

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Ubicación Taxonómica

El género *Swietenia* se ubica dentro de la familia Meliaceae, Subfamilia *Swietenioideae* (Lamb 1966). Presenta tres especies *S. Mahogani* Jacq. *S. Humilis* y *S. Macrophylla* King, las cuales son conocidas como Caoba en mesoamérica, Mara en América del Sur ó “mahogany” en inglés (Centro Científico Tropical 2000).

2. Descripción de la especie

La Caoba (*S. macrophylla*) es un árbol que puede alcanzar unos 50 metros de altura, de tronco recto y con diámetros promedios de 75 a 150 cm. Se encuentra libre de ramas en sus primeros 18 a 20 metros, desde donde desarrolla una copa espesa en la mayoría de los casos. Las hojas son alternas, compuestas, paripinnadas con folíolos de 12 a 40 cm de largo (Lamb 1966).

Los árboles son monoicos, con inflorescencia mixtas, es decir que tienen flores masculinas, femeninas y hermafroditas (Styles 1972). En Centroamérica la época de floración es de abril a junio y la producción de semillas se realiza desde finales de noviembre hasta principios de diciembre. El fruto es una cápsula la cual produce en promedio 49 semillas (Niembro 1996, citado por Patiño 1997).

3. Distribución geográfica

La Caoba se distribuye en la costa Atlántica, desde el Sur de México hasta Costa Rica y Panamá, siguiendo la parte Noroeste de América del Sur y por la periferia superior y sur de la Amazonía hasta Bolivia (Navarro *et al.* 1997)

4. Limitantes en la regeneración natural de la Caoba

Las especies de Caoba y Cedro son susceptibles al ataque del barrenador de las meliáceas (*Hypsipyla*); la larva de ésta mariposa se alimenta de la yema apical y laterales destruyéndola. Su acción produce la deformación y bifurcación del tronco, provocando un retraso considerable del crecimiento de la planta afectada y ocasionalmente, la muerte (Patiño 1997)

Este autor menciona que otra de las preocupaciones principales de la comunidad científica, es la necesidad de prevenir, en *S. macrophylla*, la erosión genética, que sufrieron otras especies como *S. mahagoni*, que por diversas causas perdieron sus mejores individuos en el pasado y ahora las descendencias de las poblaciones remanentes están constituídas por árboles mal formados y con muchas ramas.

Asimismo, los individuos adultos con características fenotípicas deseables, se presentan en baja proporción en las poblaciones forestales y además manifiestan baja capacidad de regeneración natural. Bajo este enfoque y dado que las meliáceas son de interés, tanto para su zona de origen como para otros países y regiones hay posibilidades de intensificar su reproducción para mantener poblaciones con potencial aprovechable (Linares 1997).

5. Silvicultura.

Desde el siglo pasado hasta la actualidad, las Caobas han sido el pilar del desarrollo de la industria forestal de Latinoamérica (Patiño 1997). En mesoamérica se han mencionado experiencias positivas de manejo silvicultural de la especie en sistemas agroforestales y de plantación, por lo general éstas experiencias son a pequeña o mediana escala. A pesar del problema del barrenador, se ha logrado comprobar que los agricultores pueden cosechar árboles de Caoba que han sido plantados o dejados en sus parcelas. La combinación de la especie con otros cultivos ó árboles puede disminuir el ataque y favorecