



Micropropagación de clones superiores de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de segmentos nodales

Micropropagation of Superior Clones of Mahogany (*Swietenia macrophylla* King) from Nodal Segments

Alejandra Rojas-Vargas^a y Ana Hine-Gómez^b

[Recibido: 13 de diciembre 2018, Aceptado: 21 de marzo 2019, Corregido: 15 de mayo 2019, Publicado: 1 de julio 2019]

Resumen

La caoba es la especie forestal nativa económicamente más importante en Latinoamérica, se encuentra en el Apéndice II de CITES, debido a que registra un elevado índice de explotación, producto de la alta extracción sufrida a lo largo de décadas. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de 2 clones (33 y 80), pertenecientes a un programa de mejoramiento genético forestal. Se lograron establecer segmentos nodales de los clones 83 y 33 en condiciones *in vitro*, al emplear hipoclorito de calcio al 15 % con un tiempo de exposición de 20 minutos. El mejor medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de los nudos fue el MS complementado con 3 % de sacarosa, 0.016 g/l de agrimycin y benlate, obteniéndose un 55 % de nudos establecidos a los 16 días de cultivo. En ambos clones se evaluó el efecto de 5 concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (0.0, 0.44, 0.88, 1.33, 1.77 y 2.21 $\mu\text{M L}^{-1}$) sobre la brotación. Se obtuvo en promedio un brote por explante en los 5 tratamientos evaluados. No se observaron diferencias estadísticas significativas.

Palabras clave: bencilaminopurina; cultivo *in vitro*; especie forestal; nudos; programa mejoramiento genético.

Abstract

Mahogany is the most economically important native forest species in Latin America. It is listed in Appendix II of CITES because it has a high exploitation rate due to decades of high extraction rates. The objective of this research was to develop a protocol for the *in vitro* establishment of two clones (33 and 80), that belong to a forest genetic improvement program. Nodal segments of clones 83 and 33 were established under *in vitro* conditions using 15 % calcium hypochlorite with an exposure time of 20 minutes. The best culture medium for *in vitro* establishment of the nodes was MS supplemented with 3% sucrose, 0.016 g/L of agrimycin and benlate, whose use resulted in establishment in 55% of nodes after 16 days of culture. In both clones, the effect of five concentrations of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) (0.0, 0.44, 0.88, 1.33, 1.77, and 2.21 $\mu\text{M L}^{-1}$) on sprouting was evaluated. On average, one sprout per explant was obtained in the 5 treatments evaluated. No significant statistical differences were observed.

Keywords: Benzylaminopurine; forestry species; genetic improvement program; *in vitro* cultivation; nodal segments.

a Investigadora y docente del Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional (UNA), Costa Rica; alejandra.rojas.vargas@una.ac.cr, <https://orcid.org/0000-0003-4874-2161>

b Investigadora y docente del Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional (UNA), Costa Rica, ana.hine.gomez@una.ac.cr, <https://orcid.org/0000-0002-7226-2275>





1. Introducción

Los bosques son una fuente de recursos fitogenéticos valiosos y a pesar de que se han concretado grandes esfuerzos para conservar el medio ambiente, estos no han sido suficientes. En consecuencia, aún existe una sobreexplotación de especies forestales de alto valor económico y ecológico (Wadsworth, 2000). Lo anterior, ha generado la necesidad de establecer plantaciones forestales, con el objetivo de satisfacer la demanda de madera, aumentar la productividad y estabilidad económica del sistema (Martínez *et al.*, 2003).

La caoba tiene una distribución natural en América Tropical desde la Península de Yucatán en México hasta la región Amazónica de Brasil, Perú y Bolivia. Además, presenta una copa estrecha que mantiene sus hojas durante la mayor parte de la estación seca, lo que la hace adecuada para combinarla con cultivos como el café, el cacao, la vainilla y pastizales arbolados. Tiene un rango de distribución amplio y en Costa Rica se puede cultivar desde el nivel del mar hasta los 1 300 m de elevación, tanto en zonas secas como húmedas (Corea, 2012; Maruyama *et al.*, 1997; Schottz *et al.*, 2007). Es una especie forestal nativa de rápido crecimiento, con alto valor y demanda en el mercado nacional e internacional y tiene aceptación por parte de los consumidores, es la especie forestal nativa económicamente más importante en Latinoamérica (Corea, 2012).

Es una especie maderable de las más valoradas a nivel mundial por su belleza, ductilidad y durabilidad, se usa en la fabricación de muebles de alta calidad, construcción de botes y carpintería entre otros (Maruyama *et al.*, 1997; Schottz *et al.*, 2007).

Swietenia macrophylla se ubica en la categoría de conservación *en peligro crítico* según el estudio del estado de la conservación de plantas en Costa Rica 2005, y se encuentra en el Apéndice II de CITES (CITES, 2017). Lo anterior, se debe a que registra un elevado índice de explotación, producto de la alta extracción sufrida a lo largo de décadas, a causa de su apreciada madera, y por su escasez (Estrada *et al.*, 2005). Actualmente, el valor de su madera en el mercado internacional triplica el de especies como la teca, o el cedro y es diez veces mayor que el de especies como la melina, los eucaliptos y los pinos (Corea, 2012).

El rescate de especies forestales de interés comercial es una de las líneas prioritarias del cultivo de tejidos como herramienta básica para apoyar al mejoramiento de árboles élites. La técnica cultivo de tejidos vegetales tiene entre sus ventajas que contribuye a elevar las tasas de multiplicación, y permite que el material generado se utilice en plantaciones forestales (Acosta *et al.*, 2009). En Caoba se han realizado investigaciones utilizando diferentes técnicas dentro de la micropropagación (Barbon *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2004; Carranza *et al.*, 2013). Sin embargo, en la mayoría de artículos científicos consultados sobre el establecimiento *in vitro* de la especie no utilizaron material vegetativo de clones superiores perteneciente a un programa de mejoramiento genético forestal. Por lo anterior, el objetivo de la investigación fue establecer las bases para la micropropagación *in vitro* de clones superiores de caoba mediante el estudio del efecto de reguladores de crecimiento sobre la brotación de segmentos nodales.





2. Metodología

2.1 Establecimiento *in vitro*

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Forestal del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional (UNA), el material experimental fue donado por el proyecto Mejoramiento genético de Caoba (III fase) Universidad Nacional, INISEFOR.

Los clones utilizados fueron el número 33 y 80, los cuales se mantuvieron en condiciones de invernadero a temperatura promedio 27 °C, 60 % de humedad relativa y tratados semanalmente con una mezcla de 2 g/L de agimicyn/benlate y 50 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (6-BAP). Estos clones se seleccionaron porque presentaron un crecimiento juvenil superior (diámetro y altura), en los primeros dos años de plantados en un ensayo clonal en Guápiles, Limón, Costa Rica.



Figura 1. Material vegetal para el establecimiento *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King. A) planta madre clon 33; B) planta madre clon 80.

El material experimental a introducir en condiciones *in vitro*, consistió de segmentos nodales tomados de brotes axilares de plántulas mantenidas en condiciones de invernadero (**Figura 1**). Para la desinfección del material, se colectaron los segmentos nodales y del invernadero se trasladaron al laboratorio en una solución de 0,5 g/l de cisteína. Posteriormente, se mantuvieron durante 1 hora bajo el flujo de agua constante, seguido se sumergieron en una solución de agua y jabón líquido Antibacterial Bactex (Punto Rojo S.A.) al 1 % por 10 min en agitación y se lavaron con ayuda de un cepillo suave para eliminar los contaminantes adheridos superficialmente, luego se enjuagaron con abundante agua. Finalmente, se evaluaron tres metodologías de desinfección para la introducción *in vitro* (**Cuadro 1**).





Cuadro 1. Tratamientos empleados para el establecimiento de una metodología de desinfección para nudos de *Swietenia macrophylla* King

| Pasos de desinfección | Tratamientos* | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---|---|
| | A | B | C |
| 1. Sumergir en una mezcla en agitación de hipoclorito de calcio 15 % Ca(ClO) ₂ i.a + 0.1 % de tween 80 por 20 minutos. | √ | | |
| 2. Sumergir en una solución de hipoclorito de sodio 3,0 % (NaClO i.a) + 0.1 % de tween 80 por 5 minutos sonicator | | √ | |
| 3. Sumergir en una solución de hipoclorito de sodio 3,0 % (NaClO i.a) + 0.1 % de tween 80 por 5 minutos en bomba al vacío. | | | √ |
| 4. Cuatro lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar de dos minutos. | √ | √ | √ |

* √: paso de desinfección realizado

Los explantes se cultivaron en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) a la mitad de su fuerza iónica, complementado con 3 % de sacarosa, Agrimicin® (0.016 g/l) y Benlate® (0.016 g/l), solidificado con 8 gL⁻¹ de Agar™ (Sigma, St. Louis, MO, USA); el pH del medio se ajustó a 5.7 antes de la esterilización por autoclave (21 °C, 1.1 kg/cm² presión, 25 minutos). El material cultivado se colocó en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 30 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica. La evaluación de la desinfección se realizó cada 5 días durante 30 días. Las variables evaluadas fueron las siguientes: porcentaje de nudos contaminados, porcentaje de explantes necrosados y porcentaje de explantes libres de contaminación. Se utilizó un diseño irrestricto al azar y las posibles diferencias entre las medias en los diferentes tratamientos de desinfección se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey 5 %, utilizando el programa estadístico InfoStat / versión profesional 1.1 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

2.2 Identificación de contaminantes presentes en los cultivos *in vitro* del clon 33 y clon 80

En el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, se analizaron plantas *in vitro* de ambos clones. Los análisis realizados fueron: cultivo en PDA acidificado y PDA sin acidificar para el crecimiento de hongos y bacterias, tinción de gram, anaerobiosis, amarillamiento en YDC y fluorescencia en KB.

2.3 Inducción de brotes a partir en segmentos nodales

Se estudiaron cinco concentraciones de 6-BAP (Sigma, St. Louis, MO, USA): 0, 0.88, 1.33, 1.77 y 2.21 μM L⁻¹. Como unidad experimental se consideró un segmento nodal de 2 cm de longitud cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), complementado con 3 % de sacarosa y solidificado con 8 g.L⁻¹ de





Agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 antes de la esterilización por autoclave (21 °C, 1.1 kg/cm² presión, 25 minutos). Se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento. El material cultivado se colocó en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 30 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica. La evaluación de la brotación se evaluó semanalmente por 30 días, durante 90 días consecutivos, con cambio de medio de cultivo cada 30 días. Se evaluó número de brotes nuevos por explante y en cada uno de los ensayos se utilizó un diseño completamente al azar con 20 nudos por tratamiento y las posibles diferencias entre las medias en los diferentes tratamientos se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey 5 %, utilizando el programa estadístico InfoStat / versión profesional 1.1 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

3. 3. Resultados y discusión

3.1 Establecimiento *in vitro* de clones superiores de caoba

La primera etapa de un protocolo de propagación *in vitro* de una especie vegetal es establecer una desinfección exitosa del explante, que permita el crecimiento y desarrollo de una planta en condiciones de laboratorio libre de patógenos (George, 2008). En esta etapa es muy importante la calidad fitosanitaria de las plantas madres o plantas donantes, que deben estar en condiciones controladas, bajo un buen manejo y aplicación de productos que atenúen el efecto de los microorganismos contaminantes durante la etapa de establecimiento *in vitro*.

En el caso del clon 80 hubo presencia de contaminantes hongo o bacteria (**Cuadro 2**). Por lo general, esta contaminación microbiana se debe a que los explantes provienen de condiciones de invernadero; y aunque las plantas en el invernadero fueron tratadas con fungicida, bactericida y desinfectadas con hipoclorito de calcio y sodio no fue suficiente para eliminar por completo la presencia de contaminantes en el tejido vegetal.

En los tratamientos de desinfección utilizados, se observó diferencia significativa. El mejor tratamiento fue el A, que consistió de hipoclorito de calcio al 15 % Ca(ClO)₂ i.a con 0.1 % de tween 80 por 20 minutos de exposición. Con este tratamiento se obtuvo un 55 % de explantes libres de contaminación (**Figura 2**); mientras que con los tratamientos B y C se obtuvo presencia de algún tipo de contaminante (hongo o bacteria) o material necrosado. Este resultado es similar con lo reportado por Rodríguez *et al.*, (2003), quienes obtuvieron los mejores resultados para el establecimiento *in vitro* de Caoba híbrida, utilizando hipoclorito de calcio con tiempos de 6 exposición de 10 o 15 minutos. Sin embargo, el resultado de la presente investigación es inferior al obtenido por Carranza *et al.*, (2013), quienes lograron cerca de 90 % de explantes libres de contaminación utilizando 15 % de Ca(ClO)₂ por 20 minutos de exposición, pero con la diferencia que dichos autores utilizaron un baño con una solución de gentamicina de 20 mg L⁻¹ por 20 minutos en cámara de flujo laminar vertical, antes de colocarlos en el medio de cultivo para su establecimiento *in vitro*.





Cuadro 2. Efecto del tipo de desinfectante en el establecimiento *in vitro* de explantes del clon 80 de *Swietenia macrophylla* King, luego de 16 días de cultivo

| Tratamientos | Explantos libres de contaminación (% E.E.) | Explantos necrosados (% E.E.) | Explantos contaminados (% E.E.) |
|--------------|--------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| A | 55 ±0.04 c* | 5 ±0.04 c | 40 ±0.04 c |
| B | 0 ±0.00 b | 10 ±0.05 b | 90 ±0.05 b |
| C | 0 ±0.00 a | 0 ±0.00 a | 100 ±0.00 a |

E.E.= Error Estándar; * Si las letras son distintas, es que hay diferencias significativas $p < 0.05$.

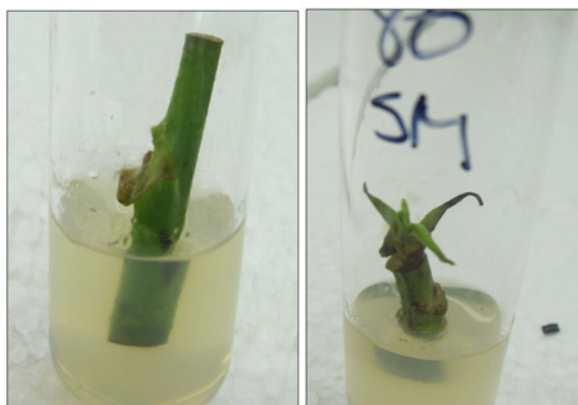


Figura 2. Establecimiento *in vitro* del clon 80 de caoba (*Swietenia macrophylla* King) después de 16 días en un medio de cultivo MS (1962) (Tratamiento A).

Al analizar el clon 33, se presentó el mismo resultado que en el clon 80 (**Cuadro 3**), el mayor número de explantes libres de contaminación se logró al utilizar al utilizar el hipoclorito de calcio. No obstante, da Costa Nunes *et al.*, (2003), Mona (2012) y Soto *et al.*, (2010) lograron establecer en condiciones *in vitro* explantes de *Swietenia macrophylla* y *Cedrela salvadorensis* (Meliaceae) respectivamente, utilizando hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones; pero el explante utilizado fue semilla o segmentos de hojas. Dichos explantes presentan, características fisiológicas y genéticas diferentes a la de un segmento nodal.

George *et al.*, (2008), recalcan que la condición fisiológica de la planta madre o donadora de los explantes para el establecimiento *in vitro*, tiene una influencia directa en el posterior comportamiento del cultivo. Esta explicación podría influir en la respuesta de cada clon, ya que el mayor número de explantes libres de contaminación se obtuvo con el mismo tratamiento (A). Por lo que, se podría atribuir a que las plantas madres provenían de un proceso de homogeneidad en las condiciones fitosanitarias. Además, no se presentó diferencia estadística significativa en los clones al utilizar la concentración de hipoclorito de calcio al 15 % adicionado de 0.1 % de





Cuadro 3. Efecto del tipo de desinfectante en el establecimiento *in vitro* de explantes del clon 33 de *Swietenia macrophylla* King, luego de 16 días de cultivo

| Tratamientos | Explantos libres de contaminación (% E.E.) | Explantos necrosados (% E.E.) | Explantos contaminados (% E.E.) |
|--------------|--------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| A | 30 ± 0.03 b | 0 ± 0.03 b | 70 ± 0.03 b |
| B | 0 ± 0.00 a | 15 ± 0.04 a | 85 ± 0.04 a |
| C | 0 ± 0.00 a | 0 ± 0.00 a | 100 ± 0.00 a |

E.E.= Error Estándar; * Si las letras son distintas, es que hay diferencias significativas $p < 0.05$.

tween 80 con un tiempo de exposición de 20 minutos. La misma permitió el establecimiento *in vitro* de ambos clones. (**Figura 2 y 3**), donde se puede observar el desarrollo de los meristemas laterales y apical que permitirán el crecimiento de una planta. Por lo que, se podría recomendar como guía para la introducción *in vitro* de rebrotes de otras especies forestales del trópico pertenecientes a un programa de mejoramiento genético forestal; cuando las plantas madres provienen de un jardín clon y se encuentran sembradas en tierra como sustrato.

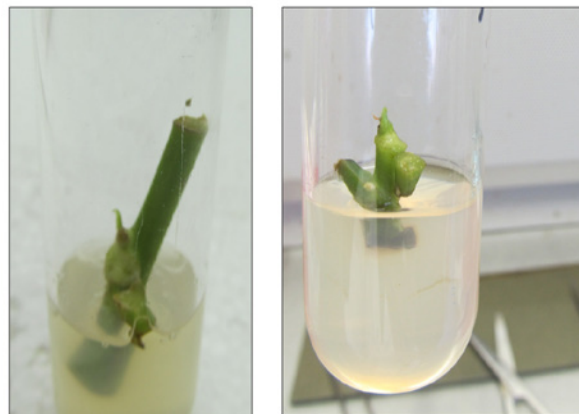


Figura 3. Establecimiento *in vitro* del clon 33 de caoba (*Swietenia macrophylla* King) después de 16 días en un medio de cultivo MS (1962). (Tratamiento A).

Por otra parte, la identificación de contaminantes en la etapa de establecimiento es esencial para reducir el porcentaje de contaminación, así como para conocer métodos como la aplicación de productos que se podrían aplicar a las plantas madres para contribuir al éxito del establecimiento *in vitro*. Los resultados de los análisis de fitopatología detectaron en el clon 80 la presencia de colonias del hongo *Penicillium* sp, de la bacteria *Pseudomonas* sp, así como colonias de levadura. Por su parte, en plantas *in vitro* del clon 33 se detectó la presencia de tres





colonias de la bacteria *Pseudomonas* sp que se sugiere podría ser endofítica o estar latente en el tejido vegetal. Acosta 2009 y Alvarado 1998, explican que, por lo general, en el proceso de cultivo *in vitro*, la contaminación interna de los explantes, constituye uno de los problemas fundamentales para su establecimiento y posterior multiplicación. Lo anterior, se puede deber a que los microorganismos asociados a los tejidos de las plantas *in vivo* tienen la capacidad permanecer latentes en el interior de las células, los espacios intercelulares o los haces conductores y quedar protegidos de los agentes químicos utilizados en el proceso de desinfección, resultado que se presentó en los tratamientos B y C. Además, estos microorganismos no son deseados en el cultivo *in vitro* ya que podrían interferir en la fisiología y morfología normal de la planta, afectando el protocolo de reproducción del cultivo (Vásquez *et al.*, 2014).

3.2 Inducción de brotes en segmentos nodales

De acuerdo con el Cuadro 4 el mayor número promedio de brotes por segmento nodal fue de 1.0. En el clon 80 en todas las concentraciones se presentó brotación del segmento nodal. Sin embargo, los explantes respondieron igual a la inducción de brotes en el medio de cultivo que no tenía adición de citoquininas; pero la diferencia se presentó en el crecimiento de los brotes. En la concentración de 0,88 $\mu\text{M L}^{-1}$ se observó un mayor desarrollo del brote y hojas (Figura 4b).

Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP sobre la inducción de brotes en nudos de clon 80 y 33 de *Swietenia macrophylla* establecidos en condiciones *in vitro*, luego de 90 días de cultivo

| Tratamientos 6-BAP $\mu\text{M L}^{-1}$ | Porcentaje explantes brotados | | No brote/explante | |
|--------------------------------------------|----------------------------------|---------|-------------------|---------|
| | Clon 80 | Clon 33 | Clon 80 | Clon 33 |
| 0.00 | 30 | 0 | 1 | 0 |
| 0.44 | 25 | 15 | 1 | 1 |
| 0.88 | 30 | 50 | 1 | 1 |
| 1.33 | 20 | 40 | 1 | 1 |
| 1.77 | 5 | 0 | 1 | 0 |
| 2.21 | 15 | 0 | 1 | 0 |

En el caso del clon 33 en las concentraciones de 1.77 $\mu\text{M L}^{-1}$ y 2.21 $\mu\text{M L}^{-1}$ de 6-BAP, al igual que en el tratamiento testigo no se presentó brotación en el segmento nodal. En la concentración de 0.44 $\mu\text{M L}^{-1}$ se observó el mejor desarrollo del brote (Figura 4a).



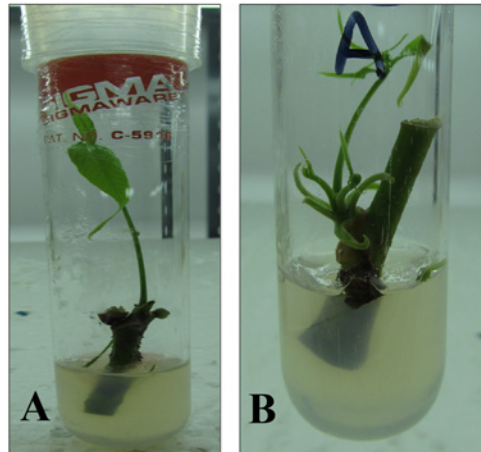


Figura 4. Brote de caoba (*Swieteniamacrophylla* King) inducido con $0.88 \mu\text{M L}^{-1}$ de 6-BAP. A) Clon 80; B) Clon 33.

George *et al.*, (2008) han empleado en el establecimiento de especies leñosas, diferentes tipos de citoquininas. Las citoquininas son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemos y en la punta de las raíces y se traslocan muy poco o casi nada en la planta (Taiz y Zieger, 2006). Por lo general, la citoquinina más utilizada es el 6-BAP, se aplica en bajas concentraciones y estimula las yemas apicales y terminales en la etapa de micropropagación. Además, promueve no sólo la división celular sino también la brotación y elongación de las yemas (Collado *et al.*, 2004).

Investigaciones realizadas en Meliaceae como *Cedrela salvadorensis* utilizaron el (6-BAP) para la brotación de segmentos nodales, obteniendo diferencia significativa entre las concentraciones utilizadas (Soto *et al.*, 2010). Además, algunos autores utilizan una relación auxina/citoquininas para promover el crecimiento y la morfogénesis *in vitro*, cuando la relación en el medio de cultivo es baja se favorece la formación de tallos, pero en caso contrario favorece el enraizamiento (Buchanan *et al.*, 2000, Persinova *et al.*, 2008).

Carranza *et al.*, (2013) y Mona (2012) utilizaron el 6-BAP solo o combinado con 2ip para la etapa de multiplicación de segmento nodales de Caoba. Mona (2012), obtuvo el mejor coeficiente de multiplicación en los medios que contenían ambos reguladores de crecimiento, pero los brotes presentaron hiperhidricidad. El autor recalca, que a pesar de tener mayor número de brotes en los tratamientos con ambos reguladores del crecimiento la calidad del brote es mejor cuando se utiliza el 6-BAP; resultado que coincide con el obtenido en la presente investigación. Lo anterior, se podría deber a que algunos autores consideran que la citoquinina 6-BAP tiene mayor respuesta comparada con otras hormonas como la kinetina, TDZ y 2-isopenteniladenina (2iP), ya que promueve la formación de un mayor número de brotes y son de mayor longitud, lo que se traduce en un mayor coeficiente de multiplicación (Arab *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2002).





