

Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de “caoba” *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae)

Joseph Campos Ruiz^{1*}, Marcela Arteaga Cuba¹, Sanderson Campos Ruiz¹, Julio Chico Ruíz², Lisi Cerna Rebaza³

¹ Universidad Nacional de Cajamarca, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Agrarias, Cajamarca, Perú.

² Universidad Nacional de Trujillo, Laboratorio de Cultivos Celulares Facultad de Ciencias Biológicas, Trujillo Perú.

³ American School. Laboratorio de Biología, Trujillo, Perú.

* Autor para correspondencia: josephcamposruiz@gmail.com

Información de financiamiento

Este estudio fue financiado por los propios autores.

Declaración de disponibilidad de datos

Toda la data relevante a la investigación se muestra dentro del mismo manuscrito.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno.

Contribución de los autores

C. R.: Trabajo de laboratorio y análisis de datos; M. A. C.: Mediciones, análisis estadístico y elaboración de tablas y figuras; S. C. R.: Trabajo de laboratorio y análisis de datos; J. C. R.: Redacción del manuscrito y revisión final; L. C. R.: Mediciones, análisis estadístico y elaboración de tablas y figuras.

Recibido: 6 de Enero de 2020.

Aceptado: 21 de Febrero de 2020.

Publicado (digital): 30 Marzo 2020.

Publicado (impreso): 30 Abril 2020.

Cita bibliográfica:

Campos, J.; M. Arteaga; S. Campos; J. Chico & L. Cerna. 2020. Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de “caoba” *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa* 27(1): e86-e94. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>

Resumen: *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) es una especie forestal maderable muy apreciada por sus características de dureza, resistencia y calidad, pero la deforestación y la extracción de la madera han reducido su abundancia y pelagra su supervivencia. El cultivo *in vitro* se muestra como una alternativa para obtener masivamente plantas a corto plazo y de alta calidad. Por ese motivo el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro *S. macrophylla* King “caoba”. Se inició la experiencia con la desinfección de los segmentos nodales en concentraciones del 3% para Ca(ClO)₂ y NaClO durante 10, 15 y 20 minutos por cada tratamiento. Los explantes sobrevivientes fueron transferidos a los medios de cultivo base como MS, WPM e hidropónico LM para su crecimiento. Posteriormente éstos fueron expuestos a distintos niveles de BAP (0.1, 0.5 y 1 mg/l) y ANA (0.1 y 0.5 mg/l) para su multiplicación. Los mejores brotes se introdujeron en WPM a diferentes concentraciones de BAP (0.5 y 1 mg/l) y ANA (1 y 2 mg/l) para facilitar su enraizamiento. Los resultados muestran que los segmentos nodales tratados con NaClO al 3% durante 15 minutos presentaron un mayor porcentaje de sobrevivientes (87%). En la etapa de crecimiento el mejor medio de cultivo fue el WPM permitiendo longitudes de brote en promedio de 7,20 mm. Para la etapa de multiplicación la concentración de 1 mg/l de BAP indujo longitudes de brote en promedio de 8 mm y en la fase de enraizamiento fue el tratamiento que contenía 1 mg/l de ANA en el que se obtuvo el mayor número de raíces a los 50 días. Se concluye que los protocolos seleccionados permiten la micropropagación in vitro de la caoba.

Palabras clave: *Swietenia macrophylla*, reguladores de crecimiento, cultivos *in vitro*.

Abstract: Establishment of an in vitro de caoba, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), disinfection and micropropagation protocol.

Swietenia macrophylla King (Meliaceae) It is a timber forest species highly prized for its hardness, strength and quality characteristics, but deforestation and timber extraction have reduced its abundance and endangers its survival. In vitro culture is shown as an alternative to massively obtain short-term and high-quality plants. For this reason, the objective of this work was to establish in vitro disinfection and micropropagation protocols *S. macrophylla* King “caoba”. The experience began with the disinfection of the nodal segments in concentrations of 3% for Ca (ClO)₂ and NaClO for 10, 15 and 20 minutes for each treatment. The surviving explants were transferred to the base culture media such as MS, WPM and hydroponic LM for growth. These were subsequently exposed to different levels of BAP (0.1, 0.5 and 1 mg / l) and ANA (0.1 and 0.5 mg / l) for multiplication. The best outbreaks were introduced in WPM at different concentrations of BAP (0.5 and 1 mg / l) and ANA (1 and 2 mg / l) to facilitate rooting. The results show that the nodal segments treated with 3% NaClO for 15 minutes had a higher percentage of survivors (87%). In the growth stage the best culture medium was the WPM allowing sprout lengths on average of 7.20 mm. For the multiplication stage the concentration of 1 mg / l of BAP induced bud lengths on average of 8 mm and in the rooting, phase was the treatment containing 1 mg / l of ANA in which the greatest number of roots was obtained at 50 days. It is concluded that the protocols used allow the in vitro micropropagation of caoba.

Keywords: *Swietenia macrophylla*, growth regulators, in vitro cultures.

INTRODUCCIÓN

Swietenia macrophylla King (Meliaceae) "caoba" es un árbol maderero de los bosques neo-tropicales, se extiende desde el sur de México hasta la cuenca meridional amazónica de Bolivia, Brasil y Perú (Barrena & Vargas, 2004). Es considerada una de las especies maderables más valiosas del mundo, por ello su demanda crece y sobrepasa la oferta disponible aumentando la presión sobre esta especie, lo que ocasiona una disminución de las poblaciones naturales y su extinción comercial a lo largo de su área de distribución (Reynel *et al.*, 2003).

