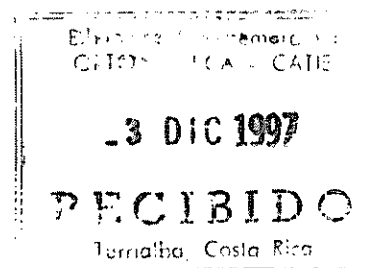


CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSTGRADO



**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LOS
EXPLANTES NODALES DE CAOBA (*Swietenia macrophylla*. King)**

POR

MARIO ANTONIO ORELLANA NÚÑEZ

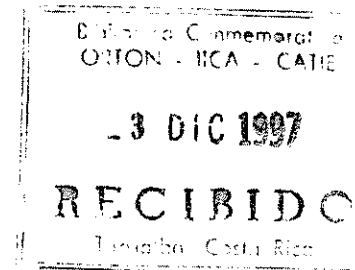


Turrialba, Costa Rica
1997

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA

AREA DE POSTGRADO



**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LOS
EXPLANTES NODALES DE CAOBA (*Swietenia macrophylla*. King)**

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar el grado de

MAGISTER SCIENTIAE

por

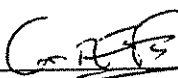
MARIO ANTONIO ORELLANA NÚÑEZ

CATIE
Turrialba, Costa Rica
1997

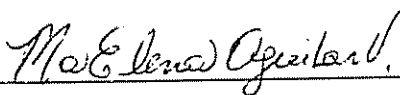
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

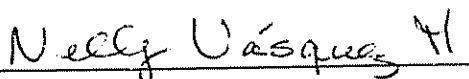
FIRMANTES:



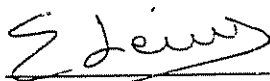
Francois Cote, Ph.D.
Profesor Consejero



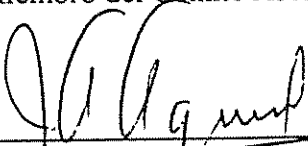
María Elena Aguilar Vega, Ph.D.
Miembro del Comité Asesor




Nelly Vasquez Morera, M.Sc.
Miembro del Comité Asesor




Herve Etienne, Ph.D.
Miembro del Comité Asesor



Juan A. Aguirre, Ph.D.
Jefe, Area de Postgrado



Markku Kanninen, Ph.D.
Director, Programa de Enseñanza



Mario Antonio Orellana Nuñez
Candidato

DEDICATORIA

A Dios por su infinita misericordia

A mi Esposa Alba Elsa y a mis hijos

Mario Antonio

Rafael Cesar

José Mauricio

Con Amor

A mis Padres

Con gratitud por sus esfuerzos y sabios consejos

A mis Hermanas y sobrinos

Con el cariño de siempre

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a:

Todos los miembros del Comité Asesor por su apoyo en las diferentes áreas técnicas de la investigación y sugerencias en el desarrollo del mismo. Muy especialmente a María Elena Aguilar por su ayuda y comprensión a lo largo de toda la investigación y revisión del documento.

A todo el personal de la Unidad de Biotecnología del CATIE, por su abnegada y desinteresada colaboración en el desarrollo de la investigación y muy especialmente por la amistad brindada.

Al personal de la Unidad de informática y Biblioteca de CATIE por su colaboración, al personal Docente y a todas aquellas personas que de alguna forma participaron en la realización de mis estudios.

A la Universidad de El Salvador y a la Escuela de Postgrado de CATIE, por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional (Programa de Becas MUTIS) y DANIDA por el financiamiento de mis estudios.

Muy especialmente a mis compañeros y sus familias, que en estos dos años compartimos alegrías, dificultades y tristezas.

CONTENIDO

	Página
Resumen	viii
Summary	ix
Lista de figuras	x
Lista de cuadros	xii
1. INTRODUCCION	1
1.1. Importancia del uso de la biotecnología en el mejoramiento genético de la caoba	1
1.2. Objetivos de estudio	4
2. REVISION DE LITERATURA	5
2.1. Características generales de <i>Swietenia macrophylla</i> . King (Caoba)	5
2.1.1. Origen y distribución	5
2.1.2. Ubicación y descripción taxonómica	5
2.2. Propagación convencional de las especies forestales	6
2.2.1. Propagación sexual	6
2.2.2. Propagación asexual	7
2.2.2.1. injertos	8
2.2.2.2. Estacas enraizadas	9
2.3. Propagación <i>in vitro</i> de árboles forestales	10
2.3.1. Escisión de embriones	12
2.3.2. Embriogénesis somática	13
2.3.3. Cultivo de microestacas	15
2.3.3.1. Asepcia en el material vegetal y establecimiento del cultivo	16
2.3.3.2. Fase de multiplicación	17
2.3.3.3. Fase de enraizamiento y aclimatación	18
2.3.3.3.1. Enraizamiento <i>in vitro</i>	18
2.3.3.3.2. Enraizamiento <i>ex vitro</i>	20
2.3.3.3.3. Aclimatación	20
2.3.4. Micropropagación de caoba	21
2.4. Biotecnología y su aplicación en el mejoramiento de especies forestales	22
2.4.1. La crioconservación y el almacenamiento <i>in vitro</i>	22
2.4.2. Ingeniería genética	23
2.4.3. Fusión de protoplastos	23

(explante de nudo cotiledonar)	39
4.1.2. Forma de cultivo del explante (Explante secundario)	40
4.2. Fase de multiplicación	41
4.2.1. Cultivo en medios semi-sólidos	42
4.2.2. Cultivo en medios líquidos en inmersión temporal	45
4.3. Fase de desarrollo	47
4.4. Fase de enraizamiento	48
4.5. Fase de aclimatación	49
5. DISCUSIÓN	52
5.1. Fase de iniciación	52
5.1.1. Selección de la fuente de explante (Explante primario)	52
5.1.2. Forma de cultivo del explante (Explante secundario)	55
5.2. Fase de multiplicación	56
5.1.3. Medios semi-sólidos	56
5.1.4. Medios líquidos, sistema de inmersión temporal	58
5.3. Fase de desarrollo	60
5.4. Fase de enraizamiento	61
5.5. Fase de aclimatación	63
6. CONCLUSIONES	64
7. RECOMENDACIONES	67
8. LITERATURA CITADA	68
9. APÉNDICE	82

ORELLANA, M. A. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King). Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 94 p.

Palabras claves: *Swietenia macrophylla*, yemas axilares, micropropagación, explante nodal, histología. Inmersión temporal

RESUMEN

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología del CATIE, de mayo de 1996 a octubre de 1997. El objetivo general del trabajo fue establecer una metodología para el cultivo de microestacas de caoba (*Swietenia macrophylla*, King) *in vitro*, que sirva de base para el desarrollo de un sistema de micropropagación de genotipos seleccionados.

Se utilizaron plántulas de caoba *in vitro* de dos semanas de edad. La mejor fuente de explantes primarios la constituye el nudo cotiledonar en comparación con el nudo de la escama foliar y el eofilar. El subcultivo por cuatro ciclos consecutivos del nudo cotiledonar mostró el gran potencial de esta fuente de explantes. Los cortes histológicos revelaron la presencia de al menos dos yemas supernumerarias ubicadas en dirección descendente en cada axila del nudo cotiledonar con diferentes etapas ontogénicas. La primera en madurar es la yema más alejada de la axila del eje embrionario. El mejor explante secundario lo constituye la yema de la escama foliar proveniente de los brotes cotiledonares, cultivados en posición horizontal sobre el medio de cultivo.

La multiplicación de los brotes derivados del explante secundario en el medio MS suplementado con 6.5 μM de BAP y 2.2 μM de 2-ip fue superior en términos de calidad de brotes producidos con respecto a los otros medios evaluados. En este tratamiento, el número promedio de brotes por explante así como la altura promedio de los brotes fue superior. El 60% de este tipo de explante puede ser reciclado para maximizar la producción de brotes. Explantes secundarios cultivados en el mismo medio pero en forma líquida en el sistema de inmersión temporal automatizado (RITA®) brotaron en un 100%. Frecuencias de inmersión de 3 minutos cada 3 ó 5 días permitieron el desarrollo de brotes de buena morfología y la reducción total de fenolización y vitrificación en el explante.

Los brotes generados en la fase de multiplicación fueron subcultivados en un medio de desarrollo como paso intermedio de acondicionamiento para el enraizamiento. Este medio constituido por las sales minerales de WPM, carbón activado y sin reguladores de crecimiento permitió el alargamiento de los brotes y una mejor apariencia foliar.

El uso de un sistema de enraizamiento secuencial caracterizado por tres fases (inducción, expresión y desarrollo de raíces), permitió obtener un 70% de enraizamiento *in vitro*, lo que favoreció la aclimatación de las vitroplantas en el invernadero. De un total de 48 vitroplantas en aclimatación, sobrevivió un 27%, estas plantas aumentaron un promedio de 3.5 cm de altura a los 60 días en el invernadero.

La micropropagación de caoba a partir de plántulas provenientes de semilla significa una etapa de estudio importante para conocer el comportamiento de esta especie en cultivo *in vitro*. Estos primeros resultados constituyen una base de trabajo para la aplicación de esta metodología en la multiplicación de genotipos seleccionados en apoyo a los programas de mejoramiento genético y la conservación de los recursos forestales.

ORELLANA, M.A. 1997. Development of an *in vitro* culture system for mahogany (*Swietenia macrophylla* King) nodal explants. Thesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 96 p.

Keywords: *Swietenia macrophylla*, axillary buds, micropropagation, nodal explant, histology, temporary immersion.

SUMMARY

This research was conducted at the Tissue Culture Laboratory of CATIE's Biotechnology Unit, from May, 1996 to October, 1997. The purpose of this work was to establish an *in vitro* culture methodology for mahogany (*Swietenia macrophylla*, King) microshoots, that will serve as the basis to develop a micropropagation system of selected genotypes.

Two weeks old *in vitro* mahogany plantlets were utilized. The best primary explants source was the cotyledon node in comparison to the foliar scale and the eophilar node. Subculture of the cotyledon node during four consecutive cycles showed its great potential as explants source. The histological cuts revealed the presence of at least two supernumerary buds located in descendent direction in each cotyledon node axil with different ontogenic stages. The explant is the foliar scale bud from cotyledonary buds, cultivated in horizontal position on the culture medium.

The multiplication of buds derived from the secondary explant in the MS medium supplemented with 6.5 μ M BAP and 2.2 μ M 2-ip was superior in terms of buds' quality in regards to other mediums evaluated. In this treatment, the average buds number per explant, as well as the buds' average height was superior. 60% of this type of explants can be recycled to maximize buds production. Secondary explants cultivated in the same medium but in liquid form using the automated temporal immersion system (RITA®) showed a 100% shooting. Immersion frequencies of 3 minutes each 3 or 5 days, allowed the development of good morphology buds and the total reduction of explant's phenolization and vitrification.

The buds produced during the multiplication stage were subcultured in a development medium as a conditioning intermediate step for rooting. This medium which was composed of WPM mineral salts, activated charcoal and no growth regulators allowed buds elongation and a better foliar appearance.

The use of a sequential rooting system characterized by three stages (induction, expression and roots development), allowed to obtain 70% *in vitro* rooting which favored vitroplants' greenhouse acclimatization. From 48 vitroplants under acclimatization, 27% survived; the size of these plants increased, in average, 3.5 cm after 60 days in the greenhouse.

Mahogany micropropagation from seed plantlets is an important research area to understand the performance of this species in *in vitro* culture. These preliminary results constitute a work base to apply this methodology for the multiplication of selected genotypes to support genetic improvement programs and preservation of forest resources.

Lista de Figuras

Figura	página
Fig. 1. Procedimiento utilizado para seleccionar la fuente de explante primario y la forma de cultivo del explante secundario para la micropropagación de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i> King) a partir de plántulas <i>in vitro</i> provenientes de semillas (→ Ruta seguida en la multiplicación de caoba <i>in vitro</i>).....	26
Fig. 2. Selección del explante primario. A) brotes de yemas eofilares B) Brotes de yemas de de escamas foliares. C) brotes de yemas cotiledonares. D) yema eofilar (4x); y, yema; p, peciolo; ee, eje embrionario. E) yema de escama foliar (4x); b, bráctea; y, yema; ee, eje embrionario; ef, escama foliar; F) yemas del nudo cotiledonar (4x); pc, peciolo cotiledonar; y, yema.....	35
Fig. 3. Cinética de desarrollo de yemas cotiledonares después de la poda. A) 0 días (4x); pc, peciolo cotiledonar; y, yema; b, bráctea. B) 3 días (4x); y, yema; b, bráctea C) 6 días (4x). bc, brote cotiledonar; b, bráctea; y, yema; pc, peciolo cotiledonar D) sección longitudinal de eje embrionario (4x). cs, células secretoras E) brotes de nudo cotiledonar en presencia de cotiledones (2º subcultivo). F) brotes de nudo cotiledonar en ausencia de cotiledones.....	37
Fig. 4. Porcentaje(A) y días a brotación (B), altura (C) y número promedio de brotes (D) por explante cotiledonar con cotiledones tomados de plántulas a diferentes edades (14, 28 y 42 días) después de la siembra de semillas <i>in vitro</i> . La significancia estadística representada por letras pequeñas se evaluó al 5%.....	38
Fig. 5. Relación entre la altura y el número promedio de brotes de yemas cotiledonares tomadas de plántulas a diferentes edades, 14 días (A), 28 días (B) y 42 días (C). Los datos se presentan al 5% de significancia estadística.....	39
Fig. 6. Evaluación de tres ciclos sucesivos de cultivo del explante primario para la obtención de explantes secundarios en el cultivo de microestacas de caoba. El número y altura promedio (cm) de brotes se evaluó a una significancia del 5%.....	40
Fig. 7. Promedios de el número y la altura de brotes por explante en la evaluación de diferentes concentraciones y combinaciones de BAP, Kinetina y 2-ip durante	

la fase de multiplicación (primer ciclo de cultivo). La significancia estadística representada por letras pequeñas se calculó al 5%.....	42
Fig. 8. Promedios de el número y la altura de brotes por explante en la evaluación de diferentes concentraciones y combinaciones de BAP, Kinetina y 2-ip en la fase de multiplicación (segundo ciclo de cultivo). La significancia estadística representada por letras pequeñas se calculó al 5%.....	43
Fig. 9. Multiplicación de brotes de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i>) <i>in vitro</i> . A) Reciclaje del explante secundario. ep, explante primario; pb, primer brote podado; bn, brotes nuevos de las yemas axilares del primer brote. B, C, y D) desarrollo de brotes y proliferación de yemas axilares durante la multiplicación.....	44
Fig. 10. Producción de brotes de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i>) en el sistema de inmersión temporal. A) Brotación y crecimiento de los explantes en RITA®; B) Brote desarrollado a los 30 días después de la siembra del explante; C) Crecimiento de brote en un medio WPM de desarrollo; D) brote enraizado.....	46
Fig. 11. Numero y altura promedio de brotes de caoba cultivados bajo el Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®) a diferentes ritmos de inmersión y tratamientos de inducción de brotes. La significancia estadística representada por letras pequeñas se calculó al 5%.....	47
Fig. 12. Enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de caoba después de 30 días en un medio de desarrollo de raíces. A. Porcentaje de enraizamiento (%), B. Número y longitud (cm) promedio de raíces. La significancia estadística representada por las letras pequeñas se evaluó al 5%.....	49
Fig. 13. Aclimatación de plántulas de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i>) obtenidas <i>in vitro</i> . A) Desarrollo de raíces adventicias funcionales; B) crecimiento de plántula aclimatada a los 60 días después del traslado a invernadero; C) plántulas aclimatadas.....	51
Fig. 14. Posibles contribuciones de la biotecnología en los programas de mejoramiento genético de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i>) en el CATIE (— trabajo desarrollado en tesis).....	67

Lista de Cuadros

En el texto	Página
Cuadro 1. Porcentajes de brotación (%), días a brotación, número promedio de brotes por explante, altura de brotes (cm) e índice de Capacidad de alargamiento del brote (CAB) en la selección de la fuente de explante primario para el cultivo de microestacas de caoba a partir de plántulas germinadas <i>in vitro</i> .	34
Cuadro 2. Porcentaje de brotación (%), días a brotación, número promedio de brotes por explante, altura de brotes (cm) e Índice de Capacidad de alargamiento durante la selección de la forma de cultivo del explante secundario para el cultivo de microestacas de caoba. b) brote de escama foliar; c) brote de nudo cotiledonar con cotiledones y d) brote cotiledonar sin cotiledones.	41
Cuadro 3. Evaluación de cuatro medios diferentes durante la fase de desarrollo para el acondicionamiento de los brotes de caoba para el enraizamiento.	48
En apéndice	
Apéndice 1. Evaluación de diferentes fuentes de citocininas, concentraciones y combinaciones utilizadas durante la fase de multiplicación de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i> King.) por microestacas.	82
Apéndice 2. Estudio de diferentes tiempos (minutos) y frecuencias (días) de inmersión en el sistema RITA® para evaluar el comportamiento de microestacas de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i> King) durante la fase de multiplicación.	83
Apéndice 3. Evaluación de diferentes tiempos (minutos) y frecuencias (días) de y inmersión en el sistema RITA® durante la fase de multiplicación de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i> King) a partir de microestacas utilizando dos medios diferentes de multiplicación.	83
Apéndice 4. Pasos en el sistema de inmersión temporal con recipientes RITA® utilizados en la propagación <i>in vitro</i> de caoba.	84

Apéndice 5 Medios de desarrollo de brotes de caoba obtenidos en la fase de multiplicación.	
Fase de desarrollo	85
Apéndice 6 Medios de desarrollo y medios utilizados para el enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación.....	85
Apéndice 7. Composición química (mg/l) de medios de cultivos más suplementos empleados para la multiplicación <i>in vitro</i> de segmentos nodales de caoba.	86
Apéndice 8. Protocolo de deshidratación, infiltración y tinción empleado para el estudio histológico de los diferentes eventos	87
Apéndice 9. Análisis estadístico utilizado en la multiplicación <i>in vitro</i> de caoba	88
9.1. Fase de establecimiento del cultivo.....	88
9.1.1. Determinación de la fuente de explante	88
9.1.2. Edad de la plántula para la obtención de brotes cotiledonares.....	89
9.1.3. Evaluación de gelificantes.....	90
9.1.4. Cultivo sucesivo del explante primario (Explante del nudo cotiledonar).....	90
9.1.5. Forma de cultivo del explante	91
9.2. Fase de multiplicación.....	92
9.2.1. Cultivos en medios semi-sólidos	92
9.2.2. Cultivos en medios líquidos (sistema RITA®)	93
9.3. Fase de enraizamiento	94

1. INTRODUCCION

1.1. Importancia del uso de la biotecnología en el mejoramiento genético de la caoba.

Los bosques cubren aproximadamente una tercera parte de la superficie terrestre, sin embargo la tasa de pérdida de bosque tropical se estima en 11 millones de hectáreas por año. Una de las principales causas es la extracción de madera para la construcción, la industria de muebles y la producción de pulpa y papel. Estados Unidos, Japón y El Reino Unido son los principales importadores (Burley, 1987).

Si bien es cierto América Latina puede considerarse privilegiada en términos de su dotación de recursos naturales, ya que alberga el 23% de los bosques del planeta y el 46% de los bosques tropicales; existen grandes problemas ambientales que resultan de los modelos de desarrollo aplicados hasta hoy. La región está perdiendo sus bosques, a un ritmo de 0.7% por año y sólo en Centroamérica y el Caribe, la relación entre la reforestación y la deforestación es de 1:27 (Winograd, 1995).

Estos índices demuestran la necesidad de acciones concretas para realizar un uso sostenible de los recursos del bosque. La caoba (*Swietenia macrophylla*. King) es una de las especies en peligro de extinción en la región por su sobreexplotación, por lo que cada vez aumenta la presión para ubicarla en el apéndice II de CITES. Esto indica que esta especie podría entrar a los mercados internacionales únicamente si los gobiernos de los países determinan que su explotación comercial no reduce significativamente sus poblaciones naturales. Por otra parte grupos ecologistas promueven un boicot internacional a su comercialización (Virissimo *et al*, 1995).

La caoba es una de las especies del bosque tropical húmedo que por aproximadamente 500 años se ha comercializado como una de las maderas más finas del mundo (Lyhr, 1992; Snook, 1993). Sin embargo, ésta siempre se ha obtenido de los bosques naturales (Snook, 1993), debido a que uno de los mayores problemas al establecimiento de plantaciones es el ataque a los puntos de crecimiento de los árboles jóvenes por las larvas del lepidóptero

Hypsipyla grandella (Lyhr, 1992). Estas larvas se desarrollan dentro de las yemas terminales y causan la muerte del brote, impidiendo el crecimiento longitudinal del tronco (Newton *et al*, 1993) y en consecuencia, la deformación del árbol (Lamb, 1966). Este insecto se ha convertido en la plaga de mayor importancia económica en los bosques tropicales (Newton *et al*, 1993). La mortalidad de las plántulas en regeneración natural es de 60% después de un año, pero después de la estación seca menos del 5% sobreviven (Gerhardt, 1994).

Con el objetivo de plantear algunas alternativas de solución a los problemas de producción de madera de alta calidad y otros productos forestales sin afectar los recursos del bosque, se han realizado diferentes esfuerzos a nivel mundial para mejorar características genéticas de interés.

Probablemente, en ningún otro sector de la investigación científica agrícola se está avanzando tan rápidamente como en biotecnología vegetal, y los beneficios potenciales aún son mayores para la silvicultura, ya que en algunos casos existe la posibilidad de ganar tiempo en los procesos de mejoramiento genético para la producción o rendimiento, ya sea de madera o de otros productos (Haines, 1990).

Las técnicas de marcadores bioquímicos o moleculares como las isoenzimas, Fragmentos de Restricción de Tamaño Polimórfico (RFLP's) y la Ampliación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD's), están proporcionando información muy importante para los programas de mejoramiento genético forestal (Haines, 1994), entre ellos, estudios de migración (flujo de genes) y sistemas de apareamiento (Cornelius, 1995); estudios taxonómicos y de control de calidad, para la identificación de clones y la contaminación de huertos semilleros entre otros; con el fin de apoyar los programas de mejoramiento de las especies latifoliadas tropicales (Haines, 1994). Estudios de este tipo se han realizado en plantas de especies como *Populus deltoides* (Rani *et al*, 1995), *Picea abies* (Heinze *et al*, 1996) y *Eucalyptus* (Keil y Griffin, 1994). La tecnología RAPD podría ser usada fácilmente en forestales para medir la diversidad genética entre individuos, como también en poblaciones complejas, usando la Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR), para examinar el polimorfismo y la construcción de mapas

genéticos (Chen y Filippis, 1996). En algunas especies de la familia Meliaceae se ha estudiado el polimorfismo del ADN utilizando PCR por medio de la ampliación al azar del ADN polimórfico (RAPD), con el fin de conocer la magnitud de la variación genética existente en ocho especies (Chalmers *et al*; 1994).

Aunque hasta la fecha no se ha encontrado una aplicabilidad evidente de la variación somaclonal en las especies tropicales latifoliadas, esta constituye una tecnología muy valiosa, porque la selección puede realizarse a nivel celular. Además, el rescate de embriones se ha utilizado ocasionalmente en especies forestales pero está limitado a un pequeño número de híbridos que no desarrollan embriones *in vitro* (Haines, 1994). La ingeniería genética apoya los trabajos de mejoramiento genético para encontrar resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia al frío, a los herbicidas y en la búsqueda de cambios en las propiedades de la madera (Haines y Martín, 1995). Todas estas técnicas de creación varietal o creación de diversidad y la micropropagación, son esfuerzos que se están haciendo dentro de la biotecnología vegetal para el sector forestal.

Más de 100 especies de árboles forestales han sido micropropagadas. La micropropagación aplicada al área forestal presenta las ventajas de una inmediata aplicación en un sistema de propagación clonal dirigido a la producción comercial de clones seleccionados (Haines, 1994), a la producción de propágulos provenientes de semillas de familias superiores (Mohammed y Patel, 1989), en programas de reforestación usando plántulas uniformemente genéticas, al aumento de la productividad por medio de la captura del vigor híbrido (Warrag *et al*, 1990) y además constituye una herramienta para los programas de conservación de los recursos genéticos forestales (Behm *et al*, 1996) y de mejoramiento genético ya que es la base para la aplicación de técnicas de transformación genética (Skidmore *et al*, 1990).

En caoba, desarrollar un primer sistema de multiplicación a partir de microestacas de plántulas germinadas *in vitro*, podría permitir a corto o mediano plazo, la clonación de genotipos superiores seleccionados por la vía del mejoramiento genético convencional. Además, permite la aplicación inmediata de metodologías para la conservación de

germoplasma forestal *in vitro* y si se establece un sistema de embriogénesis somática, aumenta las expectativas para iniciar estudios en transformación genética para introducir genes de resistencia a *Hypsipyla*. El desarrollo de éste método responde a la necesidad de los países interesados en la explotación sostenible de la caoba mediante el establecimiento de plantaciones. En este sentido CATIE, a través de los países miembros, ha tomado la iniciativa de incluir esta especie como prioridad en sus líneas de investigación, para lo cual fue presentado ante la ITTO (International Tropical Timber Organization), el proyecto “Conservation and Pest Management for realizing the potential of Mahogany as a sustainable crop”.

1.2. Objetivos del estudio

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo es el de establecer una metodología que permita el cultivo de microestacas de caoba (*Swietenia macrophylla*, King) *in vitro*, como base para el desarrollo de un sistema de micropropagación de genotipos seleccionados en los programas de mejoramiento genético para resistencia a *Hypsipyla*.

Objetivos específicos:

- Establecer el cultivo de explantes nodales (microestacas) utilizando yemas axilares epicotilares y cotiledonares de plántulas germinadas *in vitro*.
- Desarrollar la fase de multiplicación de microestacas en medios de cultivo semi-sólidos y líquidos (Sistema de Inmersión Temporal Automatizado, RITA®) suplementados con diferentes citocininas.
- Inducir el enraizamiento de las vitroplantas obtenidas para lograr su transferencia a invernadero (aclimatación).

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Características generales de *Swietenia macrophylla*. King (Caoba).

2.1.1. Origen y distribución.

La caoba es originaria de los bosques húmedos desde el Sur de México hasta la cuenca del Amazonas (Gueilfus, 1994), específicamente hasta el río Paraguay en Brasil y Bolivia (Lamb, 1966). Esta especie fue introducida en el sur de Florida, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Cuba, Trinidad y Tobago, la India y otros países tropicales (Little, 1967). Crece como árbol aislado en los bosques (Standley, 1946) debido a que es una especie adaptable a un amplio rango de condiciones ecológicas (Lamb, 1966).

2.1.2. Ubicación y descripción taxonómica

Swietenia macrophylla King (caoba), pertenece a la familia Meliaceae (Gueilfus, 1994). Los sinónimos botánicos conocidos son: *Swietenia candollei* Pittier, *S. belizensis* Lundell, *S. krukovii* Gleason & Panshin, y *S. tessmannii* Harms (Little, 1967). El nombre Maya es reportado de Honduras como "Chiculte" y como "Punab" de Yucatán, México (Standley, 1946).

El árbol de Caoba puede alcanzar hasta 50 metros de altura, presenta un tronco erecto con un diámetro promedio de 75 a 150 cm, libre de ramas (Gueilfus, 1994) al menos por unos 18 a 20 metros, donde se desarrolla una copa generalmente espesa (Standley, 1946). La corteza, a nivel externo esta profunda y ampliamente fisurada, de color pardo grisáceo a gris oscuro, internamente es de color rosado a rojo y de textura fibrosa. El grosor total es de 1 a 1.5 cm (Basse Krüger, 1992). Las hojas son alternas, compuestas, paripinnadas (Lamb, 1966) con 3 a 5 foliolos (Basse Krüger, 1992) y glabras (Standley, 1946) de 12 a 40 cm de largo (Basse Krüger, 1992).

Los racimos florales (panículas) de 10 - 15 cm o más de largo salen de la base de las hojas nuevas y tienen muchas flores monoicas, pequeñas y de pedúnculo corto (Little, 1967). Muchas de las inflorescencias producen solo flores estaminadas, unas pocas pistiladas, y

algunas inflorescencias de la parte superior del árbol producen ambos tipos. Sobre un árbol estudiado, el número de flores estaminadas es 10 veces mayor que las pistiladas (Lee, 1967).