Además, el 6-BAP es metabolizado por los tejidos mucho más fácil que el resto de los reguladores sintéticos y es capaz de inducir la producción de otras hormonas naturales como la Zeatina (Malik *et al.*, 2005).

Por otra parte, Rodríguez *et al.*, (2003) obtuvo mayor brotación en concentraciones superiores de 1 mg/L de 6-BAP, pero la elongación del brote no fue el mejor. Por lo tanto, concluye que en entre 0.50 mg/L y 1 mg/L de 6-BAP se complementan los valores óptimos de multiplicación sin tener una incidencia directa en la elongación; resultado que coincide al obtenido en la presente investigación. Por lo anterior, se podría sugerir que, en caoba, utilizando este tipo de explante el efecto de las citoquininas solas o en combinación, no logran más de 0.33-0.10 % de brotación.

Al evaluar la respuesta al comportamiento de morfogénesis *in vitro* que se presentó en el porcentaje de explantes brotados y la inducción de nuevos brotes en ambos clones. La diferencia se podría atribuir a los factores que argumentan los autores Azofeifa *et al.*, (2009), quienes mencionan que los requerimientos de citoquinina en las plantas *in vitro* son extremadamente variables y las respuestas a la inducción de brotes dependen del contenido endógeno de cada especie y del estado fisiológico y tipo de explante utilizado. El explante utilizado en la presente investigación fue el mismo, por lo que presentó características fisiológicas similares. Sin embargo, entre individuos de la misma se podría presentar una variación debida al genotipo. En esta investigación eran dos genotipos que podrían tener contenidos endógenos de citoquininas diferentes y por ende la brotación no debería ser la misma.

Barbón *et al.* (2006) explican que caoba es difícil de propagar mediante el cultivo de tejidos y hasta la fecha no existe un sistema de regeneración de plantas vía organogénesis repetible para esta especie, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana, oxidación fenólica y muerte de tejidos en la fase de establecimiento de los explantes *in vitro*. Por tanto, los presentes resultados son válidos debido a que utilizó clones de la especie que pertenecen a un programa de mejoramiento genético y se logró establecer una metodología de desinfección, un medio de cultivo y un tratamiento de multiplicación de segmentos nodales.

4. Conclusiones

Los resultados logrados para los clones de *Swietenia macrophylla* evidencian el comportamiento recalcitrante de estas especies en condiciones *in vitro* y la necesidad de realizar más estudios que permitan el establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* eficiente para esta especie. Sin embargo, su establecimiento en condiciones *in vitro* fue posible al utilizar hipoclorito de calcio para el establecimiento de segmentos nodales, y el uso de 6-BAP para inducir la formación de nuevos brotes *in vitro*. Es recomendable estudiar otras metodologías de multiplicación que permita la propagación del material ya establecido.





5. Agradecimientos

Al señor Eugenio Corea, encargado del proyecto “Mejoramiento genético de Caoba. (III fase)” del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional, por facilitar el material experimental utilizado en esta investigación. A la Revista y a las personas revisoras anónimas por los valiosos aportes al escrito.

6. Referencias

- Acosta, M., Alvarado, Y., Cruz, M., Leiva, M., Sánchez, C., Berkis, G., Quiala, E., Chávez, M., Jiménez, F., La O M, Barbón, R., Collado, R., Rodríguez, M., De Feria, M., Borroto, I. y Pérez, M. (2009). Micobiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales. *Biotecnología Vegetal*, 9 (2), 99-103.
- Alvarado, Y. (1998). *Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas*. In Pérez, J. Ed. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba: Instituto de Biotecnología de Plantas. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-0404-6>
- Arab, M; Yadollahi, A; Shojaeiyan, A; Shokri, S; Ghoghah, S. Effectsof nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G X N15 (hybrid of almond peach) vegetative rootstock. (2014). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12:81-87. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.10.001>
- Azofeifa, J., Rojas, A., y Hine, A. (2009). Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliaceae). *Tecnología en Marcha*, 22 (3), 34-41.
- Barbón, R., Agramonte, D., Collado, R., Terry, F., Quiala, E., y Odalys, M. (2006). Taller Leñosas. Avances en el cultivo *in vitro* de especies leñosas y foresatles en el Instituto de Biotecnología de Plantas. *Biotecnología Vegetal*, 6 (2), 103-117.
- Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Estados Unidos. Editorial Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists.
- Carranza, M., Reyees, H., Mora, W., Cevallos, O., Escobar, A., Cadme, M., Nieto, J. y Morante, J. (2013). Propagación *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba). *Ciencias y Tecnología*, 6(2), 1-8. <https://doi.org/10.18779/cyt.v6i2.177>
- 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. *Biotecnología Vegetal*, 4(3), 143-146.
- Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. (2017). Apéndices I, II y III. Recuperado de <https://cites.org/sites/default/files/esp/app/2017/S-Appendices-2017-10-04.pdf>.





