multiplicación:

Experimento 1

No se detectó interacción entre los factores para ninguna de las variables del experimento. Los menores porcentajes de fenolización fueron obtenidos con los tratamientos T2 y T5 los cuales presentan diferencias significativas con los tratamientos T3 y T4. (Ver tabla 4). No hubo diferencias significativas para el número medio de brotes ni para el número medio de hojas. Respecto al largo medio de los brotes, el mayo valore fue obtenido con el tratamiento T3 que mostro diferencias significativas con los tratamientos T4, T5 y T6 (Ver tabla 5).

Con 2.5 mg/l de BAP independiente de la concentración de ANA demostró los mayores valores para el número de explantes brotados y número de hojas por brote, a pesar de que no se detectaron diferencias significativas, pero fueron

estos tratamientos que mostraron los menores largos promedio de brotes, dando una apariencia de arrocetada.

Resultados semejantes fueron obtenidos por FICK (2007), que partiendo de segmentos nodales de propágulos seminales germinadas *in vitro*, evaluó distintas concentraciones de BAP combinado con ANA o con ácido giberélico, concluyó que la adición de reguladores de crecimiento ya sea individuales o combinadas no promovieron mejores resultados respecto al tratamiento sin hormonas. Tanto los resultados de este experimento, como los obtenidos por FICK difieren con MONTAVANI *et al.* (2001) en el cual, partiendo de segmento nodales de plantas de seis meses de edad, obtuvo una mayor elongación y multiplicación de los brotes con BAP y GA₃. CARVALHO (2003) con la adición de 0.01 mg/l de ANA en combinación con 1.0 mg/l de BAP aumentó el número de brotes por explante, siendo que la concentración de 10 mg/l de BAP inhibió la formación de los mismos y provocó la vitrificación y reducción de la producción de hojas en Peteribí (FICK 2007). SCHENDELBEK (2007) concluye que para la fase de multiplicación de brotes de Peteribí, los mejores resultados en cuanto al número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación se obtuvieron con el empleo de 1.0 mg/l de BAP con o sin la adición de 0.1 mg/l ANA.

Experimento 2

Para el porcentaje de explantes brotados se obtuvieron como menor valor el tratamiento T4 el cual contrasta estadísticamente con los demás tratamientos, los cuales no presentan diferencias significativas entre sí. El mejor resultado se consiguió con el tratamiento T0 (Ver tabla 6 y 7). El número medio de brotes no presentó diferencia significativa entre los tratamientos. Para el número de hojas si se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento T4 (2 hojas) y los tratamientos T1 y T2 (3 hojas por brote). La variable largo medio de los brotes al igual que el número de brotes no mostraron diferencias estadísticas.

Las concentraciones de sacarosa no afectaron significativamente a la mayoría de las variables estudiadas, por lo que no se encontraron diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo, Se observaron a lo largo del tiempo de evaluación que el mayor número de explantes brotados y vigorosidad de los mismos presentó el tratamiento testigo por lo que ni una mayor concentración de sacarosa ni un aumento en la frecuencia de repique parecen afectar en la multiplicación de brotes de Peteribí.

Estos resultados se contraponen con SAKER *et al* (1999) en el que en la multiplicación de *Carica papaya* L. detectó un incremento del número de brotes proporcional al aumento de las concentraciones de sacarosa en los medios de cultivo. LUNA *et al.* (2003) observaron para el cultivo *in vitro* de brotes de *Ilex dumosa*, que el nivel de fenolización se elevaba y la capacidad de los explantes de brotar disminuían al aumentar las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo, independiente de la hormona que utilizaran.

Conclusiones

- Es posible la desinfección de segmentos nodales de *Cordia trichotoma*, con el uso de brotes jóvenes recolectados apenas hayan alcanzado los 5 cm de

longitud y el empleo de un protocolo de desinfección que utiliza, etanol, tween 20, fungicidas, antibióticos, cloruro de mercurio y cloruro de calcio.

- El aislamiento con polietileno de los brotes de las plantas madres, no contribuye en forma significativa sobre los niveles de contaminación de los explantes.

- El uso de hormonas BAP y ANA no promovió una mayor brotación de los explantes, respecto al tratamiento sin hormonas.

- El aumento de la frecuencia de subcultivos y mayores concentraciones de sacarosa no lograron incrementar la brotación.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones por proveer del laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A Patricia Rocha y Fernando Niella, que siempre me ofrecieron ayuda, dedicación, y recomendaciones.