El fruto es una cápsula ovoide u oblonga (Basse Krüger, 1992), leñosa, dehiscente de 11 a 18 cm de largo y 8 cm de ancho. El promedio de semillas es de 60 por fruto y de 12 por lóculo (Alvarenga *et al*, 1988) son de color café rojizo (Standley, 1946) planas y de alas largas (Little, 1967) con una longitud de 7.5 a 8.5 cm y como máximo 3 cm de ancho (Standley, 1946).

2.2. Propagación convencional de las especies forestales con énfasis en caoba.

Como consecuencia de la disminución de los bosques naturales como fuente de abastecimiento de productos forestales y dado el aumento de la demanda, se ha venido promoviendo el establecimiento de plantaciones forestales (Salazar, 1996).

La propagación sexual provee las bases para el mejoramiento genético, y muchas veces se han obtenido buenas combinaciones, produciendo grandes cantidades de semilla genéticamente mejorada a bajo costo. Desafortunadamente en la mayoría de las especies forestales esto no es posible (Bonga y Von Aderkas, 1992), debido a que el uso de propágulos vegetativos de clones seleccionados para el establecimiento de plantaciones ha venido aumentando en los últimos años (Mesen *et al*, 1992)

2.2.1. Propagación sexual

La provisión de semillas forestales a los países de América Central presenta con frecuencia inconvenientes en cuanto a calidad genética y disponibilidad de las cantidades requeridas en forma continua y oportuna. Esta situación afecta a los reforestadores, en especial a aquellos que requieren especies de alto valor comercial, normalmente las mismas, que han sido extraídas y aprovechadas en forma selectiva de bosques naturales (Guevara, 1996).

Otro de los problemas de la propagación de árboles por semilla está relacionado con la disminución de la germinación y viabilidad. La caoba, por ejemplo puede almacenarse temporalmente (corto plazo) con contenidos de humedad de 4 a 5%, en envases plásticos y a una temperatura constante de 15°C (Samaniego, 1995). Estudios realizados por Araujo (1971) sobre la viabilidad de las semillas determinaron que la germinación es bastante rápida, iniciándose de los 13 a 17 días, con un período de 10 días de duración, sin embargo el porcentaje de germinación se reduce drásticamente conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. Hernández (1960) manifiesta que la reducción de la viabilidad de las semillas de Caoba es en forma rápida y se debe a su riqueza en aceites esenciales. En cuanto a condiciones físicas para su germinación, estudios realizados por Samaniego (1995), demostraron que son necesarios temperaturas constantes de 30 y 28°C y un fotoperíodo de 16 horas por día. La germinación es hipógea y de tipo criptocotilar; durante ésta, los cotiledones mantienen su posición dentro de la semilla pero se inicia el desarrollo de estructuras peciolares mediante crecimiento intercalar. Los peciolo se curvan hacia el exterior y forman una concavidad entre ellos, por la que el epicotilo inicia su salida. El desarrollo del epicotilo es tardío y posterior al crecimiento longitudinal de los peciolo cotiledonares. Este no puede emerger de otra forma, debido a la fusión de los cotiledones a lo largo de la superficie adaxial de sus láminas (Alyarenga *et al*, 1988).

Observaciones en el bosque han determinado que en la época de germinación de la semilla de caoba debe existir un período de claridad, de lo contrario ésta muere (Quevedo, 1986). Así mismo, la sombra de las plántulas debe mantenerse por un corto tiempo después del trasplante a vivero, permitiendo un 65% de luz para su crecimiento (Samaniego 1995).

2.2.2. Propagación asexual

Tradicionalmente se han utilizado varias formas de propagación vegetativa en mejoramiento genético forestal (Mesen *et al*, 1992), pero durante los últimos años se ha logrado un considerable progreso en el uso de técnicas clonales para fines tanto de producción de pulpa como de madera (Leakey, 1987).

Libby (citado por Leakey, 1987) encontró 16 ventajas potenciales de la clonación forestal entre las que incluye:

- Habilidad para una rápida captura de una gran proporción de la variación genética aditiva y no aditiva.
- Eliminación de individuos autofecundados en las plantaciones comerciales.
- Producción masiva de genotipos de alto valor obtenidos por hibridación o ingeniería genética.
- Multiplicación de individuos raros los cuales tienen dos o más características favorables que son de correlación negativa.
- Habilidad para seleccionar y utilizar la mayor parte de la diversidad genética que normalmente se encuentra en una sola progenie.
- Habilidad para el uso de clones que son bien adaptados a un sitio en particular.
- Mayor simplicidad y facilidad en el manejo de grupos de plantas en comparación con huertos semilleros.
- Los períodos entre la selección y la producción son cortos comparados con los huertos semilleros.
- Incremento de la superioridad de clones por medio de programas de selección y la habilidad para usar árboles en estado maduro.
- Posiblemente el uso de la propagación vegetativa en dasonomía aumentará y ha llegado a ser una de las herramientas más importantes del forestal dedicado al mejoramiento genético, ya que permite captar y transferir al nuevo árbol todo el potencial genético del árbol donante. Los dos métodos más utilizados son las estacas enraizadas y el injerto. El método más reciente de propagación vegetativa que ha recibido mayor interés y difusión es el cultivo de tejidos (Zobel y Talbert, 1992)

2.2.2.1. Injertos.

Los injertos son utilizados generalmente para propagar clones que no pueden ser convencionalmente reproducidos por enraizamiento de estacas u otros métodos de reproducción asexual (Rawat *et al*, 1994). La influencia positiva de la injertación es también observada en términos de nutrición y aportes de características de juvenilidad (Franclet, 1979)

y la transferencia de hormonas sintetizadas en las raíces del portainjerto (Greenwood, 1987). El éxito en la formación de la unión permanente entre plantas o partes de plantas depende de la llamada compatibilidad y el contacto entre el cambium u otros tejidos meristemáticos (Garner, 1983).

El injerto es una labor intensiva y algunas veces costosa (Hartney, 1980) en material y tiempo (Rawat *et al*, 1994) por lo que en forestales se utiliza comúnmente para preservar árboles en bancos clonales o establecer huertos semilleros, en los cuales el objetivo es la producción de semilla a gran escala (Zobel y Talbert, 1992). En caoba, por el momento, no se reportan trabajos sobre injertos.

2.2.2.2. Estacas enraizadas

Es el método de propagación vegetativa que actualmente se está desarrollando con mayor rapidez, sin embargo una limitante importante para utilizar estacas enraizadas es su dependencia de la edad. Los árboles jóvenes suelen enraizar con rapidez, pero es casi imposible enraizar los mismos árboles cuando están maduros. Además, la gran variabilidad clonal que existe en la capacidad de enraizamiento no permite obtener más ganancias en las plantaciones comerciales (Zobel y Talvert, 1992).

Existen diferentes factores que pueden influir en la propagación de especies forestales por estacas: las dimensiones de las estacas (Segura *et al*, 1991; Tchoundjeu y Leakey, 1996); la edad (Simons y Skidmore, 1990; Segura *et al*, 1991; Pezeshki y DeLaune, 1994; Poupard *et al*, 1994); la presencia y ausencia de dominancia apical (Poupard *et al*, 1994); la época del año (Millar, 1987); los contenidos hormonales (Wong, 1989; Poupard *et al*, 1994; Tchoundjeu y Leakey, 1996; Mesén *et al*, 1992); la posición del nudo (Leakey, 1983); el área foliar (Tchoundjeu y Leakey, 1996); la orientación de las plantas madres que son fuentes de estacas (posición vertical, inclinadas u horizontal), los regímenes de poda, la aplicación de nutrientes, y el efecto de la luz (Leakey, 1983).

La propagación vegetativa para el establecimiento de plantaciones, requiere del uso de materiales fisiológicamente juveniles, los cuales darán origen a árboles de crecimiento ortotrópico normal, adecuados para la producción de madera. A nivel operacional, normalmente se utilizan estacas originadas de rebrotes de la base del árbol cortado, rebrotes basales de árboles en pie o plántulas jóvenes entre otros. Estas estacas se caracterizan por su tamaño pequeño, condición suculenta y la presencia de hojas (Mesén *et al*, 1992). El avance de la clonación forestal para el establecimiento de plantaciones está demostrado por muchas entidades que la están utilizando; por ejemplo, plantaciones comerciales de *Eucalyptus* en Sur América, Portugal y El Congo (Zobel, 1992).

Un estudio realizado por Ritchie (1991), sobre el uso comercial de estacas enraizadas de coníferas a nivel mundial concluyó que la juvenilidad es la clave para la producción exitosa de estacas enraizadas, sin embargo, desafortunadamente hay poca concordancia en como asignar la juvenilidad.

En caoba, mediante el uso de propagadores de subirrigación y AIB en una concentración de 0.2%, se logró un 50% de enraizamiento de estacas provenientes de tallos ortotrópicos juveniles de plántulas (Mesén *et al*, 1992). Este sistema demuestra la capacidad de producción de plantas clonadas a partir de material juvenil de caoba, lo que permitiría la propagación vegetativa a partir de semilla mejorado obtenida a través del programa de mejoramiento forestal.

Los problemas biológicos encontrados en la propagación vegetativa de árboles podrían ser solventados muy pronto debido al énfasis dado a los métodos de micropropagación y a la biotecnología (Zobel, 1992).

2.3. Propagación *in vitro* de árboles forestales

La propagación *in vitro* permite la regeneración de plantas a partir del uso de callos, órganos, embriones, cultivo de células y protoplastos. En el cultivo de ápices se espera lograr la formación de ramas axilares que pueden separarse y enraizarse; teóricamente los brotes

axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se sub-cultive cada brote recién formado o cada explante de nudo, por lo tanto, este método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal (Krikorian, 1991). Esta técnica se ha utilizado para la propagación clonal de árboles élitos de *Commiphora wightii* (Barve y Mehta, 1993) y de *Tecomella undulata*, árbol de zonas áridas, (Bhansali, 1993) entre otros.

El microinjerto es una técnica que permite al explante sortear diferentes dificultades como la oxidación y la reversión al estado juvenil (Mosella y Ascuí, 1991); fue Navarro y colaboradores, quienes mostraron la posibilidad del microinjerto *in vitro* de ápices en plantas provenientes de semilla en cítricos (Navarro *et al*, 1975). Esta técnica es usada para el rejuvenecer material vegetativo y facilitar su micropropagación. Se ha utilizado en especies leñosas como *Theobroma cacao* (Aguilar *et al*, 1992) y en forestales se ha realizado en *Sequoia sempervirens* (Huang *et al*, 1992), *Acacia mangium* (Monteuuis, 1995a), *Pseudotsuga menziesii* (Monteuuis, 1995b) y en el rejuvenecimiento de clones maduros de *Hevea brasiliensis* (Perrin *et al*, 1994).

Existen dos vías de regeneración, la organogénesis y la embriogénesis somática. La organogénesis es la diferenciación de microbrotes y raíces (Ahuja, 1993) y la embriogénesis somática es el desarrollo de embriones de tejido somático (Sutton *et al*, 1993). Estos métodos son la base actual para la propagación comercial de plantas, lo cual involucra miles de laboratorios alrededor del mundo que trabaja con plantas ornamentales y de especies cultivadas, ya que permite una rápida multiplicación para alcanzar las demandas del mercado, y en algunos casos, para vencer las dificultades de métodos alternativos como es la propagación por estacas enraizadas (Haines, 1994). La especie, la edad del árbol, y en particular la parte del árbol del cual se toman los explantes son las que determinan el éxito o fracaso (Mott, 1981). En general los explantes juveniles como embriones zigóticos, cotiledones, hipocotilos o yemas de plántulas y hojas juveniles tienen mejor respuesta al cultivo *in vitro* que otros tejidos de árboles adultos. Por esta razón, los explantes juveniles han sido exitosamente empleados para la clonación forestal (Ahuja, 1993).

A largo plazo, la producción en masa de clones forestales seleccionados probablemente se realizará *in vitro*, sin embargo, pocas especies se han investigado al grado de que pueden ser producidas comercialmente (Leakey, 1987).

El principal objetivo de la micropropagación de especies forestales es la producción de un gran número de individuos genéticamente idénticos (Cheliak y Rogers, 1990) pertenecientes a familias superiores (Mohammed y Patel, 1989).

2.3.1. Escisión de embriones

En las especies leñosas es muy difícil introducir material adulto *in vitro*, por lo que se utilizan embriones zigóticos para su cultivo. Esta técnica se emplea también en caso de especies que producen semillas abortivas (Bonga y Von Aderkas, 1992), cuando la producción de semillas es esporádica, y en especies de semillas recalcitrantes que no se pueden almacenar y la técnica de propagación vegetativa no ha sido ampliamente adoptada (Scott *et al*, 1995). Ejemplos de especies forestales propagadas por medio de la escisión de embriones son *Fraxinus excelsior* (Hammant y Ridout, 1992); *Pinus contorta* (Flygh *et al*, 1993); *Hopea odorata* (Scott *et al*, 1995); *Abies fraseri* (Saravitz y Blazich, 1991); *Liriodendron tulipifera* (Merkle *et al*, 1993); *Aesculus hippocastanum* (Bonga y Von Aderkas, 1992); *Junglas regia* (Leslie y McGranahan, 1992) y *Quercus acutissima* Carruth (Shoyama *et al*, 1992).

En el cultivo *in vitro* de semillas forestales, se hace necesario la desinfección de las mismas para lo cual se utilizan diferentes productos como el hipoclorito de sodio y de calcio, el etanol al 70%, el peróxido de hidrógeno y el bicloruro de mercurio (Mohammed y Patel, 1989; Saravitz y Blazich, 1991; Hammatt y Ridout, 1992; Flygh *et al*, 1993 y Scott *et al*, 1995).

En algunas especies es necesario realizar tratamientos previos de inmersión de las semillas en agua destilada estéril por períodos de 2 a 7 días a temperaturas de 4°C en la

oscuridad para proceder a la extracción del embrión (Hammatt y Ridout, 1992; Flygh *et al*, 1993).

Para la germinación de embriones se han utilizado medios simples como el medio Murashige y Skoog con sales reducidas a la mitad y normalmente libres de reguladores de crecimiento (Hammatt y Ridout, 1992).

Las temperaturas para la germinación *in vitro* van desde 20 a 30°C, pero por lo general el promedio utilizado es de 25°C bajo condiciones iniciales de oscuridad, para continuar con fotoperíodos de 16 horas luz (Mohammed y Patel, 1989; Saravitz y Blazich, 1991; Hammatt y Ridout, 1992 y Scott *et al*, 1995).

2.3.2. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática se usa en horticultura y agricultura como una forma rápida de multiplicar variedades élites o clones de plantas (Sutton *et al*, 1993). Ha sido poco desarrollada en árboles, pero cada vez es más común. Embriones somáticos pueden ser formados directamente sobre la superficie del explante o indirectamente a partir de callos subcultivados, o bien, a partir de masas celulares compuestas de pequeños embrioides y de células en suspensión (Bonga y Von Aderkas, 1992).

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con eje radical-apical, y no poseen conexiones vasculares con el tejido maternal (generalmente aislados por una epidermis). La embriogénesis somática y zigótica presentan procesos ontogénicos idénticos o muy similares desde el estado globular hasta la conversión en plantas completas (Williams y Maheswaran, 1986). Sin embargo, pueden ocurrir ciertas anormalidades en el desarrollo de los embriones somáticos como es la fusión de los cotiledones o embriones gemelos o no polarizados (redondos), aunque éstos pueden ser capaces de crecer y formar plantas normales (Litz y Jarret, 1991). Lindsey y Topping (1993), consideran que la embriogénesis tiene tres niveles de desarrollo: un nivel de organización celular; un nivel de acumulación de proteínas y un último nivel de expresión genética.

Existen factores que afectan la embriogénesis somática, como el genotipo, el tipo de explante, el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, las condiciones físicas de cultivo entre otros (Litz y Jarret, 1991). La composición del medio de cultivo influye sobre la respuesta embriogénica. En una especie maderable de la India (*Hardwickia binate* Roxs) se produjo callo en presencia de ANA, Kinetina y 2,4-D, sin embargo solo los callos inducidos en presencia de 2,4-D fueron embriogénicos (Das *et al*, 1995). En *Hevea brasiliensis* la capacidad embriogénica del callo aumenta cuando se utiliza una concentración de 4.5 μM de BAP y 3,4-D durante los primeros 20 días de cultivo y ésta es reducida a 0.45 μM durante los siguientes 20 días de la inducción (Hadrami *et al*, 1991). Al estudiar la comparación del uso de medios líquidos con inmersión temporal y los medios gelificados en *Hevea*, Etienne *et al* (1997) demostraron que la regeneración de los embriones somáticos es mejorada en un medio líquido por inmersión temporal. En cacao, la concentración endógena de reguladores de crecimiento, especialmente AIA, podría ser un factor determinante para la expresión de los embriones somáticos por que presentan variaciones muy importantes en su nivel (Alemanno, 1995). La frecuencia en la inducción de callo en mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) varía con el tipo de explante cultivado y el medio de cultivo (Gill *et al*, 1995). El papel osmótico de la fuente de azúcar durante la maduración de los embriones somáticos es reafirmado por Tremblay y Tremblay (1995) en abeto. En general las células de embriones zigóticos están más dispuestas a desarrollar embriones somáticos que las células de otros órganos como yemas, hojas, tallos o raíces (Ahuja, 1993). Ejemplos en este sentido son aportados en diferentes especies de coníferas (Manzanera *et al*, 1993). Se supone que el programa genético que determina el proceso embriogénico en las células de embriones zigóticos maduros e inmaduros, no es del todo reprimido y puede ser reactivado con relativa facilidad. En coníferas, los embriones somáticos han sido principalmente desarrollados de embriones zigóticos, en tanto que en angiospermas también se han obtenido de órganos o tejidos (Ahuja, 1993).

La embriogénesis es generalmente preferida sobre la propagación por brotes axilares u organogénesis cuando uno o pocos genotipos se propagan a gran escala, debido a las ventajas siguientes: 1) la embriogénesis produce más cantidad de propágulos que otros métodos de

propagación. 2) en la embriogénesis, no se requiere la inducción de raíces, como un paso separado, 3) un componente importante de la embriogénesis somática es su habilidad para capturar la ganancia genética en familias seleccionadas de programas de mejoramiento genético dirigidos a la producción, calidad de madera y la resistencia a plagas y enfermedades (Sutton *et al*, 1993). 4) Se espera que en el futuro el encapsulamiento de embrioides podría ser usado como semilla artificial, lo que en gran medida simplificaría la transferencia de los propágulos de cultivo *in vitro* al campo (Bonga y Von Aderkas, 1992). Pero hasta la fecha no se ha desarrollado este sistema, el cual requiere una gran homogeneidad en el desarrollo de los embriones 5), otra ventaja es la posibilidad de desarrollar un protocolo eficiente para la regeneración rápida de plantas que pueda ser usado en experimentos de transformación genética (Nagamani *et al*, 1993)

2.3.3. Cultivo de microestacas

La micropropagación por microestacas consiste en estimular con la ayuda de reguladores de crecimiento, el desarrollo de las yemas axilares, que normalmente están dormantes por la dominancia apical (Bonga y Von Aderkas, 1992). El subcultivo de estos explantes permite la producción de brotes de forma exponencial (Dirr y Heuser, 1987). Además el enraizamiento *in vitro* es más fácil de obtener que en brotes producidos por otras biotécnicas (Durand-Cresswell *et al*, 1982). Sin embargo, la esterilización de los explantes es una de las principales dificultades, especialmente cuando el material es colectado de árboles maduros del bosque (Meier-Dinkel, 1992).

En algunas especies leñosas tropicales como *Hevea brasiliensis* y *Theobroma cacao* se han estudiado diferentes factores que pueden influir en la micropropagación por microestacas, como el estado morfogénico de las ramas de las cuales se toman los explantes y la posición del nudo axilar sobre ésta (Lardet *et al*, en prensa). Además en cacao se ha estudiado el nudo cotiledonar como fuente de explante y la capacidad de absorción de nutrientes de los explantes en relación a su reactividad *in vitro* (Aguilar, 1996).

La micropropagación por medio de yemas axilares es la técnica más exitosa en la propagación de especies de *Eucalyptus*, ya que en contraste con el cultivo de callos, se obtiene mayor capacidad regenerativa por un período de tiempo más largo (Lakshmi Sita, 1993).

2.3.3.1. Asepsia en el material vegetal y establecimiento del cultivo.

El primer paso en la micropropagación es la obtención de material vegetal adecuado para usarlo como explante, por esta razón los contaminantes, como bacterias y hongos deben ser removidos (Conger, 1981). Sin embargo, en especies leñosas las tasas de contaminación son mayores cuando el material proviene de árboles creciendo en el campo. El grado de contaminación también está determinado por las condiciones climáticas de la región; es más difícil obtener explantes limpios de plantas del trópico húmedo que de las regiones frías o secas (Bonga y Von Aderkas, 1992). En muchos casos, bacterias y hongos pueden permanecer latentes dentro de las plantas (Hayward, 1974 y Verhoeff, 1974) debido a su habilidad para formar esporas dormantes (Leifert *et al*, 1991), ante esta situación, se han realizado algunas prácticas para reducir la actividad de contaminantes internos, como son las aplicaciones de antibióticos antes de la extracción de los explantes (Mondal *et al*, 1990) los cuales tienen diferentes modos de acción (Holland y Polacco, 1994). Sin embargo, no es probable su eliminación total con el uso de antibióticos, al contrario, podría llevar al desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos (Leifert *et al*, 1991).

En forestales se realizan tratamientos de las plantas en el invernadero con insecticidas, fungicidas y antibióticos previo a la corta y desinfección de los explantes (Durand-Creswell *et al*, 1982).

Diferentes agentes y formas de aplicación son utilizados para la desinfección superficial de los explantes (Bonga y Von Aderkas, 1992). Plántulas de invernadero de *Shorea roxburghii* fueron esterilizadas con alcohol al 70% por 30 segundos y HgCl₂ al 0.2% durante 8 minutos (Vaario *et al*, 1995). Un pretratamiento de 40°C fue aplicado por varios días a explantes de *Platanus acerifolia* antes de la desinfección superficial (Gjuleva y Atanasov,

1994). En *Eucalyptus* las tasas de infección se han reducido mediante la fumigación de las ramas con Benlate (1 g/l) y Streptomicina (0.1 g/l) antes de la extracción de los explantes (Ikemory, 1987).

Una vez lograda la asepsia de explantes nodales, el establecimiento del cultivo primario depende de la reactividad de la yema axilar a desarrollarse y del ambiente químico y físico del cultivo *in vitro*. Segmentos nodales de plantas de campo, de plántulas de invernadero y de embriones germinados *in vitro*, son colocados sobre medios que estimulen la emergencia de las yemas axilares. Para la propagación clonal de *Frazimus angustifolia* por medio de segmentos nodales de explantes juveniles y adultos, se evaluaron diferentes medios de cultivo. Se observó que tanto explantes juveniles como adultos responden mejor en un medio basal QL suplementado con 8.9 μM de BAP y 0.49 μM de IBA (Perez-Parron *et al*, 1994). En segmentos nodales de *Shorea roxburghii* cultivados en un medio basal B5 suplementado con 1 mg/l de BAP y 0.02 de IBA la brotación de yemas axilares fue exitosa (Vaario *et al*, 1995).

2.3.3.2. Fase de multiplicación

Los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir otros brotes mediante la repetición de ciclos de cultivo o bien mediante la inducción de brotes de *novu* u organogénesis. La multiplicación clonal ha sido aplicada a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas (Krikorian, 1991).

Durante la fase de multiplicación de brotes, las citocininas son los reguladores de crecimiento más utilizados. En *Eucalyptus*, la reducción de la concentración de BAP de 1 a 0.1 mg/l, redujo la tasa de multiplicación en beneficio de la estabilidad fisiológica del explante para posteriores subcultivos (Durand-Creswell *et al*, 1982). En teca, segmentos nodales producen de 1 a 2 brotes utilizando el medio MS suplementado con kinetina y BAP a concentraciones de 0.15 mg/l de cada uno. El número de brotes es aumentado por subcultivos regulares a intervalos de 20 días (Mascarenhas *et al*, 1992).

Además de la influencia de las citocininas existen otros factores que afectan la multiplicación *in vitro*. La posición del explante sobre la superficie del medio de cultivo constituye otro factor. En *Frazinus angustifolia* un número mayor de brotes fue obtenido cuando los explantes se colocaron en posición horizontal sobre el medio de cultivo (Pérez-Parron *et al*, 1994). En *Tsuga heterophylla*, una concentración de 2% de sacarosa fue superior a concentraciones de 1%, 3% y 4%, ya que aumenta el vigor y la tasa de producción de brotes. También se observó que las bajas concentraciones de agar (0.6%) favorecen el desarrollo en longitud de brotes, pero muchos de ellos son hiperhidricos, lo cual no permite la manipulación para los siguientes pasos de la micropropagación (Harry *et al*, 1994).

Frente al fracaso de varias técnicas de cultivo en medio líquido, se desarrolló un nuevo concepto para la multiplicación de plantas utilizando medios líquidos con el sistema de inmersión temporal. Este método combina la aireación del tejido y su contacto limitado con el medio líquido de tal manera que se obtienen buenos resultados cuando se hace una combinación adecuada entre el tiempo de inmersión y su frecuencia. Este método ha sido probado con mucho éxito en la multiplicación de banano (Alvard *et al*, 1993), de café a partir de microestacas (Teisson y Alvard, 1995) y por embriogénesis somática (Etienne *et al*, 1997b) como también en *Hevea brasiliensis* (Etienne *et al*, 1997a).

2.3.3.3. Fase de enraizamiento y aclimatación

2.3.3.3.1. Enraizamiento *in vitro*

La fase de enraizamiento tiene como objetivo producir una planta que pueda sobrevivir a las condiciones del trasplante (Krikorian, 1991). El enraizamiento de brotes es con frecuencia inducido *in vitro*, y tiene la ventaja de obtener plantulas asépticas con mayor probabilidad de sobrevivir al ambiente *ex vitro*. Sin embargo, es una labor más intensa que la realizada durante el enraizamiento *ex vitro* (Bonga y Von Aderkas, 1992).

Existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento *in vitro*. El estrés hídrico, la alta temperatura, la oxigenación, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado son factores físicos que estimulan el enraizamiento. La influencia positiva del carbón

activado en el enraizamiento de microestacas, puede ser interpretada por su efecto en la reducción de la luz en la base de los brotes, promoviendo en un sentido la acumulación de auxinas o cofactores fotosensitivos y en otro sentido la absorción de productos tóxicos (polifenoles) y de inhibidores de formación de raíces adventicias. Sin embargo, hay que considerar que el potencial del carbón activado como inductor de enraizamiento está asociado con la madurez del explante. En brotes micropropagados de *Pinus pinaster*, el potencial de producción de raíces adventicias fue mejorado en relación al porcentaje de enraizamiento y longitud de las raíces cuando se adicionó 20 g de carbón al medio (Dumas y Monteuis, 1995).

Un ambiente químico favorable al desarrollo de raíces puede lograrse mediante la reducción en la concentración de sales minerales del medio de cultivo, o bien, mediante el incremento de ciertos elementos menores (Br, Ca y Mn) o por la adición de algunos fenoles y vitamina D (Gaspar y Coumans, citados por Bonga y Von Aderkas, 1992). En algunos casos es necesario el uso de un medio para el desarrollo del brote antes del enraizamiento, como en *Commiphora wightii* (Barve y Mehta, 1993). Así mismo, se requiere un balance hormonal adecuado dirigido al aumento en auxinas exógenas (Villalobos y Thorpe, 1991). En este sentido diferentes respuestas se han observado. Mientras que para el enraizamiento de *Eucalyptus gunnii*, solo se requiere 1 mg/l de AIB (Durand-Cresswell *et al*, 1982), en *E. camaldulensis* y *E. globulus*, es necesario concentraciones de 10 mg/l de AIA, AIB y ANA para el desarrollo de las raíces (Lakshmi Sita, 1993).

Combinaciones de ANA e IBA son efectivas para el enraizamiento de *Hevea brasiliensis* (Perrin *et al*, 1994) y *Buddleja incana* (Rosero, 1996). En *Shorea roxburghii* es suficiente colocar los explantes en un medio B5 al 50% conteniendo 0.3 mg/l de AIB y 0.3% de ANA para obtener el 50% de enraizamiento (Vaario *et al*, 1995). Recientemente el uso de *Agrobacterium rhizogenesis* ha permitido del 60 al 97% de enraizamiento de explantes de coníferas con recalcitrancia a la formación de raíces (Mihaeljev *et al*, 1996).