Las poblaciones naturales de caoba se encuentran fraccionadas y aisladas, lo cual está produciendo una pérdida en la calidad genética de la especie (Campos *et al.*, 2009). Un factor limitante es la baja germinación (10 al 70%) lo cual reduce su propagación sexual (Quinto *et al.*, 2009), además de ensayos insuficientes de selección basados en características fenotípicas y genotípicas, resultan en plantaciones de alta heterogeneidad (Prado *et al.*, 2012). Con este panorama diversas instituciones vienen promoviendo su reforestación y establecimiento de plantaciones a partir de su propagación vegetativa, pero en un área de dispersión reducida (Daquinta *et al.*, 2004), lo cual no soluciona el mantenimiento de su homogeneidad.

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* en los programas de reforestación es una posibilidad que aliviaría la presión de deforestación porque a partir de segmentos nodales, se incrementaría de forma rápida el número de individuos, y de material vegetal genéticamente estable (Delgado *et al.*, 2008; Gutiérrez & Oliva, 2003; Uribe *et al.*, 2008). Además, el uso de auxinas, en esta técnica, ayuda a la diferenciación de las raíces; y las citoquininas estimulan la división y diferenciación celular, el crecimiento de las yemas laterales, el control de la biogénesis y función de los cloroplastos (Taiz & Zeiger, 2002; Yaronskaya *et al.*, 2006), la expansión de los cotiledones, así como la inducción de la formación de brotes en cultivos vegetales (Ascón -Bieto & Talón, 2013; Martínez, 2002).

Las experiencias, en el país, sobre la micropropagación de caoba está limitada a las tesis de Gómez (2008) que utilizó diferentes concentraciones de BAP, ANA y AIA sin encontrar diferencias en la longitud del brote, número de nudos y número de hojas y el trabajo de Valdivia (2010) demostró que 0,5 mg. L⁻¹ de BAP induce 3,3% de explantes brotados. Sobre las experiencias internacionales tenemos el de Carranza *et al.* (2013) quienes controlaron la contaminación por microorganismos con 15 g de Ca(ClO)₂. Y obtuvieron el 70% de brotes con 2 mg. L⁻¹ de BAP en combinación con 1 mg. L⁻¹ de AIB, no obtuvo enraizamiento cuando utilizó ANA. Según Rodríguez *et al.* (2003), trabajando con caoba y cedro, al utilizar 6-Bencilaminopurina a 0,50 mg. L⁻¹ se obtiene mayor calidad de los explantes y buenos niveles de multiplicación en ambas especies. Además, reportan que con el ácido indolbutírico a 0,50 mg. L⁻¹ el enraizamiento logró resultados muy favorables, también Collado *et al.* (2004) lograron el establecimiento de vástagos vigorosos de caoba con una concentración de 0,2 mg. L⁻¹ 6-BAP, en cambio Rojas-Vargas & Hine-Gómez (2019) no encontrando diferencias significativas en la inducción de brotes cuando utilizaron cinco concentraciones diferentes de BAP. Para Bacusoy & Masías (2019), en la fase de multiplicación, la mejor respuesta fue con en medio WPM con

3,33 brotes, un diámetro del tallo de 0,27 cm y una altura de planta de 1,52 cm, sin embargo, en la fase de enraizamiento la mejor respuesta se obtuvo con 2mg de AIB sin carbón activado.

Con lo expuesto el estudio se justifica para desarrollar el uso del cultivo *in vitro* en su micropropagación y así producir grandes volúmenes de plantas a corto plazo lo cual posteriormente nos permitirá suministrar semilla vegetativa de alta calidad genética en el establecimiento de plantaciones comerciales y posteriormente ser reintroducidas a los hábitats en los que ha desaparecido completamente, por eso el objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de desinfección y de micropropagación *in vitro* de "caoba", *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) y teniendo como objetivos específicos el de evaluar las concentraciones de hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio en relación con el tiempo para la desinfección de explante y posteriormente evaluar las concentraciones de ácido naftaleno acético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) para las fases de multiplicación y enraizamiento del explante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la solución stock de MS (Murashige & Skoog, 1962) a la cual se le añadió agar (8 g/L), sacarosa (30 g/L) y reguladores de crecimiento de acuerdo a los diferentes tratamientos propuestos. Finalmente se midió el pH el cual fue ajustado a 5,7 con HCl o KOH al 0,1 N; luego los medios de cultivo fueron distribuidos en volúmenes de 40 ml a magentas, seguidamente se procedió a su esterilización en autoclave a 121 °C y una presión de 1,3 Kg/cm², durante 20 minutos, manteniéndose luego en un lugar estéril hasta su posterior uso.

Se utilizaron plantones de dos meses de edad obtenidos de semillas botánicas de caoba recolectadas de árboles ubicados en el Jardín Botánico de la Ciudad de Jaén. Las semillas también procedieron del mismo lugar.

Los segmentos nodales de 3 cm de longitud, que se obtuvieron de los plantones, fueron desinfectados con agua destilada estéril, alcohol etílico al 96% por 3 minutos, hipoclorito de calcio (Ca (ClO)₂) e hipoclorito de sodio (NaClO), ambos al 3% más tres gotas de tween 80 durante 10, 15 y 20 minutos, según los tratamientos (Tabla 1), y luego repicados en tubos de ensayos y magentas que contenían MS/2, llevándose luego estos al cuarto de incubación.