Bibliografía

BONKIEVICZ, S. 2007. Desinfección de explantes para el establecimiento *in vitro* de *Mirocarpus frondosus*. Integradora II, Carrera de Ingeniería Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales, UNaM. Pp.17

CARVALHO, P. E. R. 2003. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: EMBRAPA. Informação Tecnológica, v. 1. 1039p

FICK, T. A. 2007. Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (Louro-pardo). Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

LUNA C., Sansberro P., Mroginski L. and Tarragó J. 2003. Micropropagation of *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) from nodal segments in a tissue culture system. Biocell (Mendoza) v.27 n.2 Mendoza abr./ago.

MANTOVANI; N. C.; Franco E. T.; Henz, Vestena S. 2001. Regeração *in vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma*. (Vell.) Arráb. Ex Steud). Ciencia Florestal, Santa Maria, V. 11, n. 2: 93-101.

MURASHIGE, T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Phys. Plant. 15: 473-493.

POSADAS L. P., Kosky G. R., Colina J. G., Vega M. R., Ofarril I. H. 2004 Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99, Biotecnología Vegetal Vol. 4 No. 3: 153-158

SAKER M. M., Bekheet S. A., Taha H. S. and Reda A. A. 1999. *In vitro* Propagation of Papaya (*Carica papaya* L.) Plant Cell and Tissue Culture Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt.

SCHENDELBEK, A. L. 2007. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Cordia trichotoma* V. Tesis de maestria; Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba. Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

SINGH, S. H. Sharma, Singh S. P. 1997 Antibiotics control endogenous contaminants of papaya. Proceedings of Int. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. RA Drew (ed.) Queensland, Australia. 29 september –3 october.

Tablas y figuras

Tabla 1: Resultados obtenidos para la desinfección de segmentos nodales de *Cordia trichotoma* en tratamientos que se utilizó etanol, fungicida, antibióticos, cloruro de mercurio y lavandina.

Tratamientos	N	Contaminación %		Fenolización %	Sobrevivientes %
		Hongos	Bacterias		
T1	20	100,00	0,00	45,00	0
T2	20	95,00	0,00	70,00	5

Tabla 2: Resultados obtenidos para la desinfección *Cordia tricótoma* con la utilización de diferentes tratamientos en plantas madres e inmersión en una solución de fungicida, antibiótico y antioxidante.

Tratamientos	Tratamiento de planta madre.	Inmersión en solución.*	n	Contaminación%±ES		Fenolizados %±ES	Sobrevivencia %±ES
				Hogos	Bacterias		
T1a	No Cubierta	Sin	25	8.0±5.5a	52.0±10.1c	20.0±8.1a	40.0 ± 10.0a
T1b	No Cubierta	Con	25	0.0a	28.0± 9.1b	24.0±8.7a	64.0 ± 9.7ab
T2a	Cubiertas	Sin	25	12.0±6.6a	12.0±6.6ab	4.0 ± 4.0a	72.0 ± 9.1ab
T2b	Cubiertas	Con	25	0.0a	4.0±4.0a	12.0 6.6±a	84.0 ± 7.4b
Total			100	5.0±2.0	24,0±4,1	15.1±3	65,0±4,7

Valores identificados con distinta letra en sentido vertical son estadísticamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$) $n=25$

*Solución de Alliette® (250 mg/l), sulfato de gentamicina (250 mg/l) y ácido ascórbico (50 mg/l).

Tabla 3: Resultados obtenidos para la desinfección *Cordia tricótoma* en el que se evaluó diferentes tiempos de recolección de brotes.

Tratamientos	Tiempo	Contaminación%±ES		Fenolizados %±ES	Sobrevivencia %±ES
		Hogos	Bacterias		
T1	Hasta los 5 cm	7,3±2,1 a	1,3±0,9 a	0 a	91,3±2,3 a
T2	Luego de 10 días	6,6±2 a	1,3±0,9 a	6,6±2 b	85,3±2,8 a
Total		7±1,4	1,3±0,66	3,3±1	88,3±1,8

Valores identificados con distinta letra en sentido vertical son estadísticamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$) $n=150$

Tabla 4: Resultados obtenidos luego de 30 días, con distintas concentraciones de BAP y ANA de realizado el cultivo de los segmentos nodales de *Cordia trichotoma*.