2.3.3.3.2. Enraizamiento *ex vitro*

Algunas veces la inducción de raíces es realizada *ex vitro* lo cual reduce los pasos en la micropropagación (Mascarenhas *et al*, 1993). Esto trae como ventajas que el sistema radicular no es afectado durante el trasplante a suelo, las tasas de enraizamiento pueden ser mayores y la calidad de las raíces puede ser superior (Lakshmi Sita, 1993). Por ejemplo, en café las raíces *in vitro* no son funcionales; por lo que se hace una inducción de 12 horas antes del trasplante, 10 días después el 100% de las microestacas forman raíces. Una desventaja del enraizamiento *ex vitro* puede ser la pérdida de material por desecación y marchitez rápida durante el trasplante del medio de cultivo a condiciones de invernadero, a menos que se tomen las medidas de precaución (Donnelly y Tisdal, 1993).

En la propagación a gran escala de especies ornamentales se ha observado que la diferenciación del sistema radical bajo condiciones *in vitro* no es económicamente costeable, por lo que en algunas empresas se ha sustituido esta fase del proceso por el enraizamiento de brotes en cámaras de humidificación (Villalobos y Thorpe, 1991)

Durante el enraizamiento *ex vitro* se usan generalmente sustratos como son la perlita, la vermiculita, la pomes, la arena y el suelo. En diferentes especies de *Eucalyptus* y en *Salvadora persica* se han usado enraizadores comerciales con diferentes sustratos de enraizamiento. En teca, se han usado mezclas de hormonas comerciales en combinación con fungicidas y talcos enraizadores con los cuales se ha obtenido hasta un 60% de enraizamiento (Mascarenhas *et al*, 1993)

2.3.3.3.3. Aclimatación

El mayor porcentaje de pérdidas de plántulas producidas *in vitro*, ocurre en su fase de transferencia al suelo cuando deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente exterior. Casi todo el esfuerzo invertido durante el cultivo de tejidos se perdería si las plantas que se regeneraran de esos tejidos mueren cuando intentan desarrollarse en un ambiente que, inicialmente puede resultar desfavorable (Segovia y Laing, 1991).

La aclimatación es un proceso de adaptación de un organismo a un cambio de ambiente (Brainerd y Fuchigami, 1981). Según Bonga y Von Aderkas (1992), las plantas micropropagadas generalmente son susceptibles al trasplante debido a que en condiciones *in vitro* ellas son mixotróficas en su modo de nutrición, aparentemente alternan entre el uso de carbohidratos y la fijación de CO₂. El uso de carbohidratos es estimulado por la presencia de altas concentraciones de azúcar y de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo y las bajas intensidades de luz durante el periodo de incubación (Donnelly *et al*, 1993). En estas condiciones, el control de la humedad y la necesidad de irrigación es mucho más exigente (Dunstan y Turner, 1984). Cuando un gran número de plántulas es aclimatado, es necesario establecer un buen sistema de nebulización; pero cuando son pequeños grupos, pueden utilizarse los "mini invernaderos", o el uso de bolsas plásticas. En algunos casos se han utilizado antitranspirantes (Bonga y Von Aderkas, 1992), los cuales no han sido exitosos debido a problemas de fitotoxicidad e interferencia con la fotosíntesis (Donnelly *et al*, 1993). También se ha hecho uso de micorrizas para promover el enraizamiento, mientras que algunas especies son fáciles de trasplantar al suelo (Bonga y Von Aderkas, 1992).

En teca, las vitroplantas son trasplantadas a bolsas de polietileno de 5 x 10 conteniendo una mezcla suelo : arena : compost (3 : 3 : 1), manteniendo las bolsas en contenedores plásticos cubiertos con una capa transparente para retener una alta humedad relativa (80 - 90%) (Mascarenhas *et al*, 1993).

En caoba plántulas con una única raíz, fueron trasplantadas cubriéndolas con una estructura transparente, obteniéndose una tasa de sobrevivencia del 20% (Lee y Rao, 1988).

2.3.4. Micropropagación de caoba

Se hacen esfuerzos en propagar especies maderables tropicales de interés mundial como *Khaya ivorensis* A. Chev conocida como caoba Africana (Tchoundjeu y Leakey, 1996) y *Swietenia macrophylla* king o caoba Hondureña (Mesén *et al*, 1992) de las que muy poco se conoce. Maruyama (1989), evaluando diferentes agentes y métodos de desinfección de once especies forestales del Amazonas, entre ellas caoba, obtuvo buenos resultados al desinfectar

segmentos nodales de plantas con Cloruro de Benzalconium al 0.1% por 15 minutos, seguido de etanol al 70% por un minuto y peróxido de hidrógeno al 0.1% por 10 minutos. Lee y Rao (1988), lograron desinfectar explantes de plántulas de caoba de invernadero con hipoclorito de calcio al 10% por 10 minutos.

Segmentos nodales de plántulas de caoba fueron cultivados en el medio MS enriquecido con diferentes concentraciones de BA, Kinetina, AIA e AIB, obteniendo los mejores resultados con BA en concentraciones de 0.1 y 1 mg/l (Lee y Rao, 1988). Las condiciones físicas favorables al establecimiento de estos cultivos han sido entre los 22 y 26°C \pm 2 y fotoperíodos de 16 horas a intensidades de 5000 lux. La producción de brotes múltiples se ha logrado en el medio BTM suplementado con 2 mg/l de BA (Maruyama *et al*, 1989) y en el medio MS reducido a la mitad y enriquecido con BA de 0.1 a 1 mg/l (Lee y Rao, 1988). Sin embargo, utilizando altas concentraciones de IBA (5 a 10 ppm), algunos de los brotes enraizaron a los 40 días después de la inoculación. En cada caso solo una raíz fue producida, con crecimiento horizontal.

En la inducción de brotes por organogénesis, no se encontró una concentración óptima de BA, dado que los brotes formados fueron pocos, aunque en todas las concentraciones evaluadas se observó su formación (Valverde, 1992).

Los resultados publicados a la fecha no incluyen a la embriogénesis somática, por lo que se están realizando esfuerzos en la unidad de Biotecnología del CATIE sobre esta línea. El desarrollo de esta metodología y la producción de células de caoba en suspensión celular sería la vía inmediata para iniciar estudios en transformación genética de esta especie.

2.4. Biotecnología y su aplicación al mejoramiento de especies forestales.

2.4.1. La crioconservación y el almacenamiento *in vitro*.

Esta técnica podría tener alguna aplicación práctica como estrategia complementaria de conservación, pero solo en el caso de poblaciones bien estudiadas y recalcitrantes (Haines, 1994). La crioconservación es aplicable principalmente en los programas de mejoramiento que

se estén implementando, sin embargo, requiere mucho más atención como método para arrestar la fase juvenil y de esta forma poder retener las ganancias genéticas que nos ofrece la silvicultura clonal. Además, con el énfasis continuo en los programas cooperativos de mejoramiento de las especies forestales en los países tropicales, el intercambio internacional de materiales será cada vez más importante, a media que los programas de mejoramiento (Haines, 1994) y de conservación de los recursos fitogenéticos forestales (Behm, 1997) avancen. En este sentido, la tecnología del cultivo *in vitro* podría encontrar aplicaciones (Haines, 1994).

2.4.2. Ingeniería genética.

El éxito de la aplicación de la ingeniería genética involucra muchos elementos: la identificación y clonación de un gen de interés; la adición de secuencias de este gen que promuevan su expresión apropiada; la incorporación de un gen marcador o de selección; la transferencia a un tejido competente para la transformación y regeneración; selección y regeneración de plantas y la confirmación de la expresión apropiada incluyendo pruebas de campo (Haines y Martin, 1995). En la actualidad, se están desarrollando varios proyectos con especies de árboles forestales, en particular dirigidos a la modificación de la biosíntesis de la lignina utilizando la técnica del contrasentido ("antisense"). La transformación de una nueva especie con genes extraños actualmente disponibles que inducen resistencia a insectos o herbicidas dependerá de la capacidad de regeneración de plantas completas a partir de las células transformadas (Haines, 1994).

2.4.3. Fusión de protoplastos.

Los protoplastos son adecuados para diferentes manipulaciones genéticas que no serían posibles con plantas o células intactas debido a que son componentes vivos de las células vegetales que están rodeados sólo por la membrana plasmática (Szabados, 1991) y los híbridos de especies forestales con incompatibilidad sexual podrían ser de gran importancia en las plantaciones de especies industriales (Haines y Martin, 1995). Los trabajos de investigación han permitido regenerar plantas a partir de protoplastos provenientes de suspensiones celulares en *Populus simonii* (Wang *et al*, 1995) y *Larix decidua* (Korlach y Zoglauer, 1995) y del xilema en *Pinus banksiana* y *Pinus strobus* (Leinhos y Savidge, 1993).

2.4.4. Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares tienen aplicaciones importantes en la investigación relacionada con los programas avanzados de mejoramiento de las especies industriales, para el mantenimiento de estructuras de poblaciones y donde además puedan aplicarse las técnicas de silvicultura clonal (Haines, 1994). Trabajos desarrollados por Chen y Filippis (1996) en varias especies forestales demostraron que la tecnología RAPD es una técnica rápida, precisa, sensitiva y relativamente barata para el análisis genómico de especies forestales. En Meliáceas, se están realizando algunos estudios en poblaciones naturales, con el objetivo de caracterizar la diversidad genética (Patiño, 1997). En la actualidad el CATIE está iniciando estudios en el área mesoamericana sobre la variabilidad genética de caoba. Estos estudios se basan en estimar la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del ensayo

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología del CATIE en Turrialba, Costa Rica, entre mayo de 1996 y octubre de 1997.

3.2. Material de semilla

Se utilizó plántulas de caoba (*Swietenia macrophylla* King) de tres semanas de edad, provenientes de semilla certificada del Banco Latinoamericano de Semilla Forestal ubicado en el CATIE. Las semillas se escarificaron manualmente y luego se realizó una desinfección con Clorox comercial (Hipoclorito de sodio al 5.25%) al 50% v/v durante 15 minutos en agitación constante. Posteriormente se hizo un lavado bajo condiciones asépticas con cuatro enjuagues en agua bidestilada estéril. Las semillas se cultivaron *in vitro* en tubos de vidrio de 25 x 150 mm que contenían un medio constituido de agua bidestilada, 3% de sacarosa, 0.65% de agar y libre de reguladores del crecimiento. El pH fue ajustado a 5.7. Los cultivos se colocaron en cuartos de crecimiento en la oscuridad a una temperatura de 30°C.

3.3. Condiciones físicas de cultivo

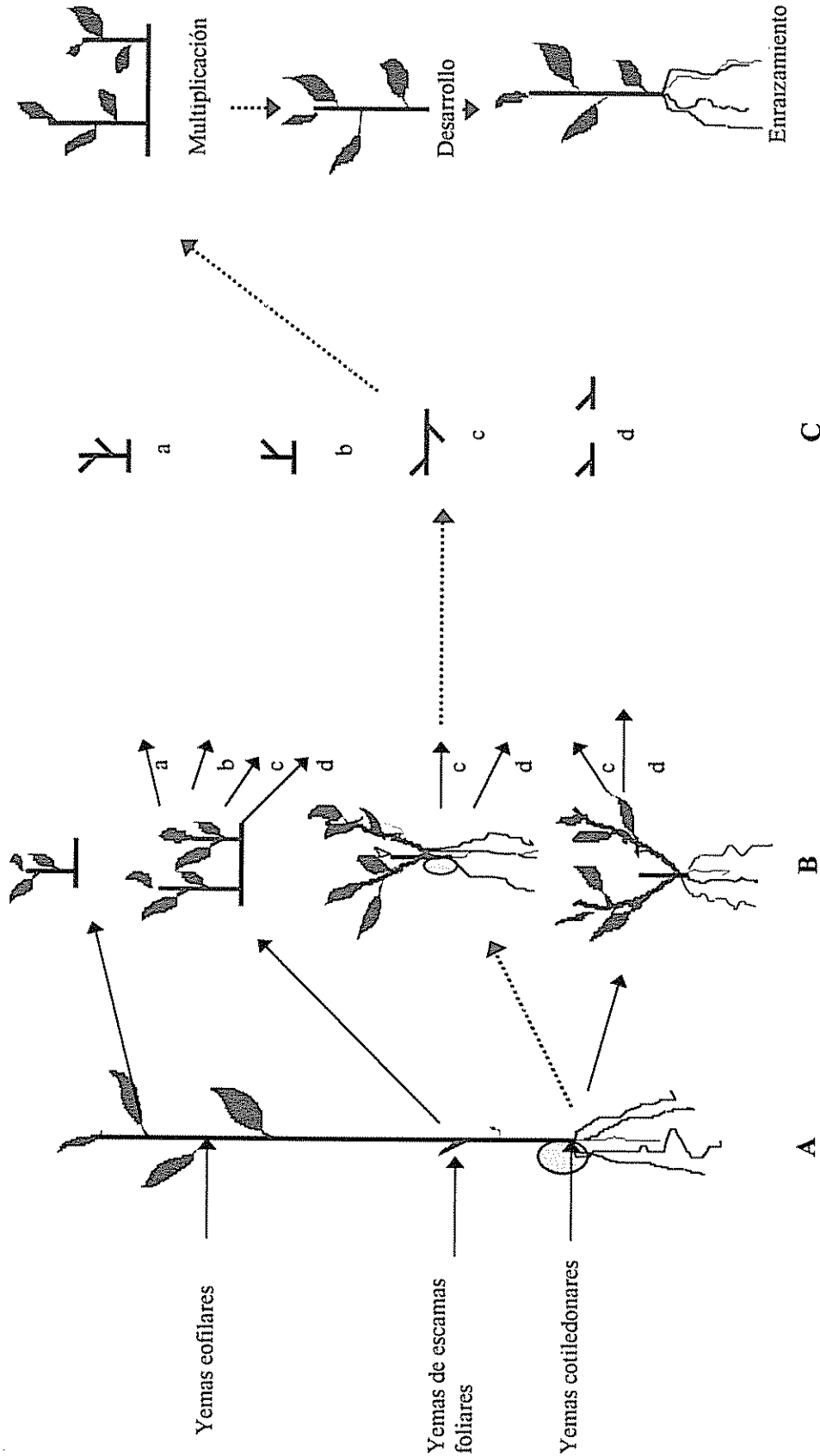
Todos los cultivos se colocaron en cuartos de crecimiento bajo un fotoperíodo de 12 horas, con intensidades lumínicas de 2000 lux. La temperatura diurna fue de $29 \pm 2^\circ\text{C}$ y la humedad relativa de $70 \pm 3\%$. Por la noche la temperatura descendió a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y la humedad relativa aumentó a $85 \pm 3\%$.

3.4. Cultivo de microestacas de caoba

El procedimiento utilizado para el cultivo de microestacas de caoba a partir de plántulas germinadas *in vitro* se presenta en la figura 1.

3.5. Fase de iniciación.

La micropropagación de caoba a partir de plántulas provenientes de semilla germinada *in vitro* se inició a partir de la determinación de la fuente adecuada de explantes y su forma de cultivo.



A. Fuente inicial de explantes B. Diferentes tipos de explantes (Explante primario). Fase de iniciación C. Diferentes formas de cultivo. (Explante secundario). Fase de iniciación

Figura 1. Procedimiento utilizado para seleccionar la fuente de explante primario y la forma de cultivo del explante secundario para la micropropagación de Caoba (*Svietenia macrophylla*. King) a partir de plántulas *in vitro* provenientes de semilla. (.....➤ Ruta seguida en la multiplicación de caoba *in vitro*).

3.5.1. Selección de la fuente de explante (explante primario)

Durante esta fase se trató de seleccionar la fuente de explante primario, para lo cual se utilizó plántulas de 3 semanas de edad. Se evaluó tres tipos de yemas de diferente origen y posición en la plántula (Fig. 1A y B).

3.5.1.1. Yemas eofilares.

Las eofilas son las primeras hojas simples desarrolladas en plántulas de *Meliaceae*, las cuales son verdes con lámina foliar expandida (Duke, 1969). Por lo tanto este explante consistió de secciones de epicotilo de 2 cm de longitud que contienen las yemas axilares en posición 1 y 2 con respecto al ápice. Estos explantes se colocaron en posición horizontal sobre la superficie del medio de cultivo.

3.5.1.2. Yemas de escamas foliares.

Las escamas foliares son hojas rudimentarias que protegen la yema existente en la axila que ésta forma con el eje embrionario de las plántulas de caoba (Alvarenga y Flores, 1988). Por lo que un segundo explante fue constituido por secciones del epicotilo de 2 a 2.5 cm de longitud y que contienen el nudo de la escama foliar.

3.5.1.3. Yemas del nudo cotiledonar

Las plántulas completas se podaron en el eje del epicotilo a una altura de 1 cm del nudo cotiledonar y a nivel de las raíces. Estos explantes se cultivaron, en ausencia y presencia de los cotiledones y se inocularon en posición vertical en el medio de cultivo.

3.5.1.3.1. Edad de la plántula para la obtención de brotes cotiledonares

Se evaluó la edad en días para podar el eje epicotilar de la plántula para la producción de brotes del nudo cotiledonar. Por lo que a plántulas de 14, 28 y 42 días después de la siembra de la semilla *in vitro* se les eliminó el eje principal a 1 cm de la base de los cotiledones, con el fin de evaluar la capacidad de brotación.

3.5.1.3.2. Cultivos sucesivos del explante primario (Explante de nudo cotiledonar).

Una vez seleccionado el explante de nudo cotiledonar con cotiledones como, fuente primaria de explantes, se realizaron cuatro subcultivos del mismo explante para determinar la capacidad de producción de brotes. Se utilizó el medio de cultivo de la fase de inducción.

3.5.2. Forma de cultivo del explante (explante secundario).

El explante secundario corresponde al explante que se utilizará en la fase de multiplicación. Los brotes obtenidos de los diferentes explantes mencionados anteriormente (Fig. 1B) se cultivaron según el esquema observado en la figura 1C y el procedimiento descrito a continuación:

3.5.2.1. Brotes conteniendo una sección del explante inicial

Brotes provenientes de yemas de escamas foliares de 1.5 a 2.5 cm de longitud, podados en el ápice, con una y dos yemas axilares y una sección de 1 cm del explante original se cultivaron en posición vertical sobre el medio de cultivo (Fig. 1Ca y 1Cb).

3.5.2.2. Brotes aislados

Brotes de yemas de escamas foliares y cotiledonares con 2 nudos y una altura promedio de 1.5 a 2.5 cm se aislaron desde el punto de inserción con el explante primario, se podó el ápice y se sembraron sobre la superficie del medio de cultivo en posición horizontal (Fig. 1Cc).

3.5.2.3. Brotes primarios seccionados en microestacas

Los brotes de yemas de escamas foliares tanto del eje epicotilar principal y del nudo cotiledonar se dividieron en pequeñas microestacas de 1 cm con una yema axilar y se inocularon directamente en el medio de cultivo en posición horizontal (Fig. 1Cd).

El medio de cultivo básico utilizado para esta fase de estudio consistió en las sales minerales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementadas con sacarosa al 3% y

2.46 μM de 2-ip (6- γ,γ -dimethylamino purina). Como gelificante se utilizó agar (Difco Bacto Agar) al 0.65%, aunque también se evaluó la agarosa (Sigma Type II: Medium EEO) y el gelrite (Kelco, Division of Merk) en concentraciones de 0.65% y 0.2% respectivamente. El pH se ajustó a 5.7. Veinticinco mililitros de este medio se colocaron en frascos "Gerber" de 50 x 90 mm cerrados con tapas plásticas "Magenta". Todos los suplementos se adicionaron al medio antes de ser esterilizado en autoclave a 121°C y 1.2 bares de presión por un período de 20 minutos.

3.6. Fase de multiplicación

Esta fase consistió en determinar la capacidad de producción de brotes del explante secundario (yemas de la escama foliar aisladas de brotes del nudo cotiledonar en presencia de los cotiledones). Para ello se evaluó dos sistemas de cultivo mediante el uso de medios sólidos y líquidos bajo el sistema de inmersión temporal (RITA®; CIRAD, Francia).

3.6.1. Cultivos en medios semi-sólidos

Con el fin de evaluar las respuestas de tres citocininas diferentes en medios semi-sólidos, se utilizaron la BAP o 6 benzylamino purina (2.2, 4.5, 6.5 y 9 μM), la Kinetina (2.2 μM) y la 2-ip (2.2 μM) y sus combinaciones (Apéndice 1), para lo cual se utilizó las sales MS, con 3% de sacarosa, 0.65% de agar y un pH ajustado a 5.7.

3.6.2. Cultivos en medios líquidos, en inmersión temporal

Se inoculó los explantes en los recipientes RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado) desarrollados por el CIRAD, Francia (Teisson y Alvard, 1995). Estos recipientes contenían 200 ml de medio de cultivo. La inmersión de los explantes en el medio se realizó a diferentes tiempos (minutos) y frecuencias (días), (Apéndice 2). Para evaluar los mejores tiempos y frecuencias de inmersión, se utilizó dos de los mejores medios obtenidos durante la fase multiplicación en medio de cultivo sólido (Apéndice 3).

El sistema RITA® es un recipiente especialmente diseñado para el cultivo *in vitro* de plantas usando la inmersión temporal (Apéndice 4). Los explantes son colocados en la parte

superior del recipiente y el medio de cultivo en la parte inferior. Un flujo de aire con una presión menor de 0.2 bares entra a través de un filtro de 0.2μ el cual es conectado a un tubo central creando una presión en el medio de cultivo en la parte inferior del recipiente. Esta presión permite que el medio pueda ascender hacia la parte superior del recipiente a través de los orificios de la placa y la malla que contiene los explantes. Estos son inmersos en el medio de cultivo durante el tiempo en que la presión es programada. Una vez que la presión se elimina, el medio de cultivo retorna por gravedad a la parte inferior del recipiente (Teisson y Alvard, 1995).

3.7. Fase de desarrollo

Para favorecer el desarrollo de los brotes antes del enraizamiento, se utilizaron diferentes medios de cultivo. Se evaluó el medio MS enriquecido con $1.11\mu\text{M}$ de BAP, $1.16\mu\text{M}$ de kinetina, $29.65\mu\text{M}$ de tiamina HCl, 4% de sacarosa y 0.8% de agar (MD1). Además, se utilizó el mismo medio, suplementado con las vitaminas de Morel, $1.33\mu\text{M}$ de BAP, $2.89\mu\text{M}$ de AG_3 , 4% de sacarosa y gelrite al 0.2 % (MD2). También se utilizó el medio Wood Plant Medium (WPM, Llod y McCown, 1980) en presencia de 0.5 % de carbón activado, 0.8% de agar y 2% de sacarosa (MD3); y este mismo medios enriquecido con $1.33\mu\text{M}$ de BAP, $2.89\mu\text{M}$ de AG_3 , 4 % de sacarosa y 0.2% de gelrite (MD4). En todos los medios el pH se ajustó a 5.6 antes de esterilizarlos (Apéndice 5).

3.8. Fase de enraizamiento

El enraizamiento *in vitro* fue evaluado utilizando brotes con una altura de 3 cm y en tres etapas diferentes: inducción, expresión y desarrollo de las raíces (Apéndice 6).

3.8.1. Inducción de raíces

La inducción de las raíces se realizó mediante la inmersión de la base del brote (0.3 cm) en una solución con una fuerte concentración de auxina por un período de tiempo relativamente corto y en la oscuridad. De esta manera, el primer tratamiento consistió de una modificación de la técnica empleada en plantas micropropagadas de café (Berthouly *et al*, 1987). La solución se consistió de un medio MS al 50%, vitaminas de Morel al 40%, $422\mu\text{M}$

de AIB, 123 μM de ANA y 23.23 μM de Kinetina. Se utilizó sacarosa al 1.5% y el pH se ajustó a 5.6. Este tratamiento se utilizó durante 16 horas en la oscuridad.

El segundo tratamiento consistió de una solución de agua bidestilada, AIB y ANA en concentraciones de 24.60 y 26.85 μM respectivamente. El pH se ajustó a 5.7 y la inducción se realizó durante 72 horas en la oscuridad (Perrin *et al*, 1994).

3.8.2. Expresión de raíces

Después del tratamiento de inducción, los brotes se subcultivaron en dos medios de expresión de raíces. El primero fue el MS al 50% suplementado con tiamina HCl (29.65 μM), AIB (2.46 μM), ANA (1.34 μM), sacarosa al 4%, gelrite al 0.2% y un pH de 5.7. El otro tratamiento consistió en el medio de expresión utilizado para *Hevea brasiliensis* (Perrin *et al*, 1994), el cual contiene 9 μM de KNO_3 , 2.5 μM de NH_4NO_3 , 2.5 μM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.7 μM de MgSO_4 y 1 μM de CaCl_2 , además de los microelementos del medio MH (Carron y Enjalric, 1985). Se utilizó sacarosa al 8%, agar al 0.9% y un pH de 5.8. En ambos medios el tiempo de cultivo fue de 10 días.

3.8.3. Desarrollo de raíces

Para el desarrollo de raíces, los brotes se inocularon en un medio WPM al 50%, sacarosa al 2%, carbón activado al 0.5%, agar al 0.8% y el pH se ajustó a 5.7. El tiempo de cultivo fue de 30 días. Para el cultivo de todas las fases se utilizó tubos de 25 x 150 mm, que contenían 15 ml de medio de cultivo.

3.9. Fase de aclimatación

Para la aclimatación de las vitroplantas se procedió en el laboratorio a eliminar las tapas de los tubos de cultivo utilizados durante el desarrollo de las raíces. Se colocó 2 ml de agua destilada estéril dentro del tubo y las vitroplantas permanecieron bajo las mismas condiciones de enraizamiento por un período de 72 horas. Luego se aislaron las vitroplantas de los tubos y se colocaron en vasos de polietileno que contenían arena estéril. Finalmente, las

plantas se transfirieron al invernadero bajo una cámara plástica para mantener una humedad relativa cercana al 100% por un período de 10 días.

3.10. Estudio histológico

Para este estudio se realizaron secciones transversales y longitudinales de los diferentes tratamientos. De esta manera se colectaron muestras de epicotilo, yemas cotiledonares, cotiledones y yemas de escama foliares del eje embrionario. Así mismo, se tomaron yemas de escama foliar y eofilares provenientes de brotes cotiledonares desarrollados *in vitro*. Finalmente, se hicieron muestreos de yemas cotiledonares a los 0, 3 y 6 días después de la eliminación del eje embrionario, lo que permitió establecer una cinética del cultivo. Estas muestras fueron fijadas en una solución de (Etanol al 95%, agua destilada, formalina y ácido acético; en relación 10:7:2:1, respectivamente). Seguido de una deshidratación en una serie ascendente (50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%) de alcohol butílico terciario (T.B.A). Finalmente las muestras se colocaron en moldes para la infiltración con historesina (Apéndice 8).

Se realizaron cortes a 4 μm de grosor, utilizando para ello un micrótomo de rotación. Los cortes fueron fijados a la lámina y luego se realizó la tinción. La interpretación y toma de fotografías se llevo a cabo con un microscopio Nikon microphot-FX.

3.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió principalmente en un análisis de varianza, comparación de medias por el criterio HSD de Tukey, Duncan y Bonferroni. Se utilizó el procedimiento GLM de SAS para analizar los datos. Las especificaciones de los diferentes análisis utilizados en los ensayos y los valores de significancia más relevantes se presentan en el apéndice 9. Las variables analizadas durante la experimentación son las siguientes:

Tiempo de brotación (días).

Se consideró como brote emergido cuando éste tenía una altura mínima de 0.5 cm. El tiempo de brotación fue considerado como el número de días a partir de la inoculación en que el 50% de los brotes de la unidad experimental alcanzó al menos 0.5 cm de altura.

Porcentaje de brotación (%).

Este valor fue obtenido según el número de explantes dentro de la unidad experimental (frasco) que producían al menos un brote, al final de cuatro semanas de cultivo, en relación al total de explantes, multiplicado por 100.

Número promedio de brotes por explante.

A cada explante brotado se le contabilizó el número de brotes mayores de 0.5 cm de altura, obteniendo un promedio para cada unidad experimental.

Altura de brotes (cm).

Se midió la altura en centímetros de los brotes desde la inserción del brote en el explante hasta su extremo apical.

Índice de la Capacidad de Alargamiento del Brote (CAB).

Este índice se evaluó en la fase de iniciación. Se utilizó el número de brotes mayores de 1.5 cm multiplicado por el porcentaje de explantes que formaron brotes dividido entre 100.

Porcentaje de sobrevivencia (enraizamiento y aclimatación).

Esta variable fue medida mediante la relación entre los brotes o vitroplantas muertas y el número total de cada tratamiento al inicio del ensayo, multiplicado por 100

Porcentaje de enraizamiento.

Para la evaluación de esta variable se relacionó el número de brotes que al menos formaron una raíz de 0.5 cm, con el número total de brotes del tratamiento.

Número promedio de raíces por vitroplanta.

Se evaluó el número de raíces formadas en cada brote enraizado, y para el análisis estadístico se transformaron los datos con procedimientos de SAS.

Longitud de raíces (cm).

La longitud de las raíces en centímetros se midió desde la unión de la raíz con la base del brote hasta su extremo apical.

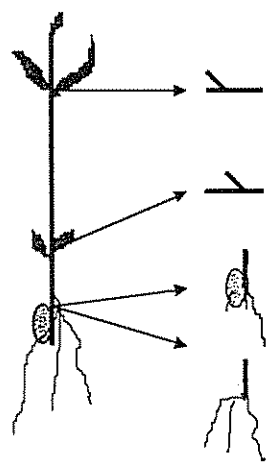
4. RESULTADOS

4.1. Fase de iniciación.

4.1.1. Selección de la fuente de explante (explante primario).

El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos realizados para seleccionar el explante primario para el cultivo de microestacas de caoba (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentajes de brotación (%), días a brotación, número promedio de brotes por explante, altura de brotes (cm) e índice de Capacidad de Alargamiento del Brote (CAB) en la selección de la fuente de explante primario para el cultivo de microestacas de caoba a partir de plántulas germinadas *in vitro*.



Tratamientos	Brotación (%)	Días a brotación	Nº brotes/ explante	Altura de brotes (cm)	CAB
Yemas eofilares	77 _b	11 _a	1 _c	0.7 _d	1
Yemas de escamas foliares	93 _{ab}	10 _a	1 _c	2.0 _c	17
Yemas cotiledonares con cotiledones	100 _a	8 _b	1.4 _b	8.5 _a	42
Yemas cotiledonares sin cotiledones	97 _a	9 _b	1.8 _a	3.7 _b	38

* significancia del 5%

Los explantes del nudo cotiledonar cultivados con o sin cotiledones no muestran diferencias significativas entre sí con respecto al tiempo y porcentaje de brotación. Sin embargo, ambas respuestas son diferentes a las observadas en los explantes de yemas de escamas foliares y eofilares (Fig. 2A y 2B). Las yemas del nudo cotiledonar en presencia de cotiledones muestran un 23% más de brotación que los explantes de la eofila, los cuales presentan el valor más bajo (77%). El número promedio de brotes por explante es significativamente mayor en explantes de nudo cotiledonar (Fig. 2C). Esto se puede explicar mediante el estudio histológico de las diferentes fuentes de explante del eje embrionario. Los explantes eofilares y de escama foliar solo presentan una yema; y su estado de desarrollo depende de su proximidad al ápice del eje embrionario (Fig. 2D). Así mismo, la yema de la

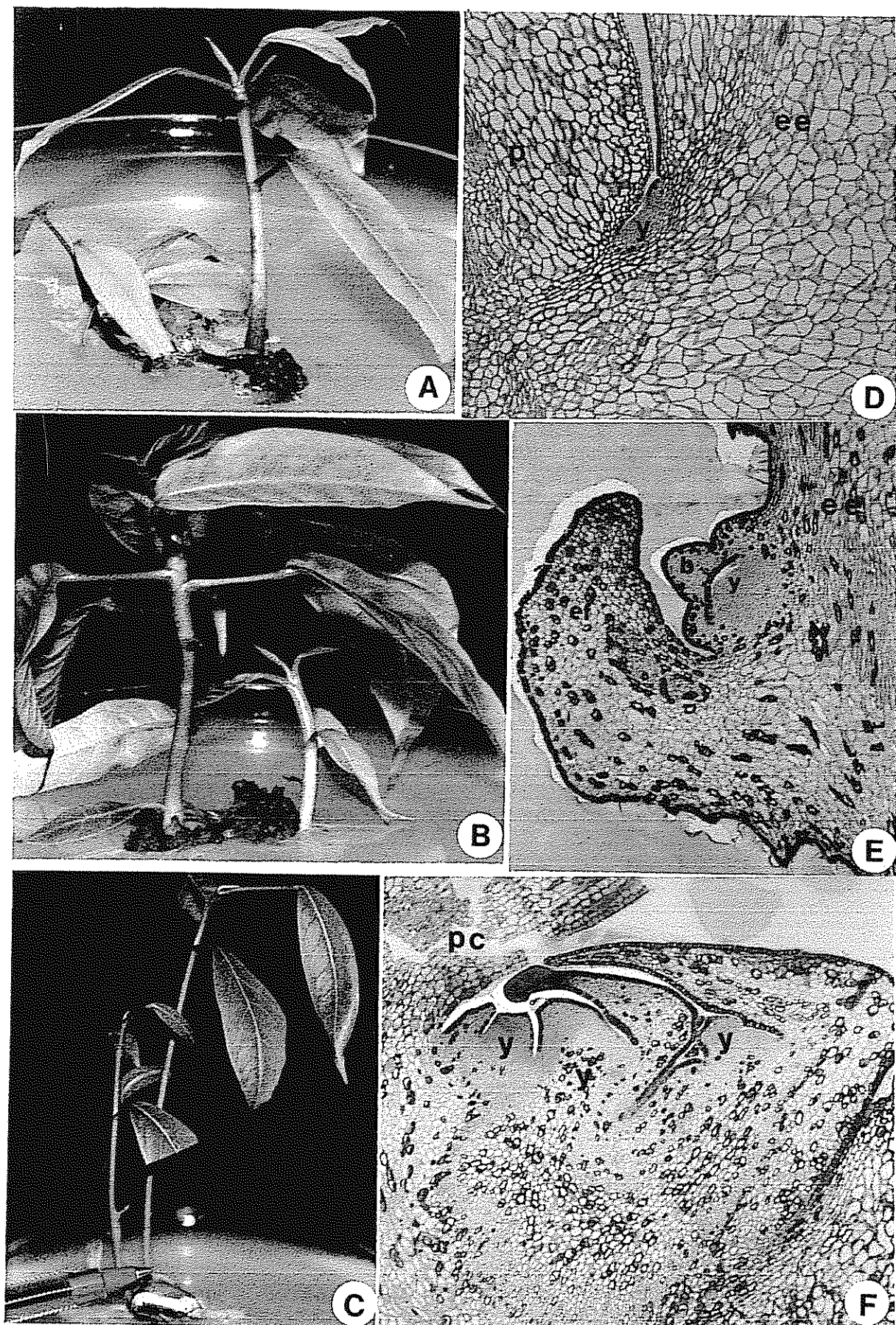


Fig. 2. Selección del explante primario. *A*) brotes de yemas axilares. *B*) brotes de yemas de escamas foliares. *C*) brotes de yemas cotiledonares con cotiledones. *D*) yema axilar (4x); y, yema; p, peciolo; ee, eje embrionario. *E*) yema de escama foliar (4x); b, bráctea; y, yema; ee, eje embrionario; ef, escama foliar. *F*) yemas del nudo cotiledonar (4x); pc, peciolo cotiledonar; y,

escama foliar se caracteriza por estar rodeada de una estructura, a manera de pequeña bráctea (Fig. 2E). Contrariamente, en la axila de cada nudo cotiledonar es posible observar al menos dos yemas seriales ubicadas en posición descendente, algunas de las cuales se ubican exactamente en el punto de unión entre la base del peciolo y el eje embrionario (Fig. 2F), mientras que otras se desarrollan un poco más arriba sobre el mismo eje. La distancia de éstas últimas a la yema axilar varía de un explante a otro. Estas áreas meristemáticas se caracterizan por la presencia de gran cantidad de células pequeñas con núcleo grande, nucleólos bien definidos y contenido citoplasmático muy denso. También se aprecia la presencia de fenoles en células epidérmicas, parénquima cortical y médula. La cinética de brotación de las yemas cotiledonares en el tiempo muestra que a los 0 días hay un desarrollo incipiente de esta yema y en ocasiones casi no se diferencia en el eje embrionario (Fig. 3A). En algunos casos se observan de dos a tres yemas por axila, subtendidas por una pequeña bráctea. A los 3 días se observa la formación muy definida de dos yemas supernumerarias ubicadas en dirección descendente en cada axila del nudo cotiledonar, con diferentes etapas ontogénicas (Fig. 3B). La primera en madurar es la yema más alejada de la axila del eje embrionario, en la base de la cual se observa el desarrollo de una pequeña estructura escamosa correspondiente a la profila del brote. El desarrollo de brotes axilares y el inicio de la brotación de la segunda yema ubicada por debajo de la primera se observa a los 6 días después de la poda del eje (Fig. 3C).

El estudio histológico también reveló la presencia de gran cantidad de células de forma alargada, asociadas al floema, la corteza e inclusive los meristemos apicales (Fig. 4D). Estas células se caracterizan por un gran tamaño, núcleo y nucleólo prominente, un citoplasma con precipitado granuloso y aparente formación de gran número de vacuolas. Es posible que por su ubicación y forma, estas células sean de naturaleza secretora. Estas células se alargan llegando a tener 12 a 15 veces el tamaño de las vecinas formando una especie de tubo o canal. Fue posible observarlas en nudos cotiledonares, brotes jóvenes y yemas. Al comparar *in vitro* el número de brotes de los explantes del nudo cotiledonar con y sin cotiledones, el mayor número de brotes se produce en ausencia de cotiledones. Sin embargo, los brotes desarrollados en este tipo de explante, en presencia de cotiledones, presentan una

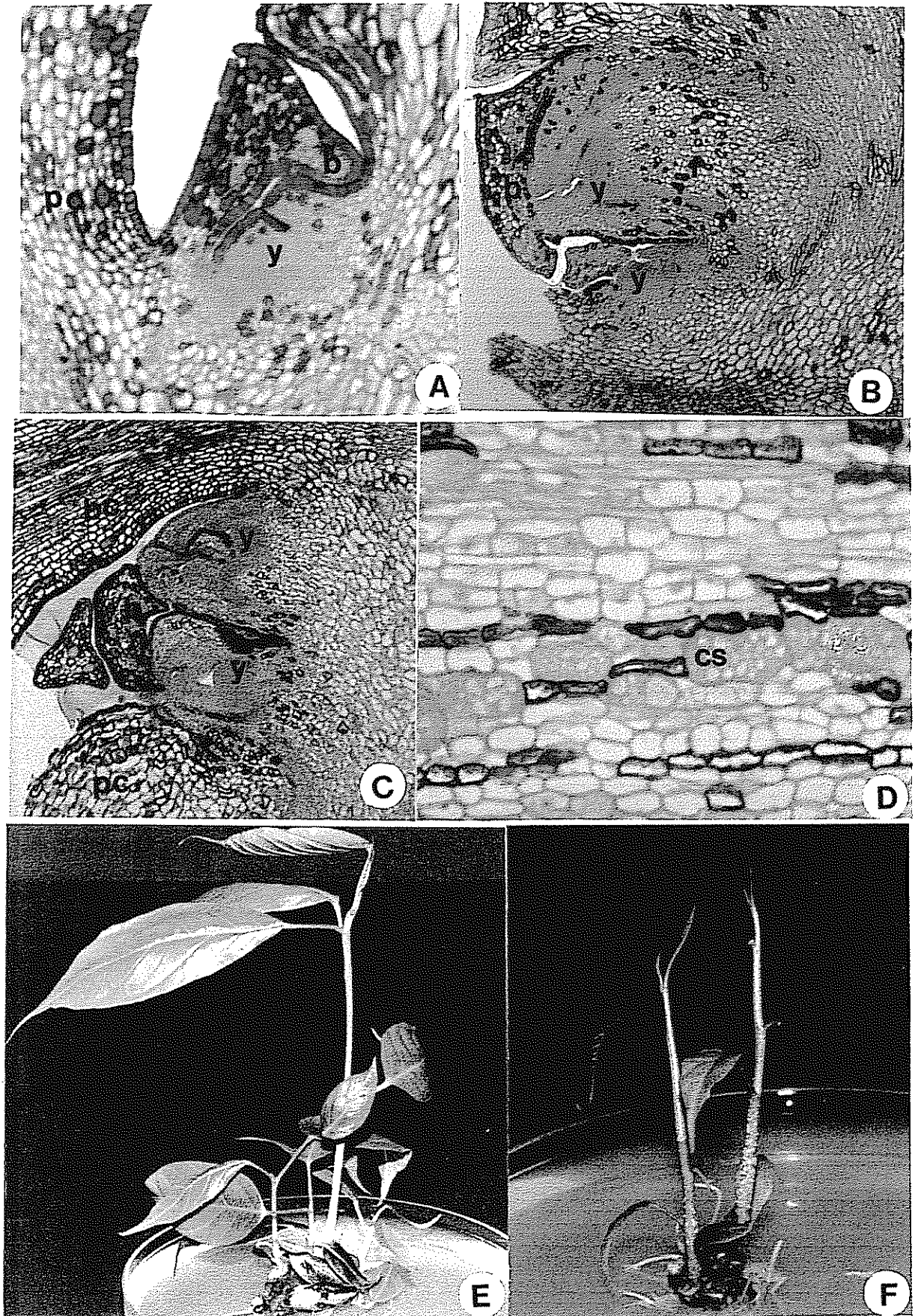


Fig. 3. Cinética del desarrollo de yemas cotiledonares después de la poda. *A*) 0 días (4x); pc, peciolo cotiledonar; y, yema; b, bráctea. *B*) 3 días (4x); y, yema; b, bráctea. *C*) 6 días (4x). bc, brote cotiledonar; b, bráctea; y, yema; pc, peciolo cotiledonar. *D*) sección longitudinal de eje embrionario (4x). cs, células secretoras. *E*) brotes de nudo cotiledonar en presencia de cotiledones (2^o subcultivo). *F*) brotes de nudo cotiledonar en ausencia de cotiledones.

altura promedio bastante superior (4.7 cm más de longitud), más vigorosos comparados con los otros tipos de explante (3E y F). Según el Índice de Capacidad de Alargamiento del Brote (CAB), los originados del nudo cotiledonar (con o sin cotiledones) presentan una capacidad de alargamiento de 42 y 38, en tanto que los de la escama foliar y de la eofila presentan un valor de 17 y 1, respectivamente. Estas observaciones permiten seleccionar el explante de nudo cotiledonar con cotiledones como la mejor fuente de explante primario.

4.1.1.1. Edad de la plántula para la obtención de brotes cotiledonares.

Al determinar la influencia de la edad de la plántula en la respuesta del explante primario se observó que tanto el porcentaje y el tiempo de brotación (Fig. 4A y B), así como la altura de los brotes (Fig. 4C) son estadísticamente similares en las tres edades evaluadas.

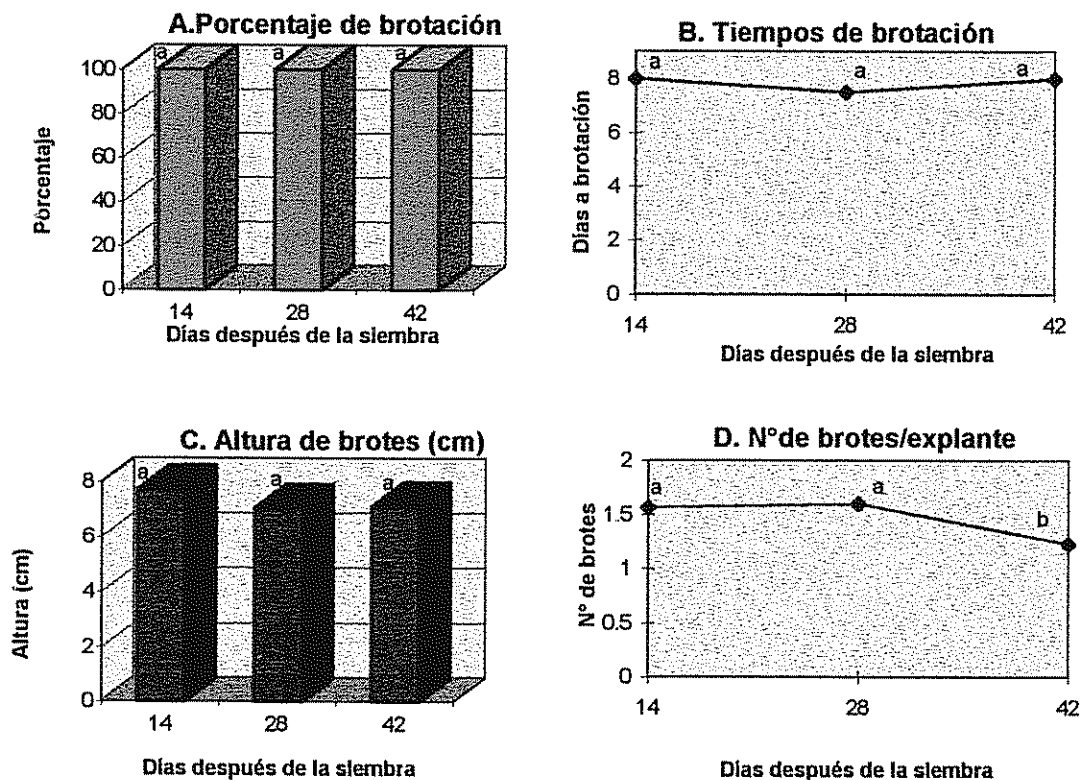


Fig. 4. Porcentaje(A) y días a brotación (B), altura (C) y número promedio de brotes (D) por explante cotiledonar con cotiledones tomados de plántulas a diferentes edades (14, 28 y 42 días) después de la siembra de semillas *in vitro*. La significancia estadística representada por letras pequeñas se evaluó al 5%.

Sin embargo, el número promedio de brotes por explante se reduce de 1.6 en plántulas de 14 y 28 días a un valor de 1.2 cuando se utilizan plántulas de 42 días (Fig. 4D).

El análisis de regresión aplicado a estos resultados, muestra que, al utilizar plántulas de 14 días de edad hay un aumento del número de brotes por explante (Fig. 5A), lo cual contrasta con una disminución de la altura de los mismos. Sin embargo, esta relación no se manifiesta en explantes provenientes de plántulas de 28 y 42 días (Fig. 5B y C).

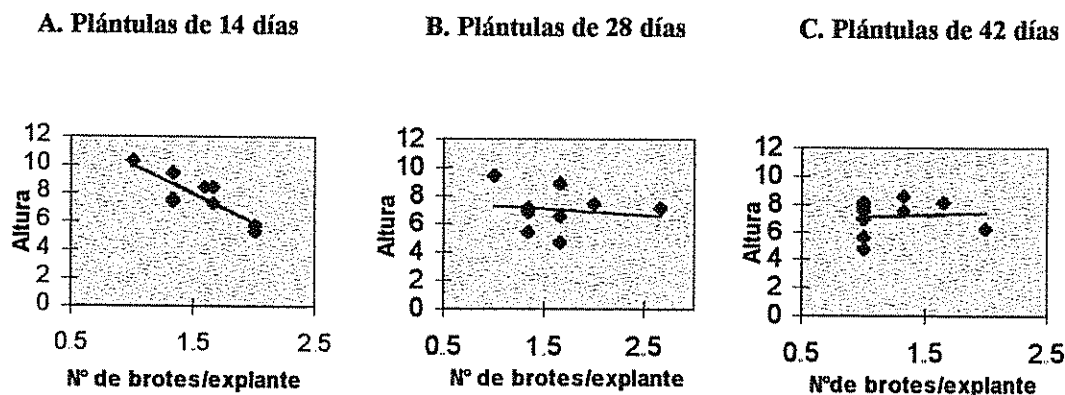


Fig. 5. Relación entre la altura y el número promedio de brotes de yemas cotiledonares tomadas de plántulas a diferentes edades, 14 días (A), 28 días (B) y 42 días (C). Los datos se presentan al 5% de significancia estadística.

4.1.1.2. Cultivo sucesivo del explante primario (explante del nudo cotiledonar)

El cultivo del explante primario por cuatro ciclos sucesivos de 30 días cada uno, mostró un aumento significativo en el número de brotes, de un 82 y 54% en el segundo y tercer ciclo respectivamente. Sin embargo, se muestra una tendencia hacia la disminución de la altura de los brotes a partir del segundo ciclo de cultivo (Fig. 6).

El análisis de regresión realizado para ambas variables no muestra significancia para ninguno de los cuatro ciclos de cultivo. El mayor número promedio de brotes por explante actuó en detrimento de la altura de los mismos, la cual disminuyó gradualmente de 4.4 cm en el primer ciclo a 3.3 cm en el cuarto ciclo. Así mismo, el diámetro del tallo también disminuye; sin embargo, estos brotes pueden ser utilizados como explante secundario en la fase de multiplicación.

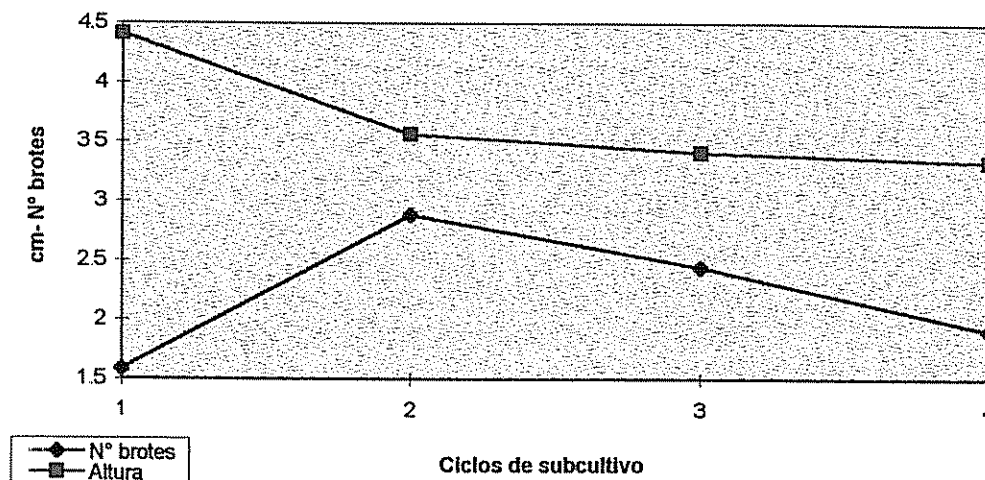


Fig. 6. Evaluación de tres ciclos sucesivos de cultivo del explante primario para la obtención de explantes secundarios en el cultivo de microestacas de caoba. El número y altura promedio (cm) de brotes se evaluó a una significancia del 5%.

4.1.2. Forma de cultivo del explante (explante secundario).

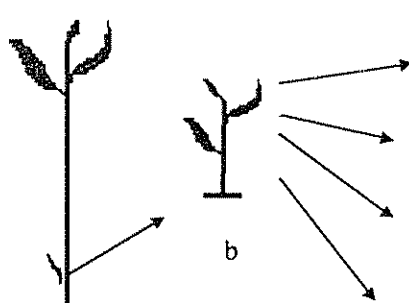
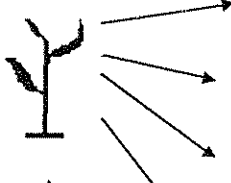
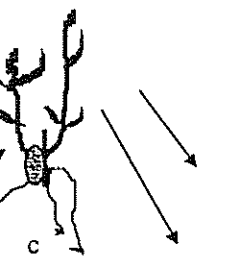
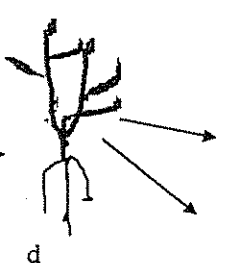
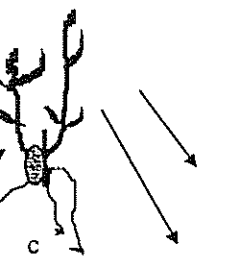
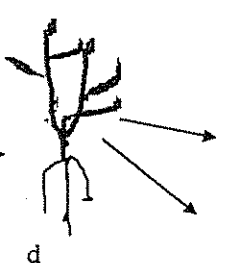
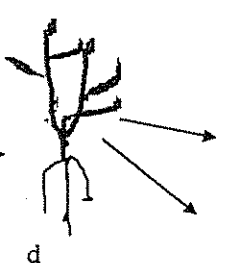
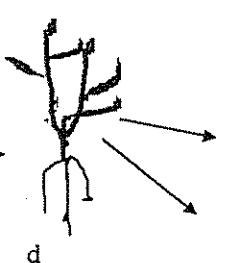
En el cuadro 2 se presentan las diferencias estadísticas obtenidas de la evaluación de diferentes formas de cultivo para la selección del explante secundario. La capacidad de producir brotes está en función del tipo de explante y su forma de cultivo.

El mayor porcentaje de brotación (100%) y el mayor número de brotes por explante (1.5) se obtuvo cuando los explantes secundarios provenientes de brotes de yemas cotiledonares (explante primario) portaban dos nudos y se cultivaron en posición horizontal sobre la superficie del medio (forma 6 y 8). Sin embargo, se observan diferencias significativas si se compara la altura promedio de los brotes entre estas dos formas de cultivo, resultando superior la forma de cultivo 6.

Aunque el cultivo de microestacas de un solo nudo (formas 3, 5, 7) produce brotes de una longitud significativa, el número de brotes por explante es inferior si lo comparamos con las otras formas de cultivo. Esta forma de cultivo presenta el problema de una rápida oxidación del explante que en algunos casos produce su muerte (forma 3, 62% de brotación). Las formas de cultivo 1 y 2 (explantes en posición vertical) producen brotes de mala calidad lo que no permite continuar con la fase de multiplicación. La capacidad de alargamiento del

brote (CAB), es altamente superior en la forma de cultivo 6 con respecto a los otros tratamientos.

Cuadro 2. Porcentaje de brotación (%), días a brotación, número promedio de brotes por explante, altura de brotes (cm) e Índice de Capacidad de Alargamiento durante la selección de la forma de cultivo del explante secundario para el cultivo de microestacas de caoba. b) brote de escama foliar; c) brote de nudo cotiledonar con cotiledones y d) brote cotiledonar sin cotiledones.

Forma de cultivo	Brotación (%)	Días a brotación	Nº brotes/ explante	Altura de brotes (cm)	CAB
	92 ab	14 cd	1.0 bc	1.3 ab	7.4
	55 c	26 a	0.5 d	1.5 ab	3.9
	62 bc	21 ab	0.7 bcd	1.4 ab	4.3
	83 abc	9 d	0.9 bcd	1.1 b	4.2
	66 abc	13 cd	0.6 cd	2.2 a	7.3
	100 a	12 cd	1.5 a	1.7 ab	33.0
	80 abc	17 bc	0.8 bcd	1.4 ab	8.0
	100 a	14 cd	1.2 ab	1.1 b	7.0

Significancia al 5%

4.2. Fase de multiplicación

Durante esta fase se evaluó el potencial de producción de brotes del explante secundario (escamas foliares provenientes de brotes de nudos cotiledonares con cotiledones) bajo la forma de cultivo 6 (Cuadro 2) en medios semi-sólidos y líquidos.

4.2.1. Cultivos en medios semi-sólidos

Durante el primer ciclo de cultivo de la fase de multiplicación, una concentración de 9 μM de BAP (Fig. 7) permitió la producción del mayor número de brotes (2.3); aunque este valor es estadísticamente igual al obtenido en presencia de 4.5 μM de BAP (1.7 brotes por explante). Sin embargo, la mayor altura promedio de los brotes (1.9 cm) se obtiene cuando se aplican concentraciones bajas de BAP (2.2 μM). Un gran porcentaje de los brotes producidos bajo la concentración de 9 μM de BAP presentan un aspecto vitrificado, no expanden sus hojas, y presentan una coloración verde-blanquecino. Generalmente, la mayoría de estos brotes emergen de las primeras yemas axilares del primer brote que emergió en el explante.

La interacción de BAP con kinetina o 2-ip a concentraciones de 2.2 μM para cada una de las citocininas produce un promedio de 1.4 brotes por explante con alturas de 1.4 cm (2-ip) a 1.6 cm (kinetina). Esta altura de los brotes es adecuada para continuar con la fase de multiplicación. Las otras combinaciones de BAP con kinetina o con 2-ip no muestran diferencias significativas en cuanto al número de brotes. Sin embargo, la altura promedio es superior cuando 2.2 μM de BAP es combinado con 2.2 μM de Kinetina o de 2-ip.

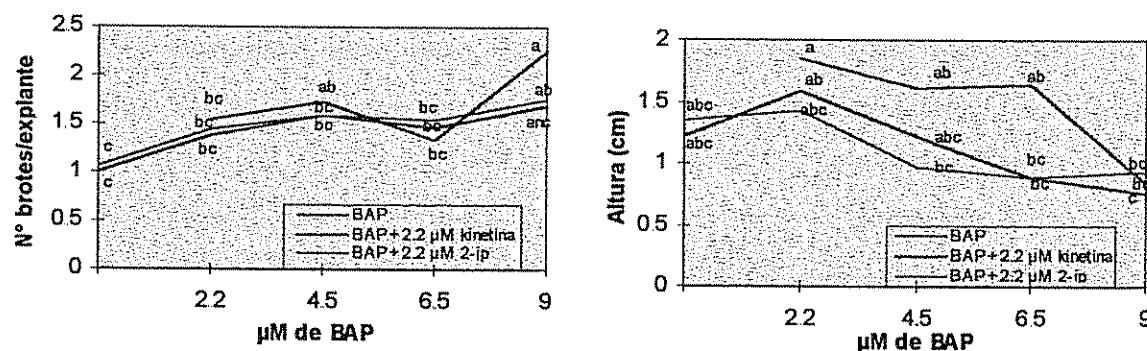


Fig. 7. Promedios de el número y altura de brotes por explante en la evaluación de diferentes concentraciones y combinaciones de BAP, Kinetina y 2-ip durante la fase de multiplicación (primer ciclo de cultivo). La significancia estadística representada por letras pequeñas se calculó al 5%.

De las tres citocininas evaluadas a una misma concentración (2.2 μM) y sin combinarse entre sí, la BAP es estadísticamente superior al producir mayor número de brotes con una altura superior. Sin embargo, los brotes producidos sólo con BAP presentan la formación de callo fenolizado en sus extremos, que en algunos casos afecta el desarrollo del

brote. En todas las combinaciones de citocininas evaluadas, existe una tendencia hacia el aumento del número de brotes a medida que la concentración de BAP aumenta. Sin embargo, se observa una relación inversa en la altura de los brotes, la cual disminuye al incrementar la BAP. Los tratamientos con 2.2 μM de 2-ip y kinetina combinados con 6.5 BAP permitieron el reciclaje de los explantes, debido a la poca formación de callo fenolizado en los extremos de estos.

En el segundo ciclo de cultivo (Fig. 8), se observa que los mejores tratamientos en cuanto al número promedio de brotes corresponden a las concentraciones de 2.2 μM , 6.5 μM y 9 μM de BAP y la combinación de 6.5 μM de BAP con 2.2 μM de kinetina. Estos tratamientos son estadísticamente iguales entre sí pero superiores a los demás, sin embargo, en cuanto a la altura promedio de los brotes, ninguno de estos tratamientos es superior estadísticamente a los demás. La combinación de 6.5 μM de BAP con 2.2 μM de 2-ip produce un promedio de 1.5 brotes por explante con una altura promedio de 2 cm. Es importante hacer notar que los brotes producidos en este tratamiento presentan entrenudos alargados lo que permite continuar con la fase de multiplicación, además presentan tallos gruesos y hojas bien desarrolladas. También se observaron otros brotes que provienen de las yemas axilares presentes en la base del primer brote que emergió del explante inicial (Fig. 9A). Durante la fase de multiplicación se observó que el 60% de los explantes reciclados formaron un promedio de 1.7 brotes con alturas de 2 cm (Fig. 9B,C,D).

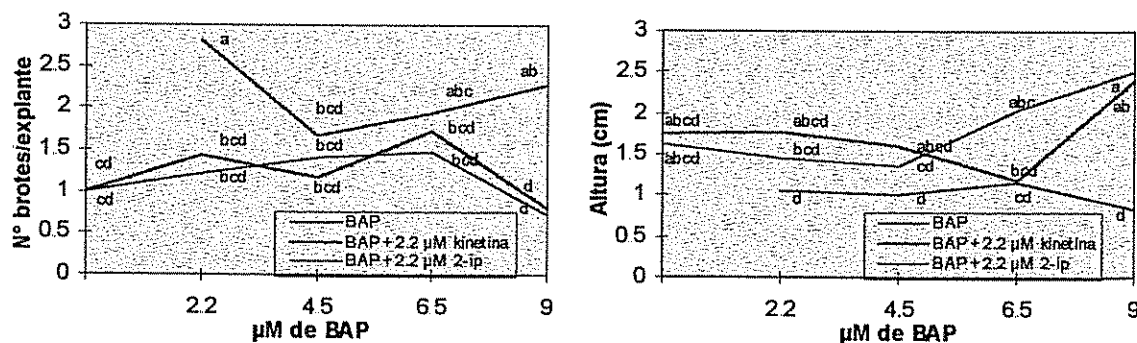


Fig. 8. Promedios de el número y altura de brotes por explante en la evaluación de diferentes concentraciones y combinaciones de BAP, Kinetina y 2-ip en la fase de multiplicación (segundo ciclo de cultivo). La significancia estadística representada por letras pequeñas se calculó al 5%.

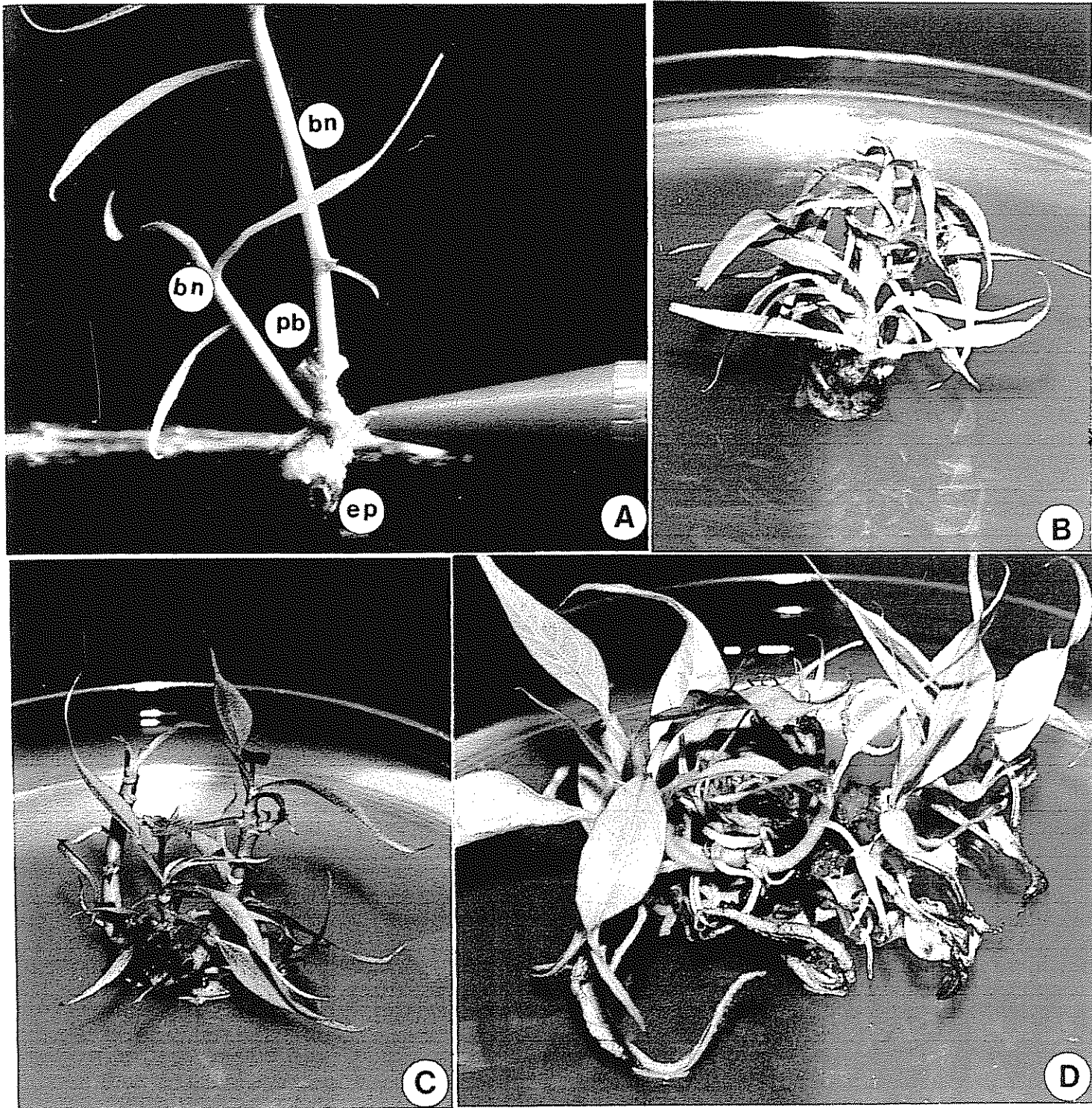


Fig. 9. Multiplicación de brotes de caoba (*Svietenia macrophylla*) *in vitro*. A) Reciclaje del explante secundario. ep, explante primario; pb, primer brote podado; bn, brotes nuevos de las yemas axilares del primer brote. B, C, y D) desarrollo de brotes y proliferación de yemas axilares durante la fase de multiplicación.

Cabe resaltar que el efecto de la interacción BAP - kinetina y BAP - 2-ip fue diferente de un ciclo de cultivo a otro. Si en el primer ciclo la tendencia general fue un aumento en el número de brotes y una reducción de su altura en presencia de concentraciones crecientes de BAP; en el segundo ciclo se observa, una disminución del número de brotes en beneficio de su longitud.

Según los resultados obtenidos durante la fase de multiplicación, el número total de brotes obtenidos a partir de una sola semilla germinada es de 4.7 en el primer ciclo de cultivo (establecimiento de la multiplicación), en un período de 10 semanas. Este valor se incrementa a 11.8 brotes por semilla, al combinar el subcultivo del explante primario con la producción del segundo ciclo de cultivo al término de 5 semanas.

4.2.2. Cultivo en medios líquidos en inmersión temporal

Los ensayos preliminares realizados con el sistema de cultivo en inmersión temporal (RITA®) se han utilizado para comparar el efecto del cultivo de explantes nodales en medio líquido con respecto al cultivo en medio semi-sólido. Inmersiones de 3 minutos cada 3 o 5 días (T2, T4, T5 y T6) se traducen en buenos porcentajes de brotación (Fig 10A), aunque el número y la longitud promedio de los brotes fue bajo en comparación con los valores obtenidos en medios sólidos (Fig 11).

Los brotes producidos bajo una frecuencia de 3 minutos cada 3 días en presencia de 6.5 μM de BAP y 2.2 μM de 2-ip (T6) son superiores (Fig 10B) a nivel de morfología foliar (color y textura); sin embargo, son brotes de pequeña longitud (0.6 cm). Algunos de los brotes producidos bajo una frecuencia de inmersión de 3 minutos cada 5 días en presencia de 9 μM de BAP (T2) mostraron formación de nuevos brotes en su base. El tratamiento 1 (9 μM de BAP) y el tratamiento 3 (6.5 μM de BAP y 2.2 μM de 2-ip) bajo una inmersión de 1 minuto cada 5 días son estadísticamente iguales entre sí pero superiores en el número y altura de los brotes con respecto a otros ritmos de inmersión evaluados; sin embargo, la morfología de estas vitroplantas es satisfactoria comparada con los otros tratamientos. En general no se observó vitrificación y malformación de hojas en estos tratamientos. Otros ensayos mostraron

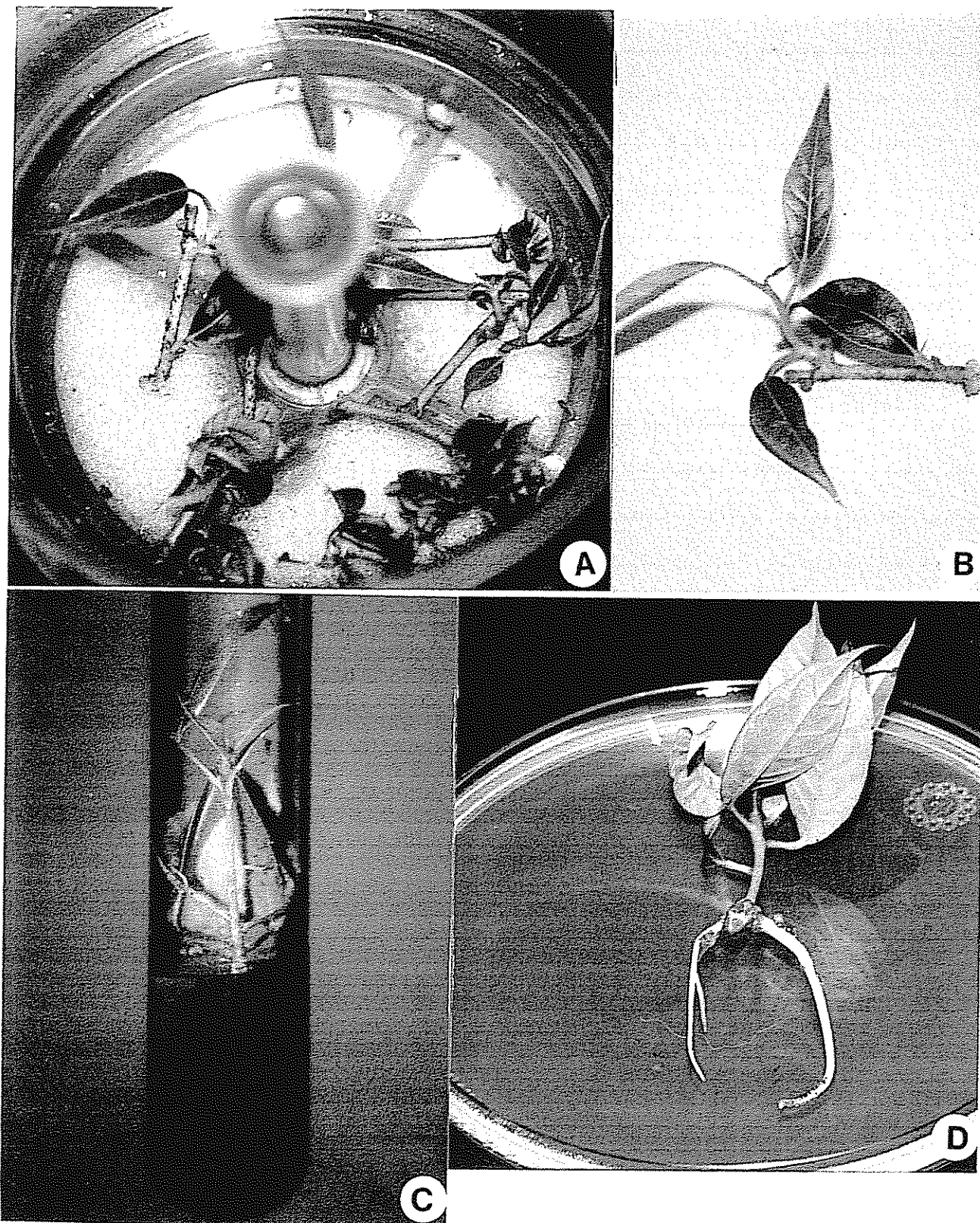


Fig. 10. Producción de brotes de caoba (*Swietenia macrophylla*) en el sistema de inmersión temporal (RITA®). A) Brotación y crecimiento de los explantes en; B) Brote desarrollado a los 30 días después de la siembra del explante; C) Crecimiento del brote en un medio de desarrollo WPM; D) brote enraizado.

que altas frecuencias de inmersión diaria (10 minutos al día, 5 y 15 minutos 4 veces al día) provocan vitrificación y malformación de los brotes.

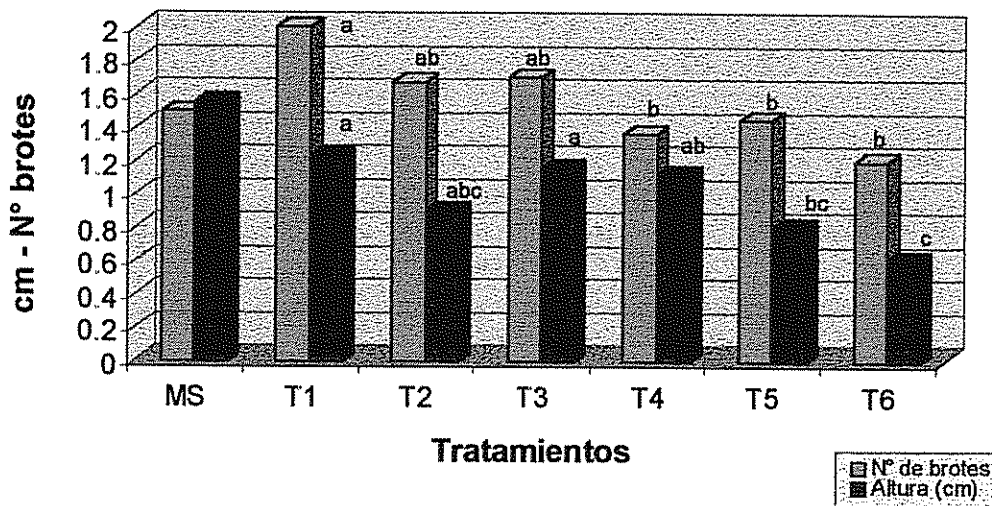


Fig. 11. Número y altura promedio de brotes de caoba cultivados bajo el Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®) a diferentes ritmos de inmersión y tratamientos de inducción de brotes. MS, promedio de los medios semi-sólidos. La significancia estadística representada por letras pequeñas se calculó al 5%.

4.3. Fase de desarrollo

El uso de un medio adecuado para el desarrollo de los brotes obtenidos durante la multiplicación es necesario como un paso previo para el enraizamiento. De los medios evaluados (Cuadro 3), el WPM en presencia de carbón activado, 2% de sacarosa y libre de reguladores del crecimiento (MD3) permitió un 100% de sobrevivencia de los brotes, los cuales mostraron un buen crecimiento en longitud y buen desarrollo de hojas (Fig. 10C). En este medio, el 10% de los brotes desarrollaron pequeñas raíces (+/- 2 cm de longitud) lo cual constituye una ventaja para la fase de enraizamiento. Mientras que este mismo medio, pero suplementado con 1.33 μM de BAP, 2.89 μM de AG₃ y 4% de sacarosa (MD4), no permitió un buen desarrollo de los brotes.

En el medio MS con 1.11 μM de BAP, 1.16 μM de kinetina y sacarosa al 4% (MD1), se presentó un 79% de sobrevivencia de los brotes, además de observarse en la base de ellos,

algunos brotes pequeños. En los medio que contiene las sales MS y vitaminas de Morel, 1.33 μM de BAP, 2.89 μM de AG₃ y 4% de sacarosa (MD2) tampoco se obtuvo un buen desarrollo de los brotes, en algunos se observó hojas con coloración amarilla, seguida de la caída de las mismas.

Cuadro 3. Evaluación de cuatro medios diferentes durante la fase de desarrollo para el acondicionamiento de los brotes de caoba para el enraizamiento.

Tratam.	Sobrevivencia de brotes	Formación de raíces	Observaciones
MD1	79%	0%	Poco desarrollo, formación de un pequeño callo en la base del brote, caída de hojas y desarrollo de brotes en las axilas basales del mismo.
MD2	84%	0%	Poco desarrollo, mínima formación de callo en la base del brote, coloración amarilla y caída de hojas
MD3	100%	10%	Brotes bien desarrollados con buena coloración de hojas y tallos gruesos, no hay caída de hojas mínima formación de callo en la base.
MD4	92%	0%	Poco desarrollo, formación de un pequeño callo en la base del brote y es mínima la caída de hojas.

4.4. Fase de enraizamiento

Ensayos preliminares mostraron muy baja aptitud de los brotes de caoba al enraizamiento *ex vitro*. Se observó que a los 10 días después de colocar los brotes en el sustrato en condiciones de invernadero, el 100% de ellos murieron. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de brotes enraizados se obtiene bajo un sistema de inducción a alta concentración de auxinas, baja concentración de citocininas y un tiempo reducido de exposición, seguido de la transferencia a un medio de expresión con baja concentración de auxinas (Fig. 12). De esta manera al utilizar concentraciones de 422 μM de AIB, 123 μM de ANA y 23.23 μM de Kinetina (T1 y T2) se obtuvo un 73 y 70% de enraizamiento. Al utilizar bajas concentraciones de auxinas por un periodo de tiempo mayor

(T6, T8 y T9) los porcentajes de enraizamiento fueron bajos, en algunos casos 0%, a excepción del T7 que presentó un 55% de enraizamiento.

El análisis estadístico muestra que existen diferencias entre los tratamientos en cuanto al número y longitud de las raíces. La inducción con altas concentraciones de auxinas, y el uso de bajas concentraciones de éstas en el medio de expresión, produce mayor cantidad de raíces (T1, T2, T5 y T7) de mayor longitud en comparación con los demás tratamientos, a excepción del tratamiento T1 en el cual la longitud promedio fue de 3.6 cm, pero con mucha formación de callo friable en la base. Estas raíces presentan un buen desarrollo y en algunos tratamientos, se observó la formación de raíces secundarias (Fig 10D). Los brotes provenientes de los medios de desarrollo con las sales minerales de WPM (MD3 y MD4), presentaron los mayores porcentajes de enraizamiento; el número promedio de raíces por brote y la longitud de las raíces también fue superior.

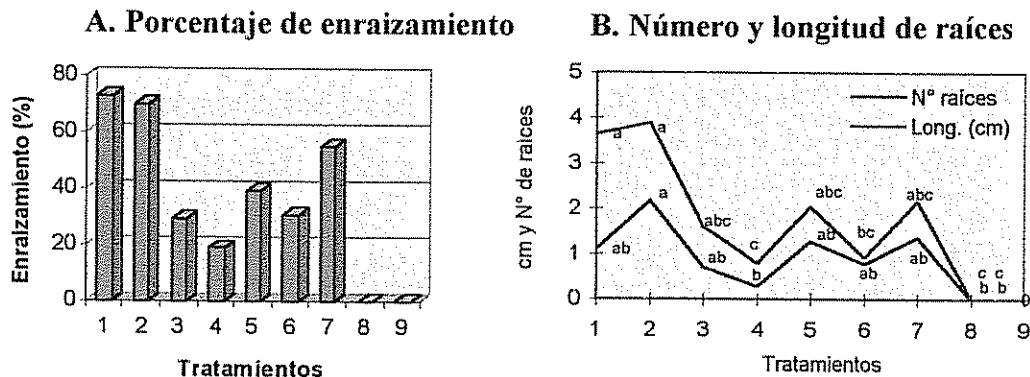
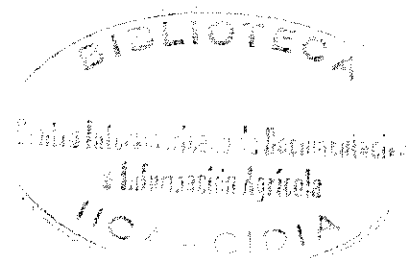


Fig. 12. Enraizamiento *in vitro* de brotes de caoba después de 30 días en un medio de desarrollo de raíces. A. Porcentaje de enraizamiento (%), B. Número y longitud (cm) promedio de raíces. La significancia estadística representada por las letras pequeñas se evaluó al 5%.

4.5. Fase de aclimatación

Las vitroplantas utilizadas durante la fase de aclimatación tenían una altura promedio de 3.2 cm, presentaban de 3 a 5 nudos con 4 a 6 hojas y un promedio de 2.5 raíces por planta (Fig 13A). Plantas en estas condiciones permitieron obtener un 27% (13/48) de sobrevivencia a la aclimatación, cuando se eliminó la tapa de los tubos tres días antes de

transferirlas al invernadero. El endurecimiento de las vitroplantas es favorecido cuando éstas son colocadas en el invernadero bajo un túnel plástico con alta humedad relativa provocada por la aplicación de agua en gotas finas. El crecimiento es lento en los primeros días, sin embargo, dos semanas después las plantas inician la formación de nuevas hojas y su crecimiento continúa. Después de 60 días de aclimatación las plántulas aumentaron un promedio de 3.5 cm de altura, el tallo presentó una mayor lignificación y las nuevas hojas mostraron características morfológicas adecuadas para la fotosíntesis. Las raíces adventicias no funcionales desarrolladas *in vitro* han sido sustituidas por raíces adventicias funcionales en el nuevo sustrato en el invernadero (Fig. 13 B y C)



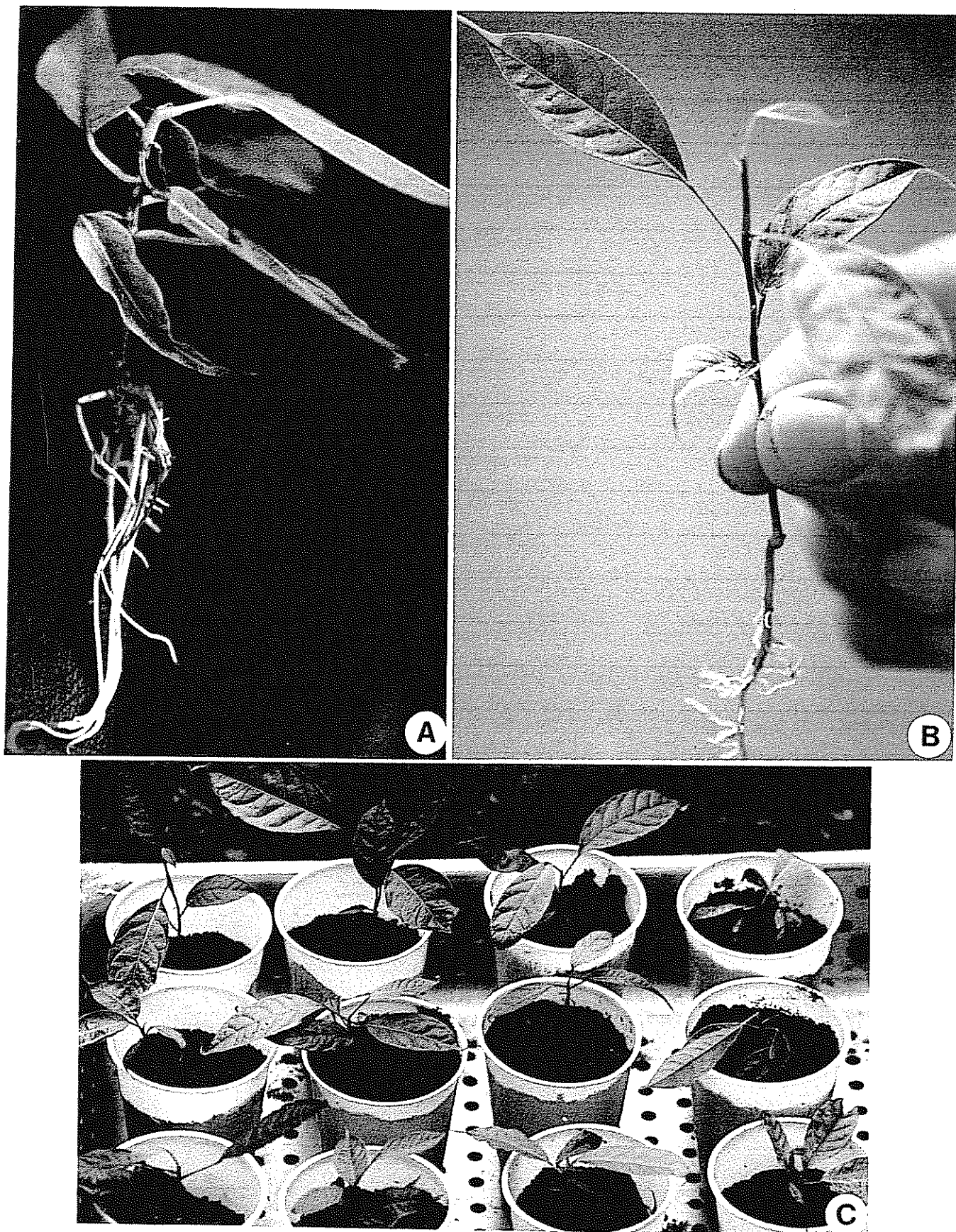


Fig. 13. Aclimatación de plántulas de caoba (*Swietenia macrophylla*) obtenidas *in vitro*. A) Desarrollo de raíces adventicias funcionales; B) crecimiento de la plántula a los 60 días después de la transferencia a invernadero; C) plántulas aclimatadas.

5. DISCUSIÓN

5.1. Fase de iniciación

5.1.1. Selección de la fuente de explante (explante primario)

La micropropagación tiene un papel importante en la multiplicación rápida de genotipos élitos (por ejemplo clones y familias) de especies forestales. Esto es particularmente válido para los países tropicales y subtropicales donde muchas especies se han domesticado recientemente, tienen posibilidades de altas tasas de crecimiento y la demanda por madera es muy alta (Hartney y Stevansson, 1992). Sin embargo, el éxito de éstas técnicas depende de diferentes factores de influencia. Entre ellos se pueden citar el explante (estado fisiológico de plantas madre en el momento de colectar los explantes), los medios de cultivo (sales inorgánicas, compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento, etc), las condiciones ambientales de incubación y las interacciones de todos estos factores (Mroginski y Roca, 1991). La influencia del origen del explante es uno de los principales factores de estudio para la micropropagación de las especies vegetales, porque de ella depende el potencial que un explante pueda presentar para su multiplicación *in vitro*.

Para la micropropagación de caoba a partir de plántulas germinadas *in vitro*, los resultados muestran que la mejor fuente de explante son las yemas que se encuentran en la axila formada entre las bases envoltantes de los cotiledones y el eje epicotilar. El estudio histológico muestra que en cada axila del nudo cotiledonar existen al menos dos yemas con diferentes etapas ontogénicas, algunas de éstas se desarrollan de igual forma que el eje principal. Cada uno de estos ejes muestran el desarrollo de diferentes yemas, revelando el enorme potencial de rebrote que posee la especie. Cuando estos explantes son cultivados en presencia de los cotiledones, la capacidad de formación de brotes con alturas adecuadas (8.5 cm) para iniciar la multiplicación, es superior a los otros tipos de explante estudiados. La posibilidad de subcultivos permite que éste explante sea una fuente importante para la producción de explantes secundarios, aunque existe una tendencia a la disminución del número y altura de los brotes después del segundo subcultivo. Estudios similares efectuados en diferentes especies leñosas como *Theobroma cacao* (Filloy y Janick, 1987; Aguilar, 1996);

Sterculia urens (Purohit y Dave, 1996), *Leucaena leucocephala* (Dhawan y Bhojwani, 1985) y *Quercus robur* (Vieitez *et al*, 1985) han mostrado el potencial de este tipo de explante, el cual puede tener gran aplicación, principalmente para la micropropagación de familias superiores de árboles de difícil propagación.

En caoba, unas de las posibles causas de la reducción en el número de brotes y altura de los mismos en los tratamientos, podría ser la producción de una masa celular o callo completamente fenolizado en los extremos del explante, la cual poco a poco lo envuelve a medida que aumenta el tiempo que éste pasa en cultivo. Esto se apoya en las observaciones realizadas en cortes histológicos de nudos cotiledonares, escamas foliares y eofilares, los cuales muestran gran cantidad de células con fenoles muy cercanas al tejido vascular, específicamente al floema y en la médula parenquimática. Otra causa podría ser la disminución de las reservas existentes en los cotiledones a medida que aumentan los subcultivos y que el medio de cultivo no contenga todos los elementos necesarios que el explante necesite. Es bien conocido que una vez que la semilla germina, los sistemas radical y aéreo comienzan a utilizar los nutrimentos minerales, grasas, almidón y proteínas presentes en las células de almacenamiento de la semilla y la plántula juvenil depende de estas reservas alimenticias (Salisbury y Ross, 1994).

Estudios realizados por Olofinboba (1975) en cotiledones de cacao y su relación con el crecimiento de la plántula mostraron que éstos contienen aminoácidos, almidón, sacarosa, glucosa, fructosa y una gran cantidad de monosacáridos, los cuales cambian en concentración a medida que la planta inicia su crecimiento. En esta especie los almidones son la principal fuente de metabolitos para el desarrollo de la plántula, por lo que la eliminación de los cotiledones disminuye mucho su crecimiento. En caoba falta por realizar estudios similares a fin de conocer la composición metabólica de los cotiledones. Sin embargo, el hecho de que el cultivo de nudos cotiledonares en ausencia de cotiledones diera origen a brotes de menor altura, tallo delgado y hojas pequeñas, comparados con los obtenidos de explantes con cotiledones, hace suponer que la eliminación de los cotiledones implicó la supresión de ciertos metabolitos necesarios para el crecimiento del brote.

En esta especie, la edad de la plántula no constituye un factor limitante para iniciar el cultivo primario. La poda del eje principal puede realizarse en un período de 2 a 6 semanas después de la siembra de la semilla sin presentar diferencias en el porcentaje de germinación y la altura de los brotes. Esto constituye una ventaja importante porque al utilizar plántulas más jóvenes se disminuye el tiempo para cada ciclo de micropropagación. Posiblemente, el utilizar plántulas más jóvenes promueva el mayor número de subcultivos del nudo cotiledonar, ya que las reservas, reguladores de crecimiento y otros factores presentes en los cotiledones no son utilizados en el desarrollo de la plántula, sino en el desarrollo de los brotes que emergen del nudo cotiledonar.

La baja respuesta observada en las yemas eofilares comparada con las otras fuentes de explante puede explicarse, en parte a que los entrenudos del epicotilo son muy cortos, lo que obliga a utilizar explantes más pequeños y en consecuencia, más susceptibles a la oxidación. Además los estudios histológicos muestran que éstas yemas son menos desarrolladas, posiblemente por estar más cercanas al ápice del brote. La diferencia de respuesta observada entre las yemas de un mismo eje puede explicarse, ya que sobre una misma planta las yemas coexistentes sean estas apicales, axilares o adventicias, presentan meristemas que pueden tener diferencias estructurales o fisiológicas importantes entre sí (Margara, 1988). Lardet *et al* (en prensa) observaron en *Hevea brasiliensis* y *Theobroma cacao* que el estado fisiológico de crecimiento de las ramas, alcanzado en el momento de tomar los explantes y la posición de las yemas sobre la misma, son factores de influencia determinantes de la respuesta de la yema en cultivo *in vitro*. En ambas especies, la capacidad de las yemas para desarrollarse en el cultivo *in vitro* es mayor en los explantes tomados de ramas en estado dormante. Estos autores observaron un gradiente en el desarrollo de las yemas según su posición en el eje. Este gradiente puede ser el resultado de un bajo nivel endógeno de inhibidores del crecimiento y de un contenido suficientemente bajo de promotores que permita responder positivamente a la adición exógena de reguladores de crecimiento.

De igual forma, en *Quercus robur*, se observó mayor alargamiento de los brotes procedentes de las secciones basales de la rama, comparados con el desarrollo de brotes

apicales. Estos resultados se atribuyen a las diferencias fisiológicas observadas entre las yemas situadas en las distintas regiones del tallo (San José, 1986). Comparativamente, las diferencias de reactividad observadas en las diferentes yemas de caoba, en orden creciente del ápice al nudo cotiledonar, podría ser el reflejo de la existencia de un gradiente hormonal endógeno a lo largo del eje epicotilar. Sin embargo, diferentes estudios deben ser realizados en esta especie a fin de determinar los factores fisiológicos de influencia ligados al desarrollo de yemas aisladas cultivadas *in vitro*.

5.1.2. Forma de cultivo del explante (explante secundario)

La forma de cultivo del explante secundario también influyó en el potencial de brotación y la altura de los brotes, aunque ésta respuesta está estrechamente ligada a la fuente de explante inicial. Es así, como, las yemas de las escamas foliares provenientes de brotes del nudo cotiledonar con cotiledón presentan superioridad al ser cultivadas en posición horizontal sobre el medio de cultivo. Los brotes cotiledonares se caracterizan por poseer normalmente dos escamas foliares alternas que en muchos casos están separadas entre sí por entrenudos largos, lo cual resulta ventajoso durante la fase de proliferación. Posiblemente la posición de estas yemas representa alguna ventaja fisiológica en beneficio del desarrollo de los brotes. Cuando estos explantes son seccionados en microestacas de una yema, el tamaño del explante también es determinante en la respuesta. La reducción en el porcentaje de brotación parece estar asociado a la formación de un callo fenolizado en los extremos del explante.

En otras especies se ha estudiado a profundidad la influencia que tiene, sobre la morfogénesis, la orientación de los explantes sobre el medio de cultivo (Thorpe y Kumar, 1993) y en la proliferación de yemas axilares (Yae *et al*, 1987). En *Hevea brasiliensis* el cultivo de los explantes en posición horizontal y la actividad generada por la formación de un callo de cicatrización en su base parece estar asociado con un estado hídrico favorable al desarrollo de los brotes (Jourdan *et al*, 1992). En caoba, el beneficio adquirido al cultivar los brotes en posición horizontal se traduce en un mayor contacto con el medio de cultivo lo que aumenta la posibilidad de absorción de los componentes del medio, permitiendo un mejor

desarrollo del brote. Otra ventaja de este sistema de cultivo es el tratar de modificar el transporte basípeto de auxinas, al igual que se hace en horticultura; de manera que las yemas puedan escapar de la dominancia apical. Lardet (comunicación personal, 1997) manifiesta que en el cultivo *in vitro*, el explante nodal es liberado de la dominancia apical ya que él no está conectado a la yema apical; sin embargo, si el explante está en posición vertical, el transporte basípeto de la auxina continúa y ésta se acumula en la base provocando la formación de un callo. Pero si el explante está en posición horizontal, el transporte basípeto de la auxina es lento y ésta se hace disponible para el alargamiento del brote. Según este autor, la acción de la auxina se ejerce sobre la yema en desarrollo porque su actividad es más bien inhibidora de la brotación ya que este control lo ejercen las citocininas. Si el explante está en posición horizontal sobre la superficie del medio, la auxina será más bien favorable para el alargamiento del brote que para la brotación.

5.2. Fase de multiplicación.

5.2.1. Medios semi-sólidos

En caoba se han observado respuestas diferentes según el uso de BAP sola o combinada con otras citocininas. Altas concentraciones de BAP ($9 \mu\text{M}$) estimulan una mayor formación de brotes a partir de la yema de la escama foliar de los brotes cotiledonares; sin embargo, los brotes producidos se caracterizan por ser de poca longitud, entrenudos cortos y hojas mal formadas. El efecto de la interacción entre citocininas se observó cuando al combinar $6.5 \mu\text{M}$ de BAP y $2.2 \mu\text{M}$ de 2-ip, se produce mayor número de brotes con alturas que permiten continuar con la multiplicación por presentar entrenudos más largos, mientras que la BAP en presencia de la kinetina produce igual número de brotes pero de menor altura. Según estos resultados, la 2-ip estimula el alargamiento de los brotes, ya que producto de su interacción con $9 \mu\text{M}$ de BAP, siempre se obtienen los brotes de mayor altura en ambos ciclos de multiplicación, aunque estadísticamente estos resultados son iguales a los obtenidos con kinetina. Comparativamente, en otras especies leñosas se ha observado mayor beneficio con el uso de BAP sola durante la fase de multiplicación con respecto a la interacción con kinetina y 2-ip o el uso de cada una de éstas por separado. Por ejemplo, en especies del género *Morus*, la respuesta del cultivo de ápices y yemas axilares fue superior en presencia de

BAP que en kinetina. Sin embargo, en estas especies al igual que en caoba, las altas concentraciones de BAP aumentan el número de brotes a expensas de una disminución significativa de su altura (Pattnaik y Chand, 1997). En *Ixora coccineus* la concentración de 2.5 μM de BAP permite mayor producción de brotes de yemas axilares en explantes secundarios, comparado con la misma concentración de kinetina, 2-ip y thidiazuron (Lakshmanan *et al*, 1997). En *Leucaena leucocephala*, concentraciones de 0.5 mg/l de BAP son suficientes para romper la dormancia del 100% de las yemas axilares, promover su crecimiento y producir el mayor número de brotes, mientras que la kinetina y la 2-ip únicamente promueven la brotación del 80% y 95% respectivamente (Dhawan y Bhojwani, 1985). Aunque Goyal *et al* (1985), trabajando con la misma especie encontraron que la mayor proliferación de brotes (2.6 brotes) de yemas axilares se obtiene con 2.5 mg/l de BAP, lo cual indica que además de la fuente de citocinina y la concentración utilizada, existen otros factores que influyen en la respuesta del explante. En *Cornus florida*, se obtuvo de 1.5 a 5 brotes dependiendo de la concentración de BAP en el medio basal; sin embargo, las mejores tasas de proliferación y calidad de los brotes se obtuvieron con 2.2 y 4.4 μM de BAP (Kaveriappa *et al*, 1997).

La actividad de los reguladores de crecimiento de la planta depende de la sensibilidad del tejido y de su interacción con otros factores como la concentración endógena o en el medio de cultivo, pero el mecanismo por medio del cual esta interacción controla el desarrollo y los procesos fisiológicos de la planta, aún son desconocidos. A esto se debe que la actividad de las citocininas no se ha identificado claramente, además se conoce la presencia de mutantes e inhibidores que bloquean pasos metabólicos particulares (Binns, 1994). Se supone la existencia de un mecanismo alternativo por el cual la sensibilidad de la célula puede cambiar en respuesta a diferentes factores externos, incluyendo diferentes concentraciones del mismo regulador de crecimiento. La afinidad de los receptores específicos (proteínas) a los reguladores de crecimiento presentes en la célula, puede ser sometida a uno o más cambios dependiendo de la concentración del regulador de crecimiento en el ambiente (Minocha, 1987). Según Chen *et al* (1996), existe una correlación positiva entre el nivel interno de

citocininas tipo zeatina dentro del tejido y el tamaño del domo meristemático; por consiguiente, el crecimiento del brote es regulado por el nivel de citocinina dentro de la yema.

La producción de brotes de caoba en presencia de citocininas, específicamente la BAP, muestra la capacidad reproductiva de esta especie *in vitro* utilizando plántulas como fuente de explantes. Esta capacidad aumenta dada la posibilidad de reciclaje de los explantes primarios (yemas cotiledonares) y secundarios (yemas de la escama foliar), sumado a ésto el incremento de los ciclos de multiplicación, permitirá maximizar la fase de multiplicación.

5.2.2. Medio líquido, Sistema de inmersión temporal.

El uso de medios de cultivo líquido en el sistema de inmersión temporal se realizaron con la finalidad de observar la respuesta de caoba en este sistema, debido a que se conoce que las tasas de multiplicación y crecimiento pueden ser superiores por la mayor difusión de los elementos del medio, menor mano de obra lo cual permitiría reducir los costos en una aplicación a gran escala y el desarrollo del brote es más homogéneo que en medio semi-sólido. Sin embargo, cuando se utilizaron frecuencias y tiempos de inmersión muy cortos, se observó la malformación y vitrificación del brote. Es probable que éstas malformaciones sean una respuesta del uso de frecuencias de corto tiempo, porque el explante permanece mayor tiempo con el medio de cultivo. Muchos factores del medio de cultivo se han asociado con la vitrificación de plantas micropropagadas. El tipo de agar y su concentración, el potencial hídrico y el tipo de citocinina y su concentración pueden ser inductores de la vitrificación (Costa *et al*, 1993). Cuando se utilizaron frecuencias más distanciadas y en menor tiempo, los brotes presentaron mejores características morfológicas y ausencia de vitrificación, posiblemente porque una de las principales ventajas del sistema RITA® es la eliminación de las posibilidades de hiperhidricidad del tejido (Teisson *et al*, 1995). Sin embargo, para ello debe encontrarse el uso óptimo de este sistema, el cual depende del equilibrio logrado entre los ritmos y duración de inmersión, dada la posibilidad de retención de medio por capilaridad en la superficie de la planta y el recipiente. La permanencia de una película capilar de medio, en la superficie de los tejidos, posibilita la nutrición fuera de los períodos de inmersión y el intercambio gaseoso es favorecido con respecto a una inmersión total (Teisson *et al*, 1995).

Cuando se utilizó frecuencias de inmersión de 3 minutos cada 3 ó 5 días en aquellos tratamientos con 9 μM y 6.5 μM de BAP combinados con 2.2 μM de 2-ip, no se observó la vitrificación de los brotes. Esto posiblemente se debe a que este ritmo de inmersión permite mantener un estado hídrico adecuado que en combinación con la dosis de BAP y 2-ip suministradas favorece la formación de los brotes. Otra de las ventajas que representa el uso de RITA® en la micropropagación de caoba se manifiesta en la ausencia de callo fenolizado en los explantes y en la formación de hojas de buena apariencia morfológica en términos de color, forma y consistencia, posiblemente porque los fenoles se diluyen e hidrolizan en el medio de cultivo, no quedando estos en contacto permanente con el tejido. Además no se observa la caída de las hojas, como se da en algunos casos en medios semi-sólidos. Esto posiblemente tiene relación con el intercambio gaseoso que se genera entre el interior y el exterior del recipiente y en consecuencia al cambio de atmósfera dentro del mismo, lo que permite un intercambio de CO_2 en las hojas del brote. Estas ventajas facilitan el uso de explantes más pequeños y también su reciclaje después de obtener los brotes, lo que contribuye a maximizar la fase de multiplicación. Este sistema es eficiente en otras especies leñosas como *Coffea arabica* y *C. canephora* (Teisson *et al*, 1995), donde la microreproducción por estacas se realiza a partir de la inducción con citocininas de yemas axilares de ejes ortotrópicos. La multiplicación está asegurada por subdivisión sucesiva de los rebrotes ortotrópicos con lo cual, se logra un coeficiente de multiplicación de 6 a 7 cada tres meses. Este óptimo se ha logrado con un ritmo de inmersión de cuatro veces por día durante 15 minutos. Asimismo, el uso de la inmersión temporal en la embriogénesis somática de estas especies ha mejorado la cantidad y la calidad de los embriones obtenidos, básicamente en el tamaño de los cotiledones, lo cual permite una buena actividad fotosintética y en consecuencia el traslado directo al invernadero (Etiene *et al*, 1997b). En *Hevea brasiliensis*, durante la embriogénesis somática a partir de callo friable se logró una producción de embriones 15 veces más numerosa y de calidad muy superior que en medio semi-sólido. Esta técnica también tiene un efecto positivo en la frecuencia de germinación de los embriones somáticos y en el desarrollo simultáneo de la raíz y el epicotilo (Etiene *et al*, 1997).

Los brotes obtenidos en el medio semi-sólido presentaron la ventaja de un rápido crecimiento en comparación con los obtenidos en el medio líquido; sin embargo, en cuanto a porcentaje y tiempo de brotación, ambos sistemas son similares. La facilidad que presenta el sistema RITA® para el cambio de medio y la posibilidad de obtener brotes mejor formados en el aspecto morfológico dadas las características de ambiente físico que presenta, es prometedor para la micropropagación de caoba. Estudios más detallados para mejorar la altura de los brotes en un tiempo más corto y el número de explantes que se pueden colocar por recipiente favorecerán la aplicación de este sistema para la obtención de brotes múltiples de buena calidad. Estos estudios pueden ser sobre el uso de bajas concentraciones de auxinas en combinación con las concentraciones óptimas de citocininas encontradas en este trabajo, además de frecuencias y tiempos de inmersión muy cercanos a los que mejor respondieron, para obtener mejor altura de los brotes en corto tiempo.

5.3. Fase de desarrollo

Esta fase es de gran importancia para mejorar el desarrollo de brotes como etapa previa de acondicionamiento para la formación de raíces en brotes de caoba. Algunas veces es muy difícil enraizar los brotes después de la multiplicación *in vitro* debido a los excesos de citocininas usados en la fase de multiplicación o a la presencia de inhibidores endógenos. La eliminación de estos factores puede realizarse mediante la transferencia de los brotes por a un medio libre de hormonas por un período corto, antes de exponerlos a la auxina que estimulará el enraizamiento (Krikorian, 1995). En caoba, el pasaje de los brotes por un medio de desarrollo (WPM) durante 20 días permitió mejorar sus características morfológicas, específicamente el alargamiento del eje y el desarrollo de hojas, las cuales presentan una coloración verde brillante, muy diferente a la que presenta el brote durante la fase de multiplicación; además se evitó la formación de callo en la base de los brotes. También en otras especies se ha demostrado que estos cambios se traducen en una mayor capacidad de los brotes al enraizamiento *in vitro*. Shibata *et al* (1996), también observaron que durante la micropropagación de *Croton sublyratus* el paso de los brotes por una fase de desarrollo antes del enraizamiento, provocó el alargamiento de éstos, favoreciendo su aptitud al enraizamiento. Los otros medios evaluados durante esta fase no permitieron un buen

desarrollo de los brotes, posiblemente por presentar reguladores de crecimiento, aún en bajas concentraciones, específicamente citocininas

El WPM tiene la característica de clasificarse como intermedio en el contenido de sales en comparación con otros medios, como el medio de Driver y Kuniyuki (DKW) utilizado en especies maderables, el cual es alto en sales. Los cambios en la composición y concentración de las sales nutritivas de los medios de cultivo, además de influenciar su constitución orgánica, pueden afectar las relaciones hídricas del medio (Preece, 1995). Los resultados obtenidos pueden también ser el producto de la acción del carbón activado presente en el medio de cultivo, el cual removió las citocininas utilizadas durante la fase de multiplicación. El carbón activado es adicionado al medio principalmente para absorber los exudados no deseados; sin embargo, también podría remover algunas sustancias químicas esenciales del medio como auxinas, citocininas y ácido abscísico. Sin embargo, los resultados varían mucho dependiendo de la especie y el tejido utilizado (Bonga y Aderkas, 1992). Por ejemplo, Biondi *et al.*, (1984) utilizando brotes de *Alnus in vitro* demostraron que el carbón activado no favorece la eliminación de BAP o sus metabolitos del tejido.

5.4. Fase de enraizamiento

El enraizamiento secuencial *in vitro* de brotes, es muy utilizado en otras especies como *Hevea brasiliensis*, para aumentar la capacidad rizogénica de los mismos (Perrin *et al.*, 1994). Un procedimiento similar fue empleado en brotes de caoba, para mejorar la baja aptitud de éstos al enraizamiento *ex vitro*. Efectivamente, el enraizamiento *in vitro* fue favorecido mediante la aplicación de un choque auxínico inicial, constituido de altas concentraciones de auxina y bajas concentraciones de citocinina por corto tiempo, seguido de una reducción considerable de éstos durante la fase de expresión y crecimiento de raíces. El estímulo necesario para el enraizamiento de estos brotes, fue el uso de concentraciones elevadas de estos reguladores durante la fase de inducción, tal como fue utilizado para el enraizamiento de microestacas de café *ex vitro* (Berthouly *et al.*, 1987); contrariamente al enraizamiento de *Hevea* (Perrin *et al.*, 1994) donde se utilizaron concentraciones de ANA y AIB mucho más débiles (26.8 μM y 24.6 μM). Los altos porcentajes de enraizamiento

obtenidos, así como también el número y longitud de raíces producidas, demostraron la efectividad no sólo del procedimiento de enraizamiento utilizado, sino también de la integración de una etapa previa de desarrollo de los brotes o fase de acondicionamiento, antes del enraizamiento. Estudios realizados por Jourdan *et al* (1992) en *Hevea brasiliensis* muestran que durante esta fase de acondicionamiento, tanto los tejidos del tallo como de la corteza, se diferencian al mismo tiempo que se intensifica el proceso de lignificación. Esto es acompañado de una acumulación de almidón en la zona de diferenciación de los primordios radicales, por lo que se presume que éstas reservas son utilizadas durante la formación de raíces. Bajo estas condiciones brotes de 2 cm de altura lograron enraizar en un 85%.

En gran número de especies está bien documentado el uso de diferentes auxinas como inductoras del enraizamiento *in vitro*. Las combinaciones de AIB y ANA se han utilizado para inducir el enraizamiento de especies leñosas como cacao, en la cual se logró un 33% de enraizamiento con un promedio de 2.6 raíces por brote (Passey y Jones, 1993); mientras que en especies como *Eucalyptus* y *Banksia sp*, sólo la presencia de AIB estimula la formación de raíces (Niccol *et al*, 1995). El hecho de pasar los brotes de un periodo de inducción corto y fuerte en auxina, a un medio de expresión con una reducción en auxina casi del 10%, para finalizar en un medio ausente de reguladores de crecimiento, con sales reducidas a la mitad y presencia de carbón activado; además de un buen porcentaje de enraizamiento, permite la formación de una vitroplanta de caoba con características adecuadas para su aclimatación.

Un estudio más profundo de las etapas de enraizamiento, específicamente en el medio de expresión de raíces, podría mejorar el porcentaje de enraizamiento *in vitro* y la calidad de las raíces formadas. Sin embargo, los resultados actualmente obtenidos revelan el potencial del proceso utilizado el cual permitió un 70% de brotes enraizados con un promedio de 2.13 raíces por planta, comparado con el 50% de enraizamiento obtenido en las estacas juveniles en vivero (Mesén *et al*, 1992).

5.5. Fase de aclimatación.

Los primeros ensayos de aclimatación de vitroplantas de caoba muestran un porcentaje de sobrevivencia del 27% para un total de 48 plantas después de 60 días en el invernadero. Estos resultados son alentadores si los comparamos con otras especies. Por ejemplo en *Quercus robur* L., de un total de 564 plantas, únicamente el 21% sobrevivió después de cuatro meses en invernadero (Meier-Dinkel *et al*, 1993). La eliminación de la tapa de los tubos antes de la aclimatación, posiblemente permitió el endurecimiento de las plantas y en consecuencia mejoró la tasa de sobrevivencia durante la aclimatación. Se puede pensar que esta etapa previa de endurecimiento prepara a las vitroplantas a estimular el autotrofismo y determina los cambios en la morfología de la hoja (Dunstan y Turner, 1984).

La transición entre el ambiente *in vitro*, con un 100% de humedad relativa, a un ambiente *ex vitro* con un porcentaje de humedad menor, es un factor crítico para la sobrevivencia de las plántulas. Además las plántulas *in vitro* viven en un ambiente heterótrofo, donde el medio de cultivo suple los azúcares y otros nutrientes para su desarrollo. Las hojas de éstas plántulas, a pesar de ser verdes, probablemente no son completamente activas para fotosintetizar, no poseen capa cerosa, ni cutícula lo que las hace más susceptible durante la fase de aclimatación (Ahuja, 1993).

Una vez que las plantas son aclimatadas, su estructura morfológica cambia, las raíces no funcionales producidas *in vitro* no funcionales son sustituidas en el ambiente exterior por nuevas raíces, con pelos radicales que facilitan la absorción. Las nuevas hojas también sufren una etapa de transición para las nuevas condiciones ambientales. Aeschbacher *et al* (1994), manifiestan que las raíces de las plantas pueden modificar su desarrollo en respuesta al estímulo ambiental, como son la luz, el contacto y la gravedad. Como consecuencia de la percepción de signos externos las plantas sufren una alteración en la regulación de los genes y/o de proteínas, y en consecuencia en la modificación de los programas de división, crecimiento y diferenciación celular.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante el establecimiento de un sistema de propagación de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de microestacas *in vitro* se concluye:

1. El cultivo de microestacas de plántulas de caoba germinadas *in vitro*, permitió establecer un primer sistema de micropropagación básico para apoyar los programas de mejoramiento genético de esta especie que tienen como fin la resistencia a *Hymenolepis*. Esta metodología puede ser utilizada para la clonación con el objetivo de uniformizar genéticamente el material experimental.
2. Para la multiplicación *in vitro* de yemas axilares de plántulas de caoba, la mejor fuente de explantes primarios son las yemas cotiledonares; sin embargo, las yemas de la escama foliar y del nudo eofilar también pueden ser utilizadas para aumentar la tasa de multiplicación de un mismo genotipo.
3. La presencia de los cotiledones en el explante de nudo cotiledonar (explante primario), es determinante para la obtención de brotes con mejores características morfológicas y fisiológicas para iniciar el establecimiento *in vitro*.
4. La influencia de la edad de la plántula no constituye un factor determinante para iniciar el cultivo primario. El aislamiento del nudo cotiledonar puede realizarse en un período de 2 a 6 semanas después de la siembra de la semilla, permitiendo la disminución del ciclo de cultivo.
5. La posibilidad de subcultivar o reciclar el nudo cotiledonar (explante primario) permite que éste explante sea una fuente importante para la producción de explantes secundarios, favoreciendo la producción de nuevos ciclos de multiplicación, alternos a los ya establecidos.

6. La orientación del explante secundario (nudo de escama foliar) influye en el potencial de brotación y la altura de los brotes. La mejor forma de cultivo del explante es en posición horizontal sobre la superficie del medio.
7. El tamaño del explante también es un factor determinante. Se obtienen mejores resultados cuando el explante de la escama foliar es cultivado como microestaca de dos yemas que en forma de microestaca de una sola yema.
8. La mejor tasa de multiplicación en medios semi-sólidos se obtiene con una combinación de 6.5 μM de BAP y 2.2 μM de 2-ip. Estos brotes presentan características morfogénicas adecuadas para continuar con la multiplicación *in vitro*.
9. Para el cultivo de microestacas en medio líquido bajo el sistema de inmersión temporal (RITA®), los tiempos de inmersión de 3 minutos cada 3 o 5 días son los más adecuados para continuar los estudios de multiplicación de caoba a partir de yemas de la escama foliar, provenientes de brotes cotiledonares, debido a que este ritmo de inmersión permite una mejor respuesta morfogénica en el brote.
10. El reciclaje del explante secundario (yemas de la escama foliar), utilizado para la multiplicación, es posible tanto en medios gelificados como en medios líquidos en inmersión temporal, lo cual puede favorecer las tasas de multiplicación.
11. La utilización de una fase de desarrollo o de acondicionamiento de los brotes obtenidos en la multiplicación, previa al enraizamiento favorece el desarrollo de raíces de la vitroplanta de caoba.
12. Con el enraizamiento secuencial *in vitro* de brotes de caoba utilizando altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas por un período corto en la oscuridad, permite obtener altos porcentajes de brotes enraizados, con raíces de buenas características que permiten mayor sobrevivencia de las vitroplantas en el invernadero.

13. La eliminación de la tapa de los tubos 3 días antes del traslado de las vitroplantas al invernadero y las condiciones proporcionadas por una cámara plástica conteniendo un sistema de riego con agua en gotas finas, favorecen su adaptación a condiciones normales de invernadero.

Esta investigación constituye uno de los trabajos pioneros en el campo de la micropropagación de especies forestales en el CATIE. Específicamente, el interés de desarrollar estas metodologías en *Swietenia macrophylla* corresponde sólo a un pequeño componente dentro de lo que podría ser toda una estrategia de mejoramiento que tenga como objetivo final desarrollar un plan de manejo de la plaga *Hypsipyla grandella*, que permita en consecuencia, el establecimiento de plantaciones comerciales de caoba de manera sostenible.

En la Fig. 14 se propone un esquema hipotético de las posibles contribuciones de la biotecnología, básicamente de la micropropagación dentro de un programa de mejoramiento genético para caoba. En primera instancia la utilidad de la micropropagación de caoba dentro de un esquema de mejoramiento estaría enmarcada en la producción de clones para el establecimiento de ensayos clonales y también como fuente de material genéticamente uniforme para otros tipos de experimentos.

Por otra parte, la estrategia de investigación relacionada a la búsqueda de resistencia a *Hypsipyla* estaría orientada hacia la obtención de ganancia genética a partir de una amplia base genética y no de material genéticamente uniforme. En este sentido, la propagación a partir de semilla es perfectamente válida para el suministro de materiales utilizados en la búsqueda de genes de resistencia.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda en futuras investigaciones:

1. Estudiar la composición química de los cotiledones de la semilla de caoba con el fin de tener elementos para formular un medio de cultivo adecuado para el subcultivo de explantes de yemas cotiledonares y así poder aumentar el potencial de estas yemas como fuente de explantes secundarios.
2. Realizar más ciclos de multiplicación utilizando las mejores combinaciones de BAP y 2-ip, las yemas de la escama foliar y de las dos primeras eofilas del brote cotiledonar.
3. Continuar investigando con el sistema de inmersión temporal en la multiplicación a partir de yemas de los brotes cotiledonares, utilizando como referencia los tiempos y frecuencias de inmersión, así como también la combinación y concentraciones de citocininas aquí recomendados.
4. Estudiar la combinación de BAP, 2-ip y el uso de mínimas concentraciones de ANA para encontrar un medio de multiplicación que permita obtener brotes de mayor altura para mejorar los valores obtenidos en este estudio.
5. Utilizar este método de micropropagación con material de campo, para lo cual se pueden utilizar como fuente de explantes injertos o estacas enraizadas en condiciones controladas (vivero) a fin de obtener yemas más juveniles y controlar la contaminación (Fig. 14)
6. Este método de micropropagación puede ser utilizado para la clonación de material procedente de semilla genéticamente mejorada o de árboles élites de huertos semilleros o de cruces de alto valor combinatorio específico, con el fin de acelerar su multiplicación, realizar la producción en masa o para realizar investigaciones de conservación *in vitro*.
7. Estudiar las células de aparente función secretora presentes en los diferentes tipos de explantes de caoba. Hipotéticamente estas células podrían estar asociadas a la secreción de sustancias de mecanismos de atracción o toxicidad para *Hypsipyla*.

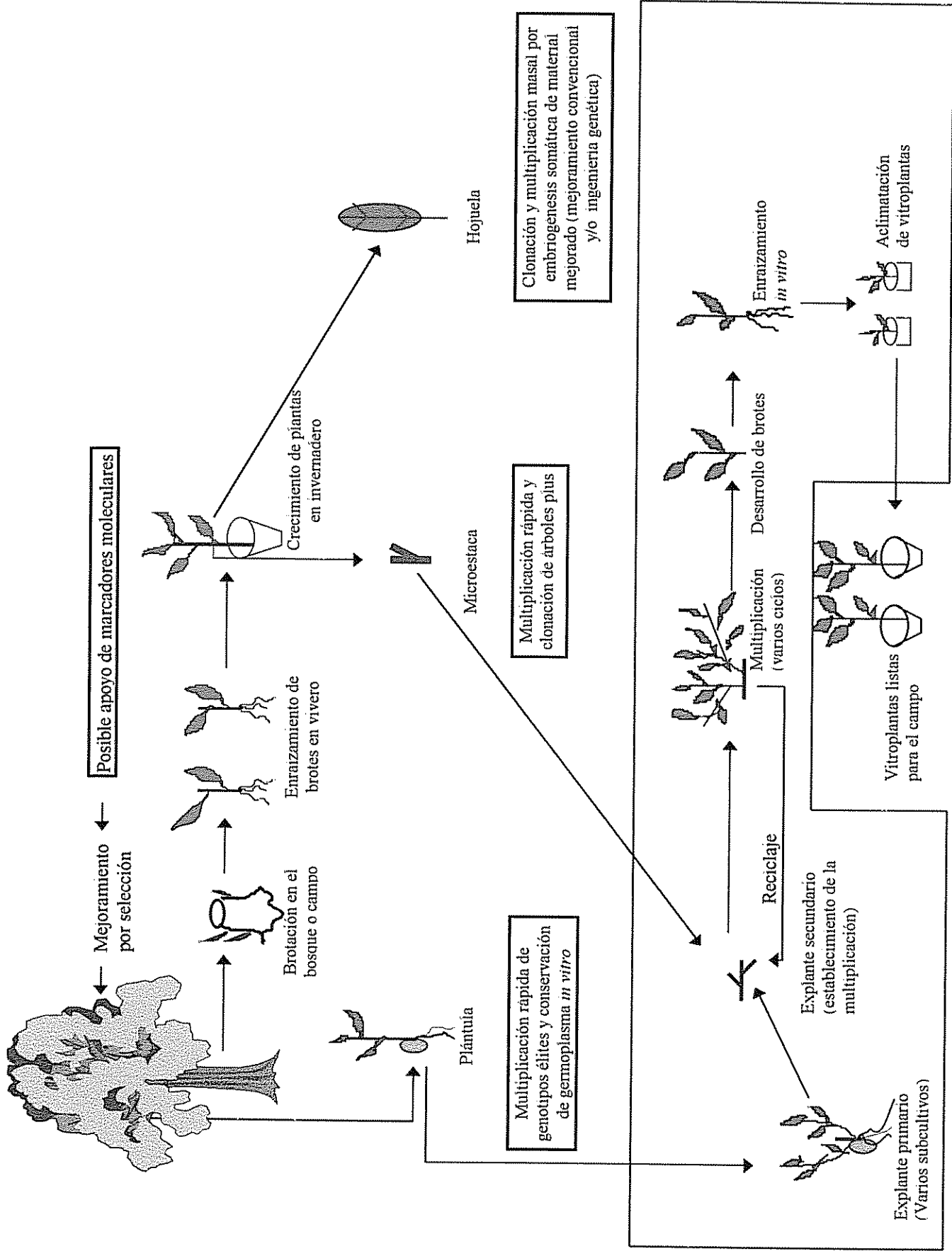


Fig. 14. Posibles contribuciones de la biotecnología en los programas de mejoramiento genético de caoba (*Swietenia macrophylla*) en el CATIE (— trabajo desarrollado en tesis)

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AESCHBACHER, R.G.; SCHIEFELBEIN, J.W.; BENFEY, P.N. 1994. The genetic and molecular basis of root development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:25-45.
- AGUILAR, M.E.; VILLALOBOS, V.M.; VASQUEZ, N. 1992. Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 15-19.
- _____. 1996. Le microbouturage du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.): identification et etude de quelques facteurs limitants de la reactivite des explants. These, de Doctorat de L'Institut National Polytechnique de Toulouse. Francia. 187 p.
- ALEMNNO, L. 1995. Emrbiogenese somatique du cacaoyer *Theobroma cacao* L.: Contraites, progres et perspectives. These, de Doctorat de Universite Montpellier II. Francia. 193 p.
- ALVARENGA, S.; FLORES, E.M. 1988. Morfología y germinación de la semilla de caoba, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Rev. Biol. Trop.* 36(2A): 261-267.
- AHUJA, M.R. 1993. Micropropagation á la carte. *In* Ahuja, M.R. Micropropagation of wood plants. Netherlands. Kluwer Academic Publishers p. 1-8.
- ALVARD, C.; COTE, F.; TEISSON, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:55-60.
- ARAUJO, V.C. DE. 1971. Sobre a germinacao do mungo (Aguano) *Swietenia macrophylla* King. *Acta Amazónica* 1(3):59-69.
- BARVE, D.M.; MEHTA, A.R. 1993. Clonal propagation of mature elite rees of *Commiphora wightii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35:237-244.
- BASSE KRÜGER, M.H. 1992. Estudio y elaboración de fichas técnicas de especies de importancia forestal en zonas tropicales. Madrid, s.e. 234p.
- BEHM, A.; BECKER, A.; DÖRFLINGER, H.; FRANKE, A.; KLEINSCHMIT, J.; MELCHIOR, G.H.; MUHS, H.J.; SCHMITT, H.P.; STEPHAN, B.R.; TABEL, U.; WEISGERBER, H.; WIDMAIER, TH. 1997. Concept for the conservation of forest genetic tesources in the federal Republic of Germany. *Silvae Genetica* 46(1):24-34.
- BERTHOULY, M.; GUZMANN, N.; CHATELET, P. 1987. Micropropagation *in vitro* de differents ligness of *C. arabica* var. Catimor. Colloque International sur le Café. 6-10 juillet, Montreux (Suisse).

- BINNS, A N. 1994. Cytokinin accumulation and action: Biochemical, genetics, and molecular approaches. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:173-196.
- BIONDI, S.; CANCIANI, L.; BAGNI, N. 1984. Uptake and translocation of benzyladenina by elm shoots cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* 62:2385-2390.
- BHANSALI, R.R. 1993. Bud culture for shoot multiplication and plantlet formation of *Tecomella undulata* (Rohida), a woody tree of the arid zone. *Trop. Sci.* 33:1-8.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. 1981. Aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106(4):515-518.
- BONGA, J.M.; ADERKAS, P. VON. 1992. *In vitro* culture of trees. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 236 p. (Forestry Sciences, N. 38)
- BURLEY, J. 1987. Applications of biotechnology in forestry and rural development. *Common For. Rev.* 66(4):356-367.
- CARRON, M.P.; ENJALRIC, F. 1985. Embryogenese somatique a partir du tegument interne de la graine d' *Hevea brasiliensis* (Kunth., Müll. Arg.). *C.R. Acad. Sc. Paris.* (III) 300:653-658
- CHALMERS, K.J.; NEWTON, A.C.; WAUGH, R.; WILSON, J.; POWELL, W. 1994. Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 89:504-508.
- CHELIAK, W.M.; ROGERS, D.L. 1990. Integrating biotechnology into tree improvement programs. *Can. J. For. Res.* 20:452-463.
- CHEN, D.M.; De FILIPPIS, L.F. 1996. Application of genomic DNA and RAPD-PCR in genetic analysis and fingerprinter of various species of woody tree. *Autralian Forestry* 59(1):46-55.
- CHEN, H.J.; BOLLMARK, M.; ELIASSON, L. 1996. Evidence that cytokinin controls bud size and branch form in *Norway spruce*. *Physiologia Plantarum* 98:612-618.
- CONGER, B.V. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Florida, CRC PRESS. 267 p.
- CORNELIUS, J. 1995. La biotecnología y los recursos genéticos forestales. Curso internacional sobre biotecnología vegetal y su aplicación a la conservación y uso de los recursos genéticos. CATIE - FAO - IPGRI. 24 abril al 5 de mayo de 1995.

- COSTA, F.; PEREIRA LOURO, R.; DODWORTH MACHADO, R. 1992. A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura insignis* plantlets cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 109-113
- DAS, A.B.; ROUT, G.R.; DAS, P. 1995. *In vitro* somatic from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. *Plant Cell Reports* 15:147-149.
- DHAWAN, V.; BHOJWANI, S.S. 1985. *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Plant Cell Reports* 4:315-318.
- DIRR, M.A.; HEUSER, C.W. 1987. The reference manual of woody plant propagation. From seed to tissue culture, Georgia. Varsity Press. P. 63-78
- DONNELLY, D.J.; TISDALL, L. 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In Ahuja, M.R. *Micropropagation of wood plants*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 153-166.
- DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: Influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40:231-235.
- DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E. 1984. The acclimatization of micropropagated plants. In Vasil, I.K. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. New York, Academic press. v 1, p. 123-129.
- DUKE, J.A. 1969. On tropical tree seedlings. I. Seeds, seedlings, systems and systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 56(2):125-161.
- DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAY, M.; FRANCIET, A. 1982. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In Bonga, J.M.; Durzan, D.J. *Tissue culture in forestry*. Netherlands Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. p. 36-71. (Serie Forestry Science)
- ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.; CARRON, M.P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. 1997a. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll., Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell Dev Biol.* 33:81-87.
- ETIENNE, H.; SOLANO, W.; PEREIRA, A.; BARY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; COTE, F.; BERTHOULY, M. 1997. Utilización de la embriogénesis somática en medio líquido para la propagación de los híbridos F1 de *Coffea arabica*. In Simposio Latinoamericano de Caficultura (18, San José, C.R., 1997). *Memorias Comps. J. Echeverri; L. Zamora*. San José, C.R. EDITORAMA. P. 253-261. (Serie de ponencias, resultados y recomendaciones de eventos técnicos).

- FILLOY, S ; JANICK, J 1987. Proliferation and rooting of cotyledonary nodal shoots of Cacao. Proc. Interam. Soc. Trop. Hort. 31:72.
- FLYGH, G ; GRONROOS, R ; ARNOLD, S.V. 1993. Induction, rooting, and growth capacity of adventitious shoots of *Pinus contorta*. Can. J. For. Res. 23:1907-1916.
- FRANCLET, A. 1979. Rajeunissement des arbres en vue de leur propagation végétative. Annales AFOCEL 12:3-17.
- GARNER, R.J. 1983. Manual del injertador Trad. por Julio Corderas Y. Descarrega. Madrid, Ediciones Mundi Prensa. 335 p.
- GERHARDT, K. 1994. Seedling development of four tree species in secondary tropical dry forest in Guanacaste Costa Rica. Thesis. Uppsala, Sweden, Uppsala University 43 p.
- GILL, M.I.S ; SINGH, Z. ; DHILLON, B.S ; GOSAL, S.S. 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Scientia Horticulturae 63:167-174.
- GJULEVA, V ; ATANASOV, A. 1994. Micropropagation of *Platanus acerifolia* in vitro. Silvae Genetica 43(4):215-218.
- GOYAL, Y ; BINGHAM, R.L. ; FELKER, P. 1985. Propagation of the tropical tree, *Leucaena leucocephala* K67, by in vitro bud culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 4:3-10.
- GREENWOOD, M.S. 1987. Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regulation. 6:1-12.
- GUEILFUS, F. 1994. El árbol al servicio del agricultor. Manual de agroforestería para el desarrollo rural. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 414-415.
- GUEVARA, R. 1996. Estrategias integradas de abastecimiento de semillas forestales. Boletín Mejoramiento Genético y Semillas Forestales (PROSEFOR) 14:2.
- HADRAMI, E.L. ; CARRON, M.P. ; D'AUZAC, J. 1991. Influence of exogenous hormones on somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Annals of Botany 67:515-518.
- HAINES, R. 1990. La biotecnología en el mejoramiento de las especies arbóreas forestales: tendencias y prioridades de la investigación. Unasilva 163(41):46-52.
- HAINES, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvement. With special reference to developing countries. FAO Forestry Paper N° 118. 230 p.

- HAINES, R.; MARTIN, B.E. 1995. Biotechnology and the sustainable production of tropical timber. International Tropical Timber Organization (ITTO). 168 p.
- HAMMATT, N.; RIDOUT, M.S. 1992. Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13:67-74.
- HARTNEY, V.J. 1980. Vegetative propagation of the *Eucalyptus*. Aust. For. Res. 10:191-211.
- HARTNEY, V.J.; SVENSSON, J.G.P. 1992. The role of micropropagation for Australian tree species. In: Baker, F.W.G. Rapid propagation of fast-growing woody species. Wallingford, UK, C.A.B. International. p. 7-28.
- HARRY, I.S.; LU, C-Y.; SHARMA, K.K.; THORPE, T.A. 1994. Micropropagation of western hemlock (*Tsuga heterophylla* Raf. Sarg.) from embryonic explants. New Forests 8:1-13.
- HAYWARD, A.C. 1974. Latent infections by bacteria. Ann. Rev. Phytopathol 12:87-97.
- HEINZE, B.; WESTCOTT, R.; SCHMIDT, J.; GLOSSL, J. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genetic variation in Norway spruce. New Forests 11:173-184.
- HERNANDEZ, A. 1960. Condiciones ecológicas de la caoba (*Swietenia macrophylla*), en las selvas de la Península de Yucatan. Revista Chapingo 82:169-175.
- HOLLAND, M.A.; POLACCO, J.C. 1994. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant?. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45:197-209.
- HUANG, L.CH.; LIUS, S.; HUANG, B.L.; MURASHIGE, T.; MAHDI, E.F.M.; GUNDY, R.V. 1992. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. Plant Physiol. 98:166-173.
- IKEMORE, Y.K. 1987. Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for *in vitro* culture. Commonw. For. Rev. 66(4) 351-356.
- JOURDAN, C.; ENJALRIC, F.; LARDET, L.; MICHAUX-FERRIERE, N.; BERGER, A.; CARRON, M.P. 1992. Caracteristiques hydriques et histologiques de vitroplants d'*Hevea brasiliensis* (Müll.-Arg.) en cours de micropropagation. C.R. Acad. Sci. Paris. 315:395-401.
- KAVERIAPPA, K.M.; PHILLIPS, L.M.; TRIGIANO, R.N. 1997. Micropropagation of flowering dogwood (*Cornus florida*) from seedlings. Plant Cell Reports. 16:485-489.

- KEIL, M.; GRIFFIN, A.R. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor Appl Genet* 89:442-450.
- KORLACH, J.; ZOGLAUER, K. 1995. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of european larch (*Larix deidua* Mill). *Plant Cell Reports* 15:242-247.
- KRIKORIAN, A.D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. In: Roca, W.M.; Mroginski, L.A. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. p. 95-125.
- _____. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In Davis, P.J., (ed). Plant hormones. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 774-796.
- LAKSHMANAN, P.; LEE, C.L.; GOH, C.J. 1997. An efficient *in vitro* method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. *Plant Cell Report* 16:572-577
- LAKSHMI SITA, G. 1993. Micropropagation of *Eucalyptus*. In Ahuja, M.R. (ed). Micropropagation of woody plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 263-280
- LARDET, L. 1997. Comunicación personal escrita. CIRAD, Francia.
- LARDET, L.; AGUILAR, M.E.; MICHAUX-FERRIERE, N.; BERTHOULY, M. 1997. Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured *in vitro*. (En prensa)
- LAMB, F.B. 1966. Mahogany of tropical America. Its ecology and management. Michigan, University of Michigan. 219 p.
- LEAKEY, R.R.B. 1983. Stockplant factors affecting rooting in cuttings of *Triplochiton scleroxylon* K. Schum., an indigenous hard wood of West Africa. *Journal of Horticultural Science* 58(2):277-290.
- LEAKEY, R.R.B. 1987. Clonal forestry in the tropics - a review of developments, strategies and opportunities. *Commonw. For. Rev.* 66(1):61-75.
- LEE, H.Y. 1967. Studies in *Swietenia* (Meliaceae): observations on the sexuality of the flowers. *Journal of the Arnold Arboretum* 48:101-104.
- LEE, S.K.; RAO, A.N. 1988. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King through tissue culture. *Gard Bull.* 4(1):11-18

- LEIFERT, C.; RITCHIE, J.Y.; WAITES, W.M. 1991. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7:452-469.
- LEINHOS, V.; SAVIDGE, R.A. 1993. Isolation of protoplasts from developing xilem of *Pinus banksiana* and *Pinus strobus*. *Can. J. For. Res.* 23:343-348.
- LESLIE, C.; McGRANAHAN, G. 1992. Micropropagation fo Persian Walnut (*Juglans regia* L.). In Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and Forestry* 18. High-Tech and Micropropagation II. Springer-Veriag. 137-150 p.
- LINDSEY, K.; TOPPING, J.F. 1993. Embriogénesis: a question of pattern. *Journal of Experimental Botany* 44(259):359-374.
- LITTLE, E.L. 1967. *Arboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes*. Puerto Rico, Editorial Universidad de Puerto Rico. p. 359-364.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. 1980. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.
- LYHR, K.P. 1992. *Mahogany. Silviculture and use of American Mahogany (Swietenia spp.)*. The Royal Veterinary and Agricultural University. 89 p.
- MANZANERA, J.A.; ASTORGA, R.; BUENO, M.A. 1993. Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. *Silvae Genetica* 42(2-3):90-97.
- MARGARA, J. 1988. *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro*. Madrid. Mundi-Prensa, 232 p.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. 1989. Screening of suitable of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Perú-Amazon forest. *Journal of Agricultural Science (Japon)* 33(4):252-260.
- MASCARENHAS, A.F.; KENDURKAR, S.V.; KHUSPE, S.S. 1992. Micropropagation of teak. In Ahuja, M.R. *Micropropagation of woody plants*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 247-258.
- MEIER-DINKEL, A. 1992. Micropropagation of Birches (*Betula spp.*). In Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and Forestry* 18. High-Tech and Micropropagation II. Springer-Veriag. p. 41-81.

- MEIER-DINKEL, A.; BECKER, B.; DUCKSTEIN, D. 1993. Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* L. *Ann. Sci. For.* 50(1):319s-322s.
- MERKLE, S.C.; DAYTON WILDE, H.; SOMMER, H.E. 1993. *In vitro* culture of *Liriodendron tulipifera*. In Ahuja, M.R. Micropropagation of wood plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 281-315.
- MESEN, F.; LEAKEY, R.R.R.B.; NEWTON, A.C. 1992. Hacia el desarrollo de técnicas de silvicultura clonal para el pequeño finquero. *El Chasqui* 28:6-18.
- MIHALJEVIC, S.; STIPKOVIC, S.; JELASKA, S. 1996. Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria. *Plant Cell Reports* 15:610-614.
- MINOCHA, S.C. 1987. Plant growth and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. In Bonga, J.M.; Durzan, J. Cell and tissue culture in forestry. General principles and biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers. p. 50-66.
- MILLAR, C.I. 1987. Experiments in rooting bishop pine (*Pines muricata* D. Don) cuttings. *New Forests* 3:231-238.
- MOHAMMED, G.H.; PATEL, K.R. 1989. Tissue culture micropropagation of Douglas-fir. *New Forests* 3:125-139.
- MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B. 1990. *In vitro* propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (Caricaceae) var. Honey Dew. *Plant Cell Reports* 8:609-612.
- MONTEUUIS, O. 1995a. Influence of the grafting technique on meristem micrografting of Douglas-fir. *New Forests*. 10:267-273.
- _____. 1995b. *In vivo* and grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. *Silvae Genetica* 44(4):190-193.
- MOSELLA, L.C.; ASCUI, M. 1991. Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*. In Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.
- MOTT, R.L. 1981. Arboles. In Conger, B.V. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press. p. 217-254.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: Roca, W.M.; Mroginski, L.A. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. p. 19-40.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:53-58.
- NAGAMNI, R.; DINER, A.M.; SHARMA, G.C. 1993. Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). *Can. J. For. Res.* 23:873-876.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(5):471-479.
- NEWTON, A.C.; BARKER, P.; RAMNARINE, S.; MESEN, J.F.; LEAKEY, R.R.B. 1993. The mahogany shoot borer: prospects for control. *Forest Ecology and Management* 57:301-328.
- NICCOL, R.J.; REGAN, P.A.; FILIPPIS, L.F. De. 1995. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalytus* and *Banksia* species. *Australian Forestry* 57(4): 143-147.
- OLOFINBOBA, M.O. 1975. Studies on seedlings of *Theobroma cacao* L., variety F₃ Amazon. 1. Role of cotyledons in seedling development. *Turrialba* 25(2):121-127.
- PATNAIK, S.K.; CHAND, P.K. 1997. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. ihou* Kois and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. *Plant Cell Reports* 16:503-508.
- PASSEY, B.; JONES, O.P. 1983. Shoot proliferation and rooting *in vitro* of *Theobroma cacao* L. type amelonado. *Journal of Horticultural Science* 58(4):589-592.
- PATÍÑO, F. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia y cedrela* en los neotrópicos: propuesta para acciones coordinadas. Roma, Italia. 58p.
- PEREZ-PARRON, M.A.; GONZALEZ-BENITO, M.E.; PEREZ C. 1994. Micropropagation of *Frazinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37:297-302.
- PERRIN, Y.; LARDET, L.; ENJALRIC, F.; CARRON, M.P. 1994. Rajeunissement de clones matures d'*Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) par microgreffage *in vitro*. *Can. J. Plant Sci.* 74:623-630.
- PEZESHKI, S.R.; DeLAUNE, R.D. 1994. Rooting of baldeypress cuttings. *New Forests* 8:381-386.

- POUPARD, C.; CHAUVIERE, M.; MONTEUJIS, O. 1994. Rooting *Acacia mangium* cuttings: Effects of age, within-shoot position and auxin treatment. *Silvae Genetica* 43(4):226-230.
- PREECE, J.E. 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(1):26-37.
- PUROHIT, S.D.; DAVE, A. 1996. Micropropagation of *Sterculia urens* Roxb. – an endangered tree species. *Plant Cell Reports* 15:704-706.
- QUEVEDO HURTADO, L. 1986. Evaluación del efecto de la tala selectiva sobre la renovación de un bosque húmedo sub-tropical en Santa Cruz, Bolivia. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE. 221 p.
- RANI, V.; PARIDA, A.; RAINA, S.N. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Reports* 14:459-462.
- RAWAT, M.S.; EMMANUEL, C.J.S.K.; UNİYAL, D.P. 1994. Macropropagation in forestry species. *Indian Forester* 124-137.
- RITCHIE, G.A. 1991. The commercial use of conifer rooted cuttings in forestry: a world overview. *New Forests* 5:247-275.
- ROSERO, N. 1996. Cultivo "in vitro" de *Buddleja incana*. "quishuar". *Forestal Informativo* 12:1-5.
- SALAZAR, R. 1996. Importancia de las fuentes semilleras. *In* Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y de semillas forestales. Unidad 2: Selección y manejo de fuentes semilleras. Curso para Profesores. Mayo 27 al 7 de junio de 1996. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 11p.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. 1994. *Fisiología vegetal*. Trad. Virgilio González Velázquez. México. Iberoamérica. 759 p.
- SAMANIEGO, J.A. 1995. Estandarización de técnicas para el manejo de semillas de *Swietenia macrophylla* y *Cordia alliodora*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 134 p.
- SAN JOSE, M.C. 1986. Influencia de la situación de explanto en la planta y del tamaño del tubo de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Quercus robur* L. *Phyton* 46(1):33-38.
- SARAVITZ, C.H.; BLAZICH, F.A. 1991. *In vitro* propagation of Fraser fir from embryonic explants. *Can. J. For. Res.* 21:404-409.