Las semillas se lavaron con agua destilada estéril, alcohol etílico al 96% por 30 segundos, luego se enjuagó con agua destilada estéril y se colocaron en soluciones de hipoclorito de sodio al 1,5 % más 3 gotas de tween 80 durante 20 minutos en constante agitación. Posteriormente se liberaron de la testa y fueron nuevamente sometidas a alcohol etílico al 70% por 30 segundos, hipoclorito de sodio al 0,5% más 3 gotas de tween 80 durante 10 y 20 minutos (Tabla 2). Las semillas fueron introducidas en MS/2, llevándose luego estos al cuarto de cultivo para su incubación y posterior germinación. Transcurrido 45 días, las plántulas más vigorosas producto de la germinación *in vitro* fueron utilizadas como donadores de explantes.

La evaluación para los explantes obtenidos del vivero se

realizó después de 15 días de sembrado y aquí se tuvo en cuenta el porcentaje de contaminación, número de explantes quemados (necrosis) y porcentajes de explantes vivos. En relación a las semillas las variables evaluadas fueron el porcentaje de contaminación y porcentaje de germinación.

Tabla 1. Tratamientos para la fase de desinfección de los explantes de *S. macrophylla* King. provenientes de plantas de vivero.

Trat.	Desinfectante	Exposición (min)	Nº de Explantes
T1	Hipoclorito de sodio al 3% + 3 gotas de tween 80	10	15
T2	Hipoclorito de calcio al 3% + 3 gotas de tween 80	10	15
T3	Hipoclorito de sodio al 3% + 3 gotas de tween 80	15	15
T4	Hipoclorito de sodio al 3% + 3 gotas de tween 80	15	15
T5	Hipoclorito de calcio al 3% + 3 gotas de tween 80	20	15
T6	Hipoclorito de calcio al 3 % + 3 gotas de tween 80	20	15

Tabla 2. Tratamientos para la fase de desinfección de las semillas de *S. macrophylla* King

Trat.	Desinfectante	Nº Semillas
T1	Alcohol 70 % (30 segundos), NaClO 0.5 % (10 minutos)	40
T2	Alcohol 70 % (30 segundos), NaClO 0.5% (20 minutos)	40

Para la fase de crecimiento se utilizaron explantes provenientes del tratamiento de la fase de desinfección, y también se trabajó con los provenientes de las semillas germinadas *in vitro*. Se repicaron a magentas y tubos de ensayo conteniendo los medios de cultivo en estudio (Tabla 3). Las variables evaluadas fueron el número de hojas por explante, longitud del brote en milímetros y el número de brotes por explante. Estas evaluaciones se realizaron cada 15 días durante mes y medio.

Tabla 3. Tratamientos para la fase de crecimiento de los explantes de *S. macrophylla* King

Trat.	Medios De Cultivo*	Nº De Explantes
T1	Solución hidropónica la Molina (HLM)	15
T2	Murashige y Skoog (1962) (MS)	15
T3	Woody Plant Medium (WPM)	15

*Se utilizaron las fórmulas completas de los medios de cultivo.

Para la fase de multiplicación, las yemas axilares obtenidas de la fase de crecimiento, fueron cortadas en segmentos de 1 a 1,5 cm de longitud con una yema axilar y luego introducidas en los tratamientos respectivos (Tabla 4). Las variables evaluadas fueron el número de hojas por explante, longitud del brote en milímetros y el número de brotes por explante. La evaluación se realizó cada 15 días después de haber colocado los explantes en los medios de cultivo durante un periodo de 50 días.

Tabla 4. Tratamientos ensayados en la fase de multiplicación para las yemas axilares de *S. macrophylla* King

Trat.	Medios de Cultivo (WPM)		Nº de Explantes
	BAP (mg/l)	ANA (mg/l)	
T1	0.1	0	10
T2	0.5	0	10
T3	0.5	0.1	10
T4	1	0	10
T5	1	0.1	10
T6	1	0.5	10
T7	0	0	10

La fase de enraizamiento se inició cuando los brotes producidos en la fase anterior alcanzaron 1,5 cm de longitud en promedio, los cuales fueron aislados y repicados en magentas y tubos de ensayos conteniendo los medios de cultivo según los tratamientos de la Tabla 5; Las variables evaluadas fueron el número de raíces por explante y la longitud de raíz principal (mm). La evaluación se realizó a los 50 días después de la siembra.

Tabla 5. Tratamientos ensayados en la fase de enraizamiento para los explantes de *S. macrophylla* King

Trat.	Medios de Cultivo (WPM)		Nº de Explantes
	BAP (mg/l)	ANA (mg/l)	
T1	0.5	1	10
T2	0	1	10
T3	0.5	2	10
T4	1	2	10
T5	0	2	10

Para el presente trabajo se aplicó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial, considerando un explante por repetición para todos los tratamientos de cada una de las fases de la micropropagación. Los datos de cada una de las variables se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 5%. Para ello se usó el programa estadístico SPSS Statics 25.

RESULTADOS

Desinfección de los explantes:

Según se observa en la Tabla 6, los desinfectantes utilizados no permiten la contaminación de las semillas (0 %), pero también se observa que a mayor tiempo de exposición a NaOCl 0,5% por veinte minutos, disminuye el porcentaje de germinación. Los segmentos nodales introducidos, previos

tratamientos de desinfección, muestran contaminación cero para T5 y T6, pero al mismo tiempo presentan elevada necrosis lo cual se manifiesta en menos del 53,33 % de explantes vivos, según se observa en la Tabla 7. El mejor tratamiento fue T3 con 86,67% de explantes vivos.

Tabla 6. Porcentajes de germinación de las semillas de *S. macrophylla*, después de los tratamientos de desinfección.

Tratamientos	Contaminación (%)	Germinación (%)
T1: Alcohol 70% (30 segundos) + NaClO 0.5% (10 minutos)	0	87.5
T2: Alcohol 70% (30 segundos) + NaClO 0.5% (20 minutos)	0	85.0

Tabla 7. Diferentes tratamientos de desinfección y su efecto en el establecimiento *in vitro* de explantes de caoba (*S. macrophylla* King) provenientes de plantas de vivero.

Tratamientos		Contaminación (%)		Explantes necrosados (%)	Explantes vivos (%)
Tiempo	Desinfectante (3 %)	Bacterias	Hongos		
10 minutos	T1: NaClO	13.33	60.00	0.00	26.67
	T2: Ca(ClO) ₂	20.00	66.67	0.00	13.33
15 minutos	T3: NaClO	13.33	0.00	0.00	86.67
	T4: Ca(ClO) ₂	20.00	13.33	0.00	66.67
20 minutos	T5: NaClO	6.67	0.00	40.00	53.33
	T6: Ca(ClO) ₂	0.00	0.00	53.33	46.67

Fase de crecimiento:

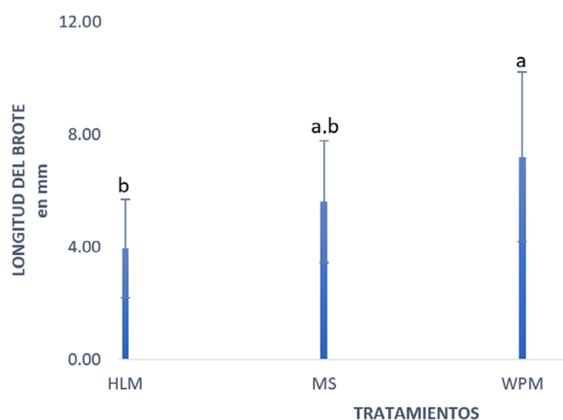


Figura 1. Longitud del brote de *S. macrophylla* King según tratamientos. El medio WPM permitió obtener una longitud promedio de 7.20 mm respecto a los medios MS y HLM. Existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, puesto que el valor de significancia es menor al 0.05 según ANAVA.

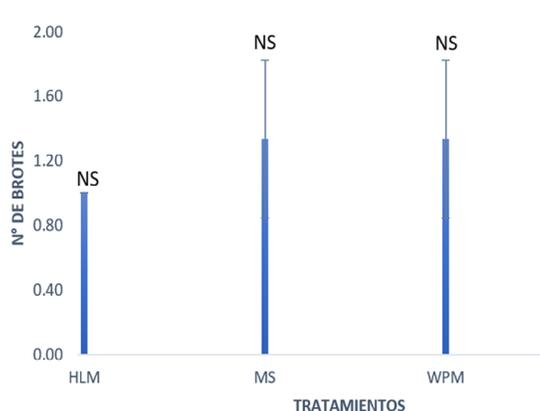


Figura 2. Número de brotes por explante de *S. macrophylla* King según tratamientos. Se aprecia el consolidado de los tratamientos con sus respectivos promedios en donde no existe diferencias significativas entre los tratamientos. La figura nos muestra que todos los medios de cultivo empleados en el experimento como el WPM, MS y HLM proporcionan el mismo número de brotes.

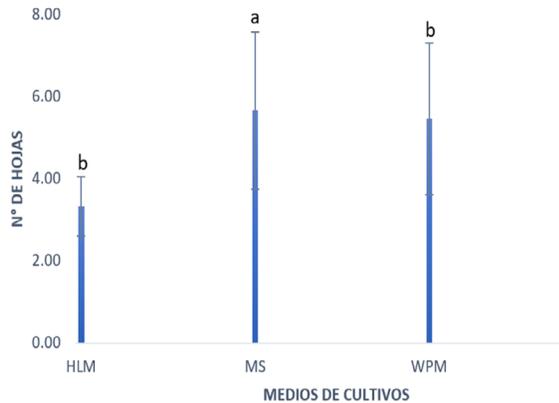


Figura 3. Número de hojas por explante de *S. macrophylla* King según tratamientos. Se aprecia el consolidado de los tratamientos con sus respectivos promedios en donde si existe diferencias significativas dado que el valor de significancia es menor al 0.05 según ANAVA. La figura muestra que los medios de cultivo MS y WPM utilizados en el experimento permitieron desarrollar mayor número de hojas; pero los explantes expuestos al medio WPM mostraron hojas de un tamaño fenotípicamente grandes durante el experimento.

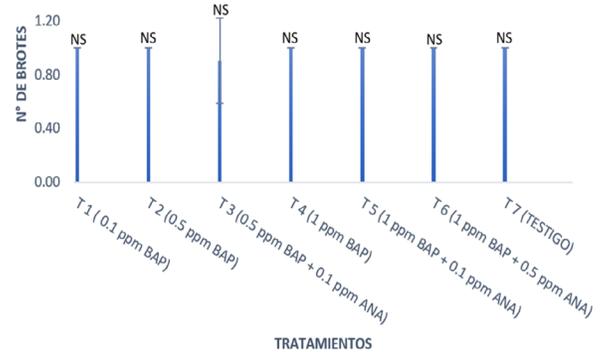


Figura 5. Número de brotes por explante de *S. macrophylla* King según tratamientos en etapa de multiplicación. La figura muestra que no hay diferencias estadísticas significativas entre los promedios. Esto se debe porque cada explante en los distintos tratamientos permitió originar números de brotes proporcionales.