Tratamientos	Nivel del factor	Nivel de factor	Fenolizados %±ES.	Explantos Brotados % ±ES.
T1	ANA 0	BAP 0	44,4±8,3 ab	25,0±7,3 a
T2	ANA 0	BAP 2,5	22,2±7,0 a	36,1±8,1 a
T3	ANA 0	BAP 5	50,0±8,5 b	16,7±6,3 a
T4	ANA 0,01	BAP 0	47,2±8,4 b	16,7±6,3 a
T5	ANA 0,01	BAP 2,5	22,2±7,0 a	33,3±8,0 a
T6	ANA 0,01	BAP 5	36,1±8,1 ab	25,0±7,3 a
Total			37,0 ±3,2	25,5±3,0

Valores identificados con distinta letra en sentido vertical son estadísticamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$)

Tabla 5: Resultados obtenidos luego de 30 días, con distintas concentraciones de BAP y ANA de realizado el cultivo de los segmentos nodales de *Cordia trichotoma*.

Tratamientos	Nivel del factor	Nivel de factor	n	Nº Medio de brotes±ES.	Nº Medio de hojas±ES.	Largo medio (cm)±ES.
T1 Testigo	ANA 0	BAP 0	9	1,11±0,11 ^a	2,33±0,50a	1,07±0,36ab
T2	ANA 0	BAP 2,5	13	1,00±0,00a	2,69±0,29a	0,62±0,09ab
T3	ANA 0	BAP 5	6	1,00±0,00a	2,33±0,67a	1,20±0,39b
T4	ANA 0,01	BAP 0	6	1,00±0,00a	2,33±0,61a	0,42±0,09a
T5	ANA 0,01	BAP 2,5	12	1,00±0,00a	2,42±0,31a	0,50±0,11a
T6	ANA 0,01	BAP 5	9	1,11±0,11 ^a	2,44±0,41a	0,42±0,14a
Total			55	1,04±0,03	2,450,17	0,68±0,09

Valores identificados con distinta letra en sentido vertical son estadísticamente diferentes (Duncan, p<0.05)

Tabla 6: Resultados obtenidos trascurrido dos meses de cultivo de segmentos nodales de *Cordia trichotoma*. Para distintas concentraciones de sacarosa combinada con distintas frecuencia de repique..

Tratamientos	Sacarosa mg/l	Repique Días	n	Explantos Brotados % ±ES.
T0 Testigo	30	no	28	53,5±9,5 a
T1	30	7	35	42,8±8,4 a
T2	30	14	27	40,7±9,6 a
T3	45	7	36	38,9±8,2 a
T4	45	14	24	12,5±6,8 b
Total			150	38,6±3,9

Valores identificados con distinta letra en sentido vertical son estadísticamente diferentes (Duncan, p<0.05)

Tabla 7: Resultados obtenidos trascurrido dos meses de cultivo de segmentos nodales de *Cordia trichotoma*. Para distintas concentraciones de sacarosa combinada con distintas frecuencia de repique..

Tratamientos	Sacarosa gr/l	Repique Días	n	Nº de brotes ±ES	Nº de hojas ±ES.	Largo Media (cm) ±ES
T0	30	no	15	1,1±0,09 a	3,16±0,27 ab	0,44±0,08 a
T1	30	7	15	1±0 a	3,33±0,21 a	0,59±0,06 a
T2	30	14	11	1±0 a	3,27±0,33 a	0,48±0,05 a
T3	45	7	14	1±0 a	2,92±0,38 ab	0,52±0,08 a
T4	45	14	3	1±0 a	2±0,57 b	0,33±0,03 a
Total			58	1±0,024	3,11±0,14	0,50±0,03

Valores identificados con distinta letra en sentido vertical son estadísticamente diferentes (Duncan, p<0.05)



Figura 1 Plantas madres de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. Ex Steud envueltas con polietileno



Figura 2: Brotes de *Cordia trichotoma*

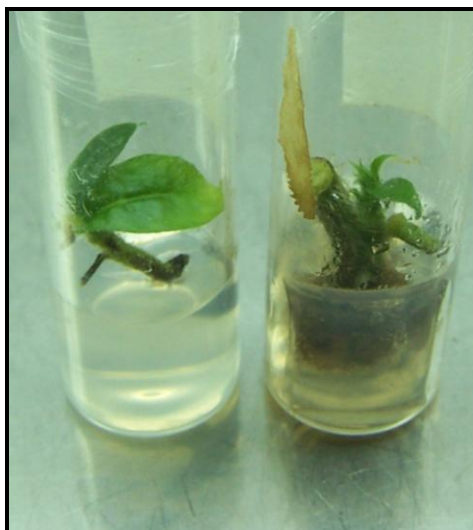


Figura 3: Brotes descontaminados de *Cordia trichotoma*.