- Corea, E. (2012). Proyecto Mejoramiento genético de Caoba. (III fase). Costa Rica: Universidad Nacional.
- da Costa Nunes, E., Benson, E., Oltramari, A., Araujo, S., Moser, M., y Vaina, M. (2003). In vitro conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 12, 837–848. <https://doi.org/10.1023/a:1022492226341>
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. (2011). InfoStat versión 2011. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado de: <http://www.infostat.com.ar>.
- Estrada, A., Rodríguez, A., Sánchez, y J. (2005). Evaluación y categorización del estado de la conservación de plantas en Costa Rica. Recuperado de http://documentación.sire.for.go.cr/archivo/CBN/categorización/categorizacion_especies.pdf
- George, E. (2008). *Plant Tissue Culture Procedure-Background*. In George, E; Hall, M; Jan de Klerk, G. eds. *Plant Propagation by tissue culture*. 3 ed. Holanda: Editorial Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1
- Malik S. K., R. Chaundhury and R. K. Kalia. (2005). Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae*, 106:539-553.
- Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V., Gutiérrez, M. (2003). Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 49(1), 17-34. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.crossmark-policy>
- Maruyama, E., Ishii, K., Kinoshita, I., Ohba, K., y Saito, A. (1997) Micropropagation of *Guazuma crinita* Mart. by root and petiole culture. *In vitro Cellular Developmental. Biology Plant*, 33,131-135. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0011-0>
- Mona, A. (2012). *In Vitro Propagation of Swietenia macrophylla* King. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 8(2), 282-287. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.002>
- Murashige, T., Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum*, 15, 473-497.
- Pérez, E: Dávila, C. (2002). In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38, 73-78. <https://doi.org/10.1079/ivp2001248>
- Pernisova, M., Klima, P., Horak, J., Valkova, M., Malbeck, J., Soucek, P., Reichman, P., Hoyerova, K., Dubova, J., Friml, J., Zazimalova, E., Hejatkoa, J. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc Natl Acad Sci*, 106: 3609–3614. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811539106>





- Rodríguez, R., Daquinta, M., Capote, I., Pina, D., Lezcano, Y., y González, L. (2003). Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* X *Swietenia mahogany* (CAO-BA HÍBRIDA) y *Cedrela odorata* (CEDRO). *Cultivos Tropicales*, 24 (3), 23-27. <https://doi.org/10.24841/fa.v22i1-2.45>
- Schottz, E., Filho, A., Tracz, A., Luciana, L., Ribas, F., y Quoirin, M. (2007). In vitro multiplicación de *Swietenia macrophylla* KING (MELIACEAE) from juvenile shoots. *Ciência Florestal*, 17 (2), 109-117. <https://doi.org/10.5902/198050981942>
- Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.002>
- Soto, B., Valverde, L., Rojas, A., y Hine, A. (2010). Establecimiento in vitro de *Cedrela salvadorensis* Standl. *Tecnología en Marcha*, 23 (4), 66-73.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 4ta ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Vázquez, S., Larrañaga, N., Uberhuaga, E., Braga, E. y Ruíz, C. (2014). Bacterial contamination of in vitro plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. *Plant Cell Organ Culture*, 119, 533-541. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0553-x>
- Wadsworth, F. (2000). *Producción forestal para América Tropical*. Estados Unidos: USDA.