Fase de multiplicación:

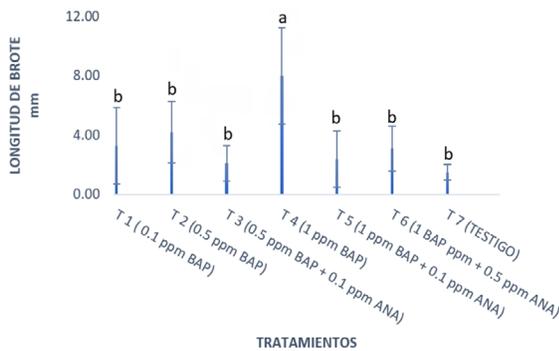


Figura 4. Longitud del brote de *S. macrophylla* King según tratamiento. Se aprecia el consolidado de los tratamientos con sus respectivos promedios. El tratamiento T4 que contenía 1 ppm de BAP permitió un mayor crecimiento en longitud del brote, mientras que el promedio más bajo fue proporcionado por el tratamiento 7 (Testigo). En esta fase se obtuvo las diferentes longitudes del explante por cada tratamiento, presentando estas diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos puesto que el nivel de significancia es inferior a 0.05 % según ANAVA.

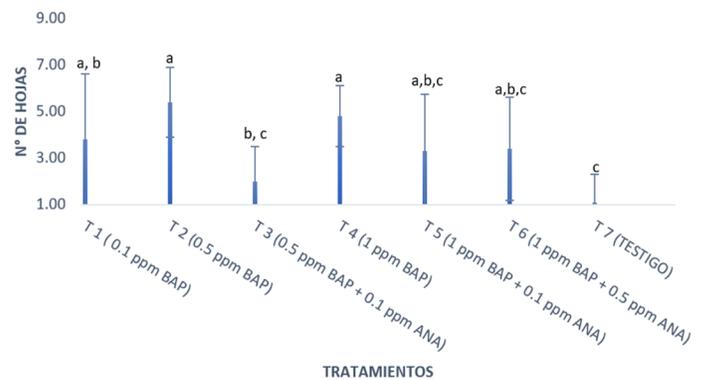


Figura 6. Número de hojas por explante de *S. macrophylla* King según tratamientos en la etapa de multiplicación. La figura muestra el consolidado de promedios según tratamientos respecto al número de hojas, los promedios más altos se obtuvieron en T2 y T4 dando 5.40 y 4.80 respectivamente. En los tratamientos si existe diferencias estadísticamente significativas respecto a la variable número de hojas puesto que el valor de significancia es menor de 0,05 según ANAVA.

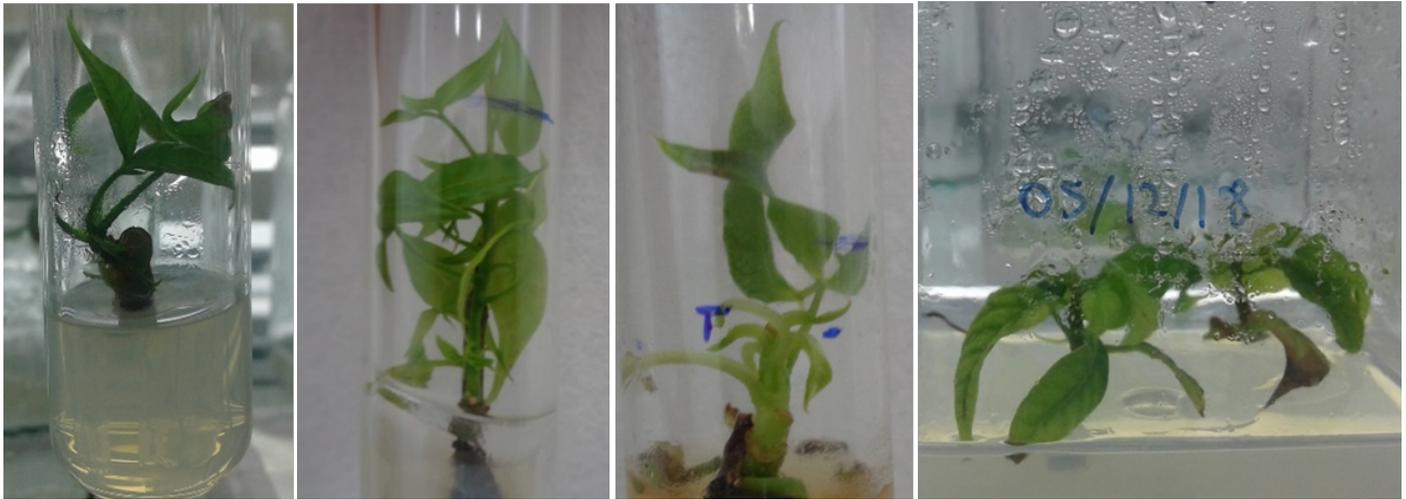


Figura 7. Plántulas *in vitro* en la etapa de multiplicación con medio WPM. Tratamiento 4 (1 mg/l de BAP).

Fase de enraizamiento:

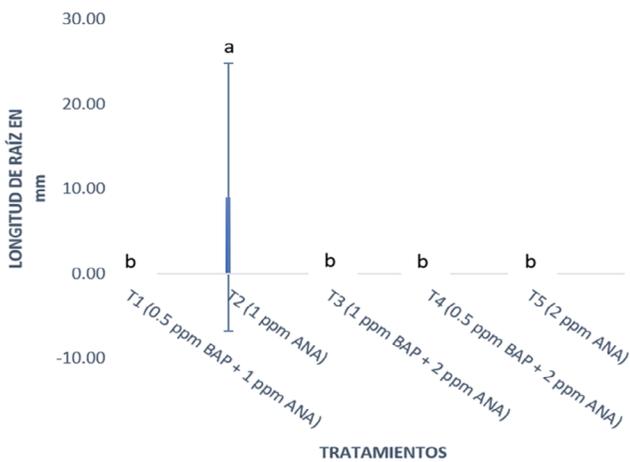


Figura 8. Longitud de raíz por explante de *S. macrophylla* King según tratamientos. La figura muestra el consolidado de promedios según tratamientos respecto a la longitud de raíces, los tratamientos T1, T3, T4, T5 no indujeron la formación de raíces, en cambio hubo inducción de raíces fue el tratamiento T2 (1 ppm ANA) y con una longitud de 9 mm en promedio.



Figura 9. Explantes en etapa de enraizamiento a los 30 días. Tratamiento 2 (1 mg/l de ANA).

DISCUSIÓN

Fase de desinfección de los explantes:

Aunque los problemas en el establecimiento *in vitro* de especies leñosas, se debe en gran medida a la contaminación microbiana de los explantes provenientes del invernadero, los resultados obtenidos sugieren que la contaminación presente en el material vegetal de caoba puede ser evitado al utilizar NaClO. Varios autores han utilizado exitosamente el cloro en cultivos en los que la contaminación y la fenolización del tejido dificultan el establecimiento de los explantes (Romero, 2000a; Romero, 2000b).

Los resultados, de la Tabla 6 y Tabla 7, superan a los descritos por Abdelnour & Muñoz, (2005) en *Tectona grandis*, al obtener 31,67% de explantes vivos, los cuales fueron previamente desinfectados en hipoclorito de calcio al 4 % por 10 minutos. Mroginski *et al.* (2000) al emplear 1,8 % de NaOCl por 30 minutos encontraron un 65% de explantes vivos en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Toana ciliata* (Meliaceae) de dos años de edad. Flores *et al.* (2009) aplicaron hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos en explantes de caoba, obteniendo un 86% de explantes vivos. En cambio, Carranza *et al.* (2013) al aplicar 15 g de hipoclorito de calcio durante 20 minutos logró alcanzar un 95% de explantes vivos

de caoba, estos resultados son opuestos a esta investigación, dado que a mayor concentración de hipoclorito de sodio y calcio en interacción con más tiempo de exposición los explantes se oxidan y necrosan. Los desinfectantes se utilizan en una concentración en la cual debe haber un efecto controlador de los contaminantes, sin que haya deterioro de los tejidos, desde luego que el grado de desinfección superficial obtenido depende no solo de la concentración del producto, sino también del tiempo de exposición de los tejidos al desinfectante (Mroginski & Roca, 2000), así como de la procedencia del material (Rathore *et al.*, 2007).

Fase de crecimiento:

El éxito del cultivo *in vitro* radica en la composición del medio de cultivo utilizado; los resultados de esta investigación muestran que el medio WPM es el más eficiente para el cultivo *in vitro* de caoba, el cual permitió obtener las tasas más altas respecto a la variable número de hojas, longitud y número de brotes (Figuras 1,2,3). El medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) tiene en su composición una baja concentración en sales NH_4^+ (5 mM), NO_3^- (9,7 mM) y Cl^- (1,3 mM), si lo comparamos con el MS, y es utilizado para el cultivo de plantas leñosas que presentan toxicidad en altas concentraciones de sales. Parada & Villegas (2009) afirman que el CaCl_2 es considerado tóxico para especies leñosas, motivo por el cual reformularon el medio WPM como WPMm, el cual carece de cloruro de calcio. A su vez la solución hidropónica la Molina presenta altas concentraciones de Ca (3,75 mM), NH_4^+ (13,57 mM), Mg^+ (1.875 mM), PO_4^- (1.12Mm) (Rodríguez *et al.*, 2014). Las altas concentraciones de sales que presentan el medio hidropónico y MS, disminuyen el potencial osmótico del medio evitando así una mayor hidratación de los brotes y como consecuencia dificultan la absorción de agua y de nutrientes. El potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en el crecimiento de los explantes, pues conforme se reduce también es menor la absorción de agua y nutrientes, lo que dificulta el crecimiento y multiplicación de brotes (Silva *et al.*, 2004). Si bien los tres tratamientos mostraron igual número de brotes (Figura 2) e inclusive el medio MS y WPM mostraron número de hojas iguales (Figura 3), en la experiencia los brotes más grandes y las hojas fenotípicamente más verdes y grandes corresponden a los del medio WPM.

Fase de multiplicación:

Si bien, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos respecto al número de brotes (Figura 5), el T4 (1 mg/l de BAP) permitió obtener para la variable longitud del brote las tasas más altas con respecto a los demás tratamientos (Figura 4), se obtuvo un promedio de 8 mm de longitud. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Carranza *et al.* (2013) quienes trabajando con caoba alcanzaron un promedio de 1,7 mm de longitud durante 21 días al añadir 2 mg/l de BAP en combinación con 1mg/l de AIB. Y Collado *et al.* (2004) quienes reportaron un 63,9 % de explantes brotados con 0,2 mg/l de BAP empleando ápices y segmentos nodales de caoba. En la investigación de Huamán *et al.* (2012) sobre propagación *in vitro* de segmentos nodales de cedro (*Cedrela odorata* L.) obtenidos

a partir de semillas botánicas, obtuvieron explantes de mayor altura, con buen número de nudos gracias a las concentraciones de 0,5 mg/l de BAP y 0,1 mg/l de ANA. En la obtención de plantas *in vitro* de caoba obtener un buen tamaño y follaje confieren a la planta mayores posibilidades de sobrevivir durante la aclimatación en los invernaderos, debido a que estos dos parámetros están relacionados con una mayor capacidad fotosintética. En tanto que plantas con mayor número de nudos permite tener un mayor coeficiente de multiplicación.