- SCOTT, E.S.; RAO, A.N.; LOH, C.S. 1995. Preliminary studies of micropropagation of *Hopea odorata*, a dipterocarp tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41:193-196.
- SEGOVIA, R.J., LAING, D.R. 1991. Casa de malla de tipo II para adaptación de las plantas. In Roca, W.M.; Mroginski, L.A.(eds.) *Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia, CIAT. p. 970.
- SEGURA, A.; MARTINEZ, R.; ARIZ, F.; ARGEL, G.; TRIVIÑO, T. 1991. Propagación agámica de seis especies forestales neotropicales en Colombia. Bogotá, Colombia. CONIF. 32p (Serie N° 20).
- SHIBATA, W.; MURAI, F.; AKIYAMA, T.; SIRIPHOL, M.; MATSUNAGA, E.; MORIMOTO, H. 1996. Micropropagation of *Croton sublyratus* Kurz a tropical tree of medicinal importance. *Plant Cell Reports* 16:147-152.
- SHOYAMA, Y.; SASAKI, Y.; NISHIOKA, I.; SUZAKI, T. 1992. Clonal propagation of Oak (*Quercus acutissima* Carruth). In Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and Forestry* 18. High-Tech and Micropropagation II. Springer-Verlag. 179-192 p.
- SIMMONS, A.J.; SKIDMORE, D.I. 1990. The effects of age on the morphology of *Pinus caribaea* and their relation to vegetative propagation. In Gibson, G.L.; Griffin, A.R.; Matheson, A.C. *Breeding tropical trees: Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry*. Oxford, United Kingdom, Oxford Forestry Institute. p 444-445. (Presentado en: IUFRO Conference, 1988, Pattaya, Thailand).
- SKIDMORE, D.I.; SIMONS, A.J.; BEDI, S. 1990. Selection pressures exerted by micropropagation on clones of *Pinus caribaea*. In Gibson, G.L.; Griffin, A.R.; Matheson, A.C. *Breeding tropical trees: Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry*. Oxford, United Kingdom, Oxford Forestry Institute. p 446-447. (Presentado en: IUFRO Conference, 1988, Pattaya, Thailand).
- SNOOK, L.K. 1993. Stand dynamics of Mahogany (*Sweitenia macrophylla* King) and associated species after fire and hurricane in the tropical forests of the Yucatan Peninsula, Mexico. Thesis of Forestry PhD. New Haven, Connecticut, Yale University. p. 173.
- STANDLEY, P. 1946. *Flora of Guatemala*. Chicago, Chicago Natural History Museum. v. 24, part 5, p. 458-459.
- SUTTON, B.C.S.; GROSSNICKLE, S.C.; ROBERTS, D.R.; RUSSELL, J.H.; KISS, G.K. 1993. Somatic embryogenesis and tree improvement in the interior spruce. *Journal of Forestry* Octubre. 34-38 p.

- SZABADOS, L. 1991. Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. *In*: Roca, W.M.; Mroginski, L.A. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. p. 239-270.
- TCHOUNDJEU, Z.; LEAKEY, R.R.B. 1996. Vegetative propagation of African Mahogany: effects of auxin, node position, leaf area and cutting length. *New Forests* 11:125-136.
- TEISSON, C.; ALVARD, D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. *In* Terzi, M. *et al.* (Eds.). Current issues in plant molecular and cellular biology. Netherlands. Kluwer Academic Publishers. p.105-110.
- TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J.V.; ETIENNE, H. 1995. Cultivo *in vitro* por inmersión temporaria: un nuevo recipiente. *Plantations, Recherche, Developpement* 2(5):33-34.
- TREMBLAY, L.; TREMBLAY, M. 1995. Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42:39-46.
- THORPE, T.A.; KUMAR, P.P. 1993. Cellular control of morphogenesis. *In*: Ajuha, M.R. Micropropagation of woody plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 11-19.
- VAARIO, L.-M.; SODA, R. IDE, Y. 1995. *In vitro* plantlet regeneration of *Shorea roxburghii* G. Don. from axillary buds of germinated seedlings. *J. Jn. For. Soc.* 77(3):263-265.
- VALVERDE, L. 1992. Organogénesis *in vitro* en especies forestales promisorias del trópico. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 109 p.
- VERHOEFF, K. 1974. Latent infections by fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 12:99-110.
- VIEITEZ, A.M.; SAN JOSE, M.C.; VIEITEZ, E. 1985. *In vitro* regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. *Journal of Horticultural Science* 60(1):99-106.
- VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In* Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. p. 970.
- VIRISSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R.; UHL, C. 1995. Extraction of a high-value natural resources in Amazonia: the case of mahogany. *Forest Ecology and Management* 72:39-60.

- WANG, Y.; HUANG, M.R.; WEI, Z.M.; SUM, Y.R.; CHEN, D.M.; XU, Z.H.; ZHANG, L.M.; XU, N. 1995. Regeneration of simon poplar (*Populus simonii*) from protoplast culture. *Plant Cell Reports* 14:442-445.
- WARRAG, E.I.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.L. 1990. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. *New Forests* 4(67):67-79.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group *Annals of Botany* 57:443-462.
- WINOGRAD, M. 1995. Indicadores ambientales para Latinoamérica y el Caribe: hacia la sustentabilidad en el uso de tierras. San José, Costa Rica, Proyecto IICA/GTZ, OEA, WRI. 85 p.
- WONG, C.Y. 1989. Vegetative propagation of *Acacia magnium* Wild. by cutting. In Gibson, G.L.; Griffin, A.R.; Matheson, A.C. *Breeding tropical trees: Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry*. Oxford, United Kindong, Oxford Forestry Institute. p. 444-445 (Presentado en: IUFRO Conference 1988, Pattaya, Thailand)
- YAE, B.W.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. 1987. Influence of photoperiod, apical meristem and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. *J Amer. Soc. Hort. Sci.* 112(13):588-592.
- ZOBEL, B. 1992. Vegetative propagation in production forestry. *Journal of Forestry*. 29-33
- ZOBEL, B.; TALBERT, J. 1992. Técnicas de mejoramiento genético en árboles forestales. Trad. Manuel Guzmán Ortiz. México, Editorial Limusa. 545 p.

9. APENDICE

Apéndice 1. Evaluación de diferentes fuentes de citocininas, concentraciones y combinaciones utilizadas durante la fase de multiplicación de caoba (*Swietenia macrophylla* King.) por microestacas.

MEDIOS	CITOCININAS ($\mu\text{M/l}$)		
	BAP	KINETINA	2-ip
MM ₁	2.2		
MM ₂	4.5		
MM ₃	6.5		
MM ₄	9.0		
MM ₅		2.2	
MM ₆			2.2
MM ₇	2.2	2.2	
MM ₈	2.2		2.2
MM ₉	4.5	2.2	
MM ₁₀	4.5		2.2
MM ₁₁	6.5	2.2	
MM ₁₂	6.5		2.2
MM ₁₃	9.0	2.2	
MM ₁₄	9.0		2.2

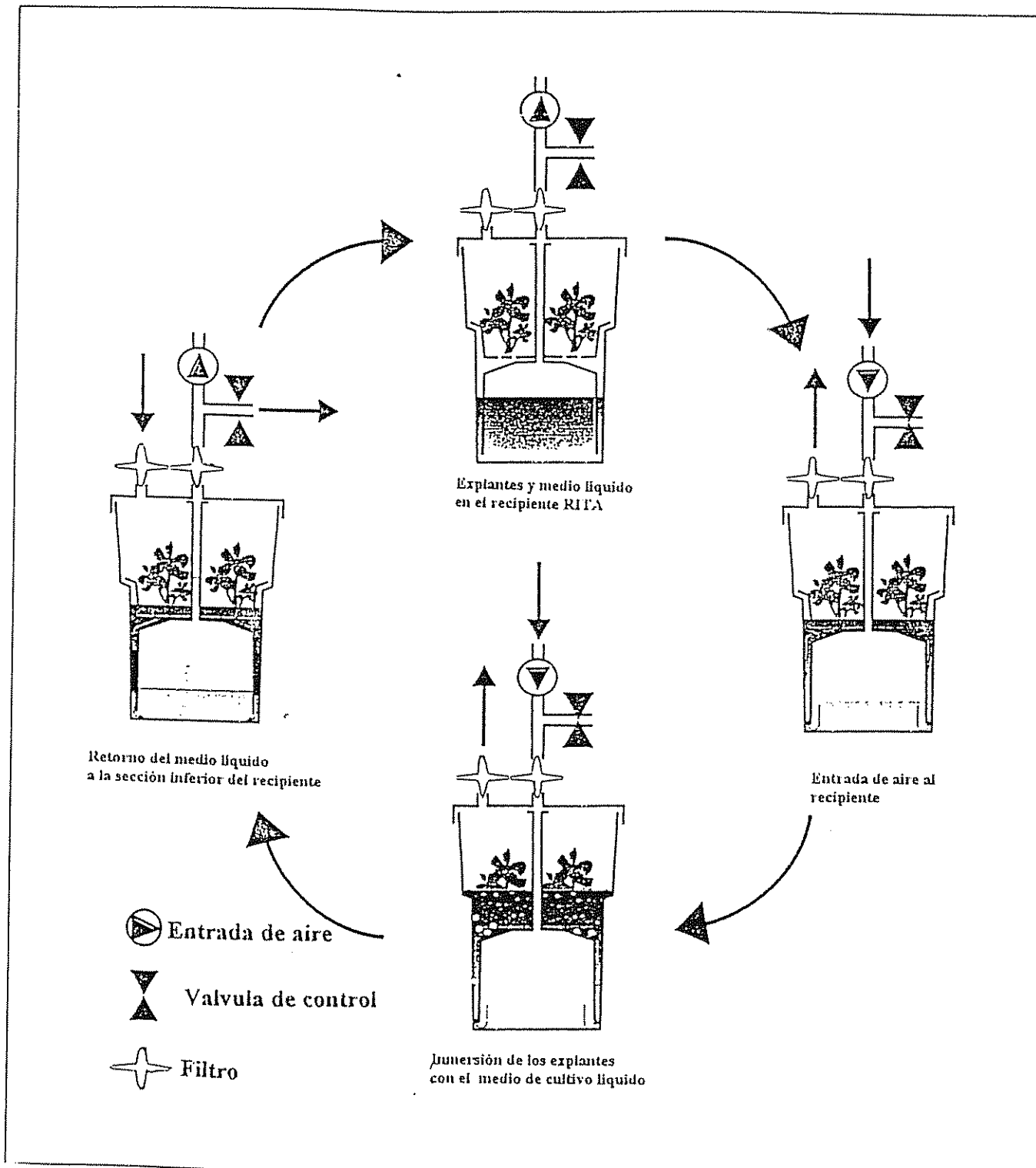
Apéndice 2. Estudio de diferentes tiempos (minutos) y frecuencias (días) de inmersión en el sistema RITA® para evaluar el comportamiento de microestacas de caoba (*Swietenia macrophylla*. King) durante la fase de multiplicación.

TRATAMIENTOS	INMERSION	
	TIEMPO (MINUTOS)	FRECUENCIAS (DIAS)
1	1	1
2	1	3
3	1	5
4	3	1
5	3	3
6	3	5
7	5	1
8	5	3
9	5	5
10	10	1
11	5	6 (horas)
12	15	6 (horas)

Apéndice 3. Evaluación de diferentes tiempos (minutos) y frecuencias (días) de inmersión en el sistema RITA® durante la fase de multiplicación de caoba (*Swietenia macrophylla*. King) a partir de microestacas utilizando dos medios diferentes de multiplicación.

TRATAMIENTO	INMERSION		MEDIOS DE MULTIPLICACIÓN (Sales MS, 3% sacarosa y pH 5.7)
	TIEMPO (MINUTOS)	FRECUENCIAS (DIAS)	
1	1	5	9 μ M de BAP
2	3	5	9 μ M de BAP
3	1	5	6.5 μ M de BAP + 2.2 μ M de 2-ip
4	3	5	6.5 μ M de BAP + 2.2 μ M de 2-ip
5	3	3	9 μ M de BAP
6	3	3	6.5 μ M de BAP + 2.2 μ M de 2-ip

Apéndice 4. Pasos en el sistema de inmersión temporal con recipientes RITA® utilizados en la propagación *in vitro* de caoba.



Apéndice 5. Medios de desarrollo de brotes de Caoba obtenidos en la fase de multiplicación. Fase de desarrollo.

Tratamientos	Sales minerales	Reguladores de crecimiento	Concentración de Sacarosa	Concentración de gelificante
MD1	MS	BAP y Kinetina	4%	Agar 0.8%
MD2	MS	BAP y AG ₃	4%	Gelrite 0.2%
MD3	WPM	-	4%	Agar 0.8%
MD4	WPM	BAP y AG ₃	4%	Gelrite 0.2%

Apéndice 6. Medios de desarrollo y medios utilizados para el enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación.

Tratamientos	Medios de desarrollo de brotes	Medios de inducción de raíces	Medios de expresión de raíces
T1	-	Berthouly <i>et al</i>	MS al 50% + 2.46 µM AIB de + 1.34 µM de ANA
T2	MD3	Berthouly <i>et al</i>	MS al 50% + 2.46 µM AIB de + 1.34 µM de ANA
T3	MD1	Berthouly <i>et al</i>	MS al 50% + 2.46 µM AIB de + 1.34 µM de ANA
T4	MD2	Berthouly <i>et al</i>	MS al 50% + 2.46 µM AIB de + 1.34 µM de ANA
T5	MD4	Berthouly <i>et al</i>	MS al 50% + 2.46 µM AIB de + 1.34 µM de ANA
T6	MD3	Perrin <i>et al</i>	Perrin <i>et al</i>
T7	MD4	Perrin <i>et al</i>	Perrin <i>et al</i>
T8	MD1	Perrin <i>et al</i>	Perrin <i>et al</i>
T9	MD2	Perrin <i>et al</i>	Perrin <i>et al</i>

Apéndice 7. Composición química (mg/l) de los medios de cultivos más los suplementos empleados para la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de caoba.

Sales	MS (1962)	WPM (1980)	Perrin <i>et al</i> (1994)
Macroelementos			
NH ₄ NO ₃	1650	400	2,5**
KNO ₃	900	-	9**
CaCl ₂	-	-	1**
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	96	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	2,5**
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	556	-
MgSO ₄	-	-	0,7**
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	370	-
KH ₂ PO ₄	170	170	-
FeSO ₄ 7H ₂ O	37,3	27,8	-
Microelementos			
KI	0,83	-	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	9,28
MnSO ₄ H ₂ O	-	22,3	16,9
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	-	-
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	8,6	11,5
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	250*	0,37
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	250*	0,24
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	-	0,24
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,3	37,3	-
Constituyentes orgánicos			
ácido nicotínico	0,5	0,5	0,46
HCl- piridoxina	0,5	0,5	0,62
HCl- tiamina	0,1	1,0	0,67
glicina	2	-	0,37
myo- inositol	100	100	5,40
biotina	-	-	0,048
pentatatonato de Ca	-	-	0,48
ácido ascorbico	-	-	0,17
cloruro de coline	-	-	0,14
L-cisteina, HCl	-	-	0,46
riboflavina	-	-	0,37
sacarosa	30,000	30,000	80,000
Gelificantes			
agar	0,65 - 0,7%		
gelrite	0,15 - 0,2%		
gelrite	5,7 - 5,8		
pH			

*µg/l **µM

Apéndice 8. Protocolo de deshidratación, infiltración y tinción empleado para el estudio histológico de los diferentes eventos.

Proceso	Concentración	Tiempo
Fijación		
FAA	10:7:1:1	48 horas
Deshidratación		
T.B.A	50%	2 horas
T.B.A	70%	2 horas
T.B.A	80%	1 hora
T.B.A	90%	1 hora
T.B.A	95%	1 hora
T.B.A	100%	2 horas
T.B.A	100%	2 horas
Infiltración		
resina	100 cc de resina (Technovit 7100 Kulser) 1 gramo de activador	12 horas a 4°C
Formación de bloques		
	15 ml de medio de infiltración mas 10 ml de endurecedor	Variable
Tinción		
safranina	2% en alcohol al 50%	20 minutos
agua destilada	-	enjuague
violeta cristal	1% en agua destilada	5 minutos
agua corriente	-	enjuague
etanol	100%	1 minuto
fast green + aceite de clavo	1% en etanol absoluto (1:9)	5 minutos
aceite de clavo	-	2 minutos
aceite de clavo	-	2 minutos
aceite de clavo	-	2 minutos
etanol + xileno	1:1	1 5 minutos
Xileno	-	3 minutos
Xileno	-	3 minutos

T.B.A = alcohol butílico terciario

Apéndice 9. Análisis estadístico utilizado en la multiplicación *in vitro* de caoba

9.1. Fase de establecimiento del cultivo.

9.1.1. Determinación de la fuente de explante

En la fase de establecimiento del cultivo para la determinación de la fuente de explante se utilizó un Diseño Completo al Azar con cuatro tratamientos (cuatro fuentes de explante) y diez repeticiones. Las unidades experimentales fueron los frascos "Gerber", cada uno con 3 explantes.

El modelo de análisis de varianza fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Variable aleatoria de respuesta

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error experimental

Los resultados de los análisis de varianza fueron los siguientes:

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
% de brotación	Fuente de yemas	3	1087.091667	2.76	0.05
Días a brotación	Fuente de yemas	3	23.55833333	7.36	0.0006
Promedio de brotes por explante	Fuente de yemas	3	1.34152250	39.25	0.0001
Altura promedio de brotes	Fuente de yemas	3	111.433508	95.45	0.0001

La prueba de Duncan realizada a una significancia del 5% presentó los siguientes resultados:

Fuente de Variación	Variable	Media	Duncan
Porcentaje de brotac.	Yemas eofilares	76.5	B
	Yemas de escama fol.	93.2	AB
	Yemas cot. con cot.	100	A
	Yemas cot. sin cot.	96.6	A
Días a brotac.	Yemas eofilares	11.2	A
	Yemas de escama fol.	10.4	A
	Yemas cot. con cot.	8.6	B
	Yemas cot. sin cot.	7.9	B
Número de brot./expl.	Yemas eofilares	1	C
	Yemas de escama fol.	1	C
	Yemas cot. con cot.	1.4	B
	Yemas cot. sin cot.	1.8	A
Altura de brotes	Yemas eofilares	0.7	D
	Yemas de escama fol.	2.0	C
	Yemas cot. con cot.	8.5	A
	Yemas cot. sin cot.	3.7	B

9.1.2. Edad de la plántula para la obtención de brotes cotiledonares

Se realizó el análisis de varianza con los siguientes resultados:

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
Días a brotación	Edad de la planta	2	0.7000	0.35	0.705
Promedio de brotes por explante	Edad de la planta	2	0.405	2.76	0.081
Altura promedio de brotes	Edad de la planta	2	1.414	0.74	0.485

Nota: no se realizó análisis de varianza a porcentaje de brotación debido que se obtuvo un 100% en los tres tratamientos.

Análisis de regresión:

Variable dependiente	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F	R cuadrado
Nº de brotes	1	0.54780	3.632	0.0670	0.1148
Altura de brotes	1	1.90962	1.022	0.3207	0.0352

9.1.3. Evaluación de gelificantes

El análisis de varianza para las fuentes de variación, agar, gelrite y agarosa presentó los siguientes resultados:

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
% de brotación	Gelificantes	2	879.309	3.82	0.036
Días a brotación	Gelificantes	2	4.800	5.14	0.013
Promedio de brotes por explante	Gelificantes	2	0.206	5.14	0.014
Altura promedio de brotes	Gelificantes	2	0.273	0.700	0.507

La prueba de Duncan realizada a una significancia del 5% presentó los siguientes resultados:

Fuente de Variación	Variable	Desv. Estandar	Media	Duncan
Porcentaje de brotac	Agar	10.752	96.600	A
	Gelrite	17.597	87.250	AB
	Agarosa	17.000	77.333	B
Días a brotac.	Agar	0.966	9.400	B
	Gelrite	0.966	10.600	A
	Agarosa	0.966	10.600	A
Número de brot./expl.	Agar	0.271	1.331	A
	Gelrite	0.171	1.206	AB
	Agarosa	0.110	1.037	B
Altura de brotes	Agar	0.696	1.641	A
	Gelrite	0.487	1.870	A
	Agarosa	0.648	1.514	A

9.1.4. Cultivo sucesivo del explante primario (Explante del nudo cotiledonar)

Se realizó una regresión con los siguientes resultados:

Variable dependiente	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F	R cuadrado
Nº de brotes	1	0.014	0.03	0.878	0.015
Altura de brotes	1	0.578	6.768	0.121	0.772

Variable dependiente	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro > F	R cuadrado
Nº de brotes	1	0.421	3.123	0.372	0.862
Altura de brotes	1	0.364	17.302	0.168	0.972

9.1.5. Forma de cultivo del explante

Los resultados del análisis de varianza fueron los siguientes:

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
% de brotación	Fuente de yemas y forma de cultivo	7	2397.112319	4.97	0.0002
Días a brotación	Fuente de yemas y forma de cultivo	7	215.486586	16.26	0.0001
Promedio de brotes por explante	Fuente de yemas y forma de cultivo	7	0.91878977	8.77	0.0001
Altura promedio de brotes	Fuente de yemas y forma de cultivo	7	1.30899573	2.52	0.0239

Medias y prueba de Tukey:

F. V.	% de br. Media	% de br. Tukey	Días/bro. Media	Días/bro. Tukey	Nº brot. Media	Nº brot. Tukey	Altura Media	Altura Tukey
F1	91.500	AB	13.500	CD	1.000	BC	1.314	AB
F2	55.167	C	25.833	A	0.500	D	1.458	AB
F3	62.125	BC	21.000	AB	0.704	BCD	1.356	AB
F4	83.125	ABC	9.2500	D	0.914	BCD	1.088	B
F5	66.400	ABC	12.500	CD	0.630	CD	2.212	A
F6	100	A	12.200	CD	1.517	A	1.737	AB
F7	79.700	ABC	17.000	BC	0.797	BCD	1.364	AB
F8	100	A	13.600	AB	1.192	AB	1.090	B

F = Forma de cultivo del explante secundario

9.2. Fase de multiplicación

9.2.1. Cultivos en medios sólidos

a) Establecimiento de la multiplicación

Para esta fase los resultados del análisis de varianza fueron los siguientes:

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
% de brotación	Citocininas y sus combinaciones	13	302.372	1.27	0.239
Días a brotación	Citocininas y sus combinaciones	13	8.581	4.81	0.0001
Promedio de brotes por explante	Citocininas y sus combinaciones	13	0.944	6.15	0.0001
Altura promedio de brotes	Citocininas y sus combinaciones	13	111.433508	1.249	0.0001

Medias y pruebas de Bonferroni:

F. V.	% de br. Media	% de br. Bonferr	Días/br. Media	Días/br. Bonferr.	Nº brot. Media	Nº brot. Bonferr.	Altura Media	Altura Bonferr
MM1	83.100	A	11.400	ABC	1.549	BC	1.850	A
MM2	96.600	A	10.600	ABC	1.729	AB	1.609	BA
MM3	89.900	A	10.200	BC	1.331	BC	1.644	BA
MM4	100.000	A	10.000	BC	2.263	A	0.831	BC
MM5	89.800	A	10.300	BC	1.066	C	1.216	ABC
MM6	93.200	A	10.900	ABC	1.066	C	1.301	ABC
MM7	93.200	A	10.200	BC	1.368	BC	1.586	AB
MM8	96.222	A	9.667	C	1.443	BC	1.417	AB
MM9	93.200	A	10.200	BC	1.582	BC	1.211	ABC
MM10	100.000	A	11.600	ABC	1.462	BC	0.967	BC
MM11	89.800	A	12.500	A	1.448	BC	0.880	BC
MM12	83.100	A	11.200	ABC	1.554	BC	0.887	BC
MM13	86.400	A	11.800	BA	1.681	ABC	0.755	C
MM14	96.222	A	12.600	A	1.757	BA	0.938	BC

b) Segundo ciclo de multiplicación

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
Promedio de brotes por explante	Citocininas y sus combinaciones	13	3 020	6.72	0.0001
Altura promedio de brotes	Citocininas y sus combinaciones	13	2.314	7.06	0.0001

Medias y pruebas de Bonferroni:

F. V	Nº brot. Media	Nº brot Bonferroni	Altura Media	Altura Bonferroni
MM1	2.809	A	1.057	D
MM2	1.673	BCD	1.000	D
MM3	1.937	ABC	1.164	D
MM4	2.265	AB	0.831	CD
MM5	1.000	CD	1.740	ABCD
MM6	1.000	CD	1.617	ABCD
MM7	1.419	BCD	1.759	ABCD
MM8	1.199	BCD	1.454	BCD
MM9	1.168	BCD	1.597	ABCD
MM10	1.413	BCD	1.364	CD
MM11	1.708	ABCD	1.183	CD
MM12	1.467	BCD	2.038	ABC
MM13	0.798	C	2.406	AB
MM14	0.725	C	2.50	A

9.2.2. Cultivos en medios líquidos (sistema RITA®)

Con este sistema el análisis de varianza presentó los siguientes resultados:

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
Promedio de brotes por explante	Frecuencias y medios de cult	5	0.236	3.69	0.037
Altura promedio de brotes	Frecuencias y medios de cult	5	5.62	5.62	0.010

La prueba de Duncan realizada a una significancia del 5% presentó los siguientes resultados:

Fuente de Variación	Variable	Media	Desv. Stand.	Duncan
Número de brotes por explante	1 min. C/5 días + MM4	2.000	0.000	A
	3 min. C/5 días + MM4	1.667	0.288	AB
	1 min. C/5 días + MM12	1.700	0.141	AB
	3 min. C/5 días + MM12	1.367	0.321	B
	3 min. C/5 días + MM4	1.450	0.071	B
	3 min. C/5 días + MM12	1.200	0.346	B
Altura de brotes	1 min. C/5 días + MM4	1.227	0.032	A
	3 min. C/5 días + MM4	0.903	0.081	ABC
	1 min. C/5 días + MM12	1.155	0.417	AB
	3 min. C/5 días + MM12	1.123	0.085	AB
	3 min. C/5 días + MM4	0.795	0.091	BC
	3 min. C/5 días + MM12	0.610	0.191	C

Cada recipiente RITA® constituyó una repetición, colocando tres recipientes por tratamiento y en cada uno de ellos se colocaron 10 explantes.

9.3. Fase de enraizamiento

Para realizar el análisis de varianza se transformaron los datos mediante el proceso SAS sqrt (+ 0.5) y los resultados se muestran en el siguiente cuadro:

Variable	F.V.	gl	Cuadrado medio	Valor de F	Pro. > F
Promedio de raíces por brote	Tratamientos	8	1.177	4.82	0.0001
Longitud promedio de raíces por brote	Tratamientos	8	3.732	6.94	0.0001

Medias y prueba de Tukey de datos normales:

F. V.	Nº raíces Media	Nº raíces Tukey	Longitud de raíces Media	Longitud de raíces Tukey
T1	1.091	AB	3.633	A
T2	2.174	A	3.890	A
T3	0.706	AB	1.613	ABC
T4	0.286	B	0.800	C
T5	1.278	AB	2.054	ABC
T6	0.778	AB	0.917	BC
T7	1.364	AB	2.182	ABC
T8	0.000	B	0.000	C
T9	0.000	B	0.000	C