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 tipo de explante utilizado. La aplicación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo va a depender del tipo de diferenciación que se desea obtener (Bernal *et al.*, 2009),

En este estudio las concentraciones BAP de los tratamientos T2 (0,5 mg/l) y T4 (1 mg/l) fueron los que proporcionaron altas tasas de longitud de brotes (Figura 4), esto se explica porque las citoquininas aplicadas en bajas concentraciones, promueve no solo la división celular sino también la brotación y elongación de las yemas (Collado *et al.*, 2004) o según Ascon-Bieto y Talón (2013), la diferenciación de yemas vegetativas (caulogénesis) es promovida por balances auxina/citoquininas favorables a las citoquininas, mientras que los balances favorables a las auxinas inducen la formación de raíces (rizogénesis). Debemos tener en cuenta que, en las plantas, ninguna hormona tiene el control exclusivo de un determinado proceso fisiológico. La interacción entre citoquininas y auxinas regula la neoformación de órganos. Aunque la organogénesis es el resultado de una interacción entre el material vegetal (explante), el medio de cultivo y las condiciones ambientales, las fitohormonas desempeñan el papel principal.

Fase de enraizamiento:

Para lograr que las plantas micropropagadas sobrevivan al proceso de aclimatación y trasplante a campo definitivo es necesario que estas tengan un buen número y tamaño de raíces; por eso al evaluar el desarrollo radicular de las plantas se observó que solo el tratamiento T2 (1 mg/L ANA) presentó las tasas más altas de porcentajes de enraizamiento (30%, Figura 8,9). Otros investigadores como Huamán *et al.* (2012) obtuvieron 100% de enraizamiento en cedro utilizando 0,5 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de ANA, pero Carranza *et al.* (2013) no logró enraizamientos con caoba y en *Tectona grandis* sólo se logró 13,3% al utilizar 3 mg/l de ANA según Abdelnour & Muñoz, 2005). Como se ve la inducción de raíces no depende solo de la fitohormona sino de otros factores de la planta, así Silva *et al.* (2010) indican que no todas las auxinas naturales o sintéticas pueden inducir primordios radicales *in vitro*. En algunas plantas se dificulta el enraizamiento aún en presencia de auxinas, siendo otros factores los que influyen en la inducción de raíces. Algunas especies no necesitan pasar por la etapa de enraizamiento y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, ocurriendo el proceso de multiplicación y enraizamiento en forma simultánea (Sánchez *et al.*, 2004). Azcón - Bieto & Talón (2013), afirman que cada órgano presenta una sensibilidad

diferente a la auxina. Si tenemos en cuenta la concentración de hormona que produce la máxima respuesta, hemos de concluir que las raíces son más sensibles que las yemas, y estas más sensibles que los tallos. Los factores de los que depende la sensibilidad son muy diversos, pero los que probablemente desempeñen un papel más importante son la concentración de receptores hormonales, la efectividad de la unión receptor-hormona y la cadena de acontecimientos que sucede después de dicha unión.

CONCLUSIONES

En la fase de desinfección de explantes de caoba provenientes de plántulas de vivero, la aplicación de NaClO al 3% durante 15 minutos (T3), permite reducir significativamente la contaminación de los explantes por microorganismos brindando un porcentaje de explantes vivos del 87% (T3).

La concentración de NaClO al 0,5 % durante 10 minutos (T1) permite obtener un 0% de contaminación de semillas y una tasa de germinación de un 87,5%.

El mejor tratamiento en la fase de crecimiento fue el T3 que contenía las sales del medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) permitiendo un promedio de longitud de brote de 7.20 mm y un promedio de cinco hojas por explante.

En la fase de multiplicación *in vitro*, el medio WPM suplementado con 1 mg/l de BAP (T4) permitió generar longitud de brotes más desarrollados alcanzando un promedio de 8 mm de longitud y a la vez permitió el desarrollo de hojas grandes y un número promedio de cuatro hojas por explante.

En la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes de caoba con el medio WPM suplementado con 1 mg/l de ANA (T2) fue el único tratamiento que estimuló la aparición de raíces en los explantes, proporcionando una longitud promedio de 9 mm y un número de raíces promedio en una unidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los ingenieros Ms C. Manuel Oliva Cruz, (Director de INDES-CES - UNTRM), Ph D. Juan Carlos Guerrero Abad (Director general de recursos genéticos y biotecnología - INIA), Nuri Carito Vilca Valqui (Coinvestigador INDES - CES) por el apoyo brindado de una manera desinteresada y permitírnos realizar este trabajo en los ambientes de los laboratorios de Fisiología y Biotecnología Vegetal del INDES - CES - UNTRM.

LITERATURA CITADA

- Abdelnour, A. & A. Muñoz, 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: Revista Forestal 2(5): 11.
- Ascon-Bieto, J. & M. Talon. 2013. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Madrid: Edit. Interamericana. McGraw-Hill.
- Bacusoy, J. & G. Macías. 2019. propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King Meliaceae) especie forestal en estado de vulnerabilidad. Tesis de Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Manabí-Ecuador
- Barrena, V. & C. Vargas. 2004. Informe de la Autoridad Científica CITES: La caoba en el Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Lima, PE. 31 p.
- Bernal, J.; A. Rojas & A. Hine. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliácea), Tecnología en Marcha 22(3): 34-41.
- Campos, L.; H. Collazos; K. Reátegui; H. Valcárcel & J. López. 2009. Evaluación económica de plantaciones de "caoba" *Swietenia macrophylla* en el departamento de San Martín. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Iquitos - Perú.
- Carranza, M.; H. Reyes; W. Mora; O. Cevallos; A. Escobar; M. Cadme; J. Nieto & J. Morante. 2013. Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (CAOBA. Ciencia y Tecnología 6(2): 1-8
- Collado, R; R. Barbón; D. Agramonte; F. Jiménez; M. Pérez; G. Odalys. & D. Ramírez. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. Biotecnología Vegetal 4(3): 143-146.
- Daquinta, M.; M. Cid; Y. Lezcano; D. Pina & R. Rodríguez. 2004. Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en cedro y caoba híbrida. Biotecnología Vegetal 4(2): 121-124.
- Delgado, M; M. Cuba & O. Hechenleitner. 2008. Propagación vegetativa de "taique" *Desfontainia spinosa* y "tepa" *Laureliopsis philippiana* con fines ornamentales. Bosque (Valdivia) 29(2): 120-126.
- Flores, M.; V. Jiménez & R. Chacon. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con mini estacas, Revista Forestal Agronomía Mesoamericana. 20 (2): 319-325.
- Gómez, L. 2008. Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina, ácido naftalenacético y ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla*). Tesis título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Ucayali. Perú
- Gutiérrez, C. & M. Oliva. 2003. Curso, Principios y Prácticas en el Cultivo de Tejidos Vegetales, Teoría. San José - Costa Rica. Páginas 4 - 40.
- Huamán, X.; E. Ruíz; J. Guerrero; G. Pichis; L. García & R. Solís. 2012. Propagación *in vitro* de segmentos nodales de cedro (*Cedrela odorata* L.) obtenidos a partir de semillas botánicas. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana. Rev. Folia Amazónica, 21 (2), 109 - 114.
- Martínez, E. 2002. Citoquininas y fitocromos. VIII Simposio. Metabolismo y modo de acción de Fitohormonas. Edit. Junta de Andalucía: Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla. España:173-182.
- Mroginsky, L. & W. Roca. 2000. Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo2.pdf
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15 (3) : 473-497
- Parada, D. & A. Villegas. 2009. Propagación *in vitro* del Híbrido almendro X durazno H1. Revista Fitotecnia Mexicana. 32 (2), 103-109.
- Prado, L.; C. Samaniego & J. Ugarte-Guerra. 2012. Estudio de las cadenas de abastecimiento de germoplasma forestal en Ecuador. ICRAF working paper No 115. World Agroforestry Centre (ICRAF), Lima, Perú.
- Quinto, L; P. Martínez-Hernández; L. Pimentel-Bribiesca & D. Rodríguez-Trejo. 2009. Alternativas para mejorar la germinación de semillas de tres árboles tropicales. Revista. Chapingo 15(1): 23-

28.

- Rathore, J. S.; M. S. Rathore; M. Singh; R. P. Singh & N. S. Shekhawat.** 2007. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. Indian Journal of Biotechnology, 6, 239-244.
- Reynel, C; R. Pennington; T. Pennington; C. Flores & A. Daza.** 2003. Árboles útiles de la Amazonía Peruana. Manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Perú.
- Rodríguez, A.; A. Posadas & R. Quiroz.** 2014. Rendimiento y absorción de algunos nutrimentos en plantas de camote cultivadas con estrés hídrico y salino. Rev. Chapingo Serie Horticultura 20 (1): 19-28.
- Rodriguez, R.; M. Daquinta; I. Capote; D. Pina; Y. Lezcano & J. Gonzalez-Olmedo.** 2003. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogany* (caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Cultivos Tropicales 24 (3): 23-27
- Rojas-Vargas, A. & A. Hine-Gómez.** 2019. Micropropagación de clones superiores de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de segmentos nodales. Revista de Ciencias Ambientales (Trop J Environ Sci) 53(2): 47-59
- Romero, D.** 2000a. Una metodología para la desinfección y el control de la oxidación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). Acta Científica Venezolana 51(Sup. 2), 7.
- Romero, D.** 2000b. Control de la oxidación y contaminación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.). Acta Científica Venezolana 51(Sup. 2), 7.
- Sánchez, M.; D. Ríos; M. Pedraza; G. Pereira; H. Castellanos & R. Escobar.** 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* a partir de embriones aislados, Revista Forestal, Bosque 25(1): 123-128.
- Silva, L.; P. de Tarso; S. de Souza; C. de Queiroz & H. Brandão.** 2010. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Acta Amaz. 40(2): 275-279.
- Silva, M. C.; A Villegas; S. García, G. González, M. Mendoza & L. Posadas.** 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110". *Interciencia* 29:384-388.
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2002. Plant physiology (3a ed). Sunderland: Sinauer Associates, MA.
- Uribe, M.; C. Delaveau; M. Garcés & R. Escobar.** 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque 29(1): 58-64.
- Yaronskaya, E.; I. Vershilovskaya; Y. Poers; A. Alawady; N. Averina & B. Grimm.** 2006. Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. Planta 224, 700 - 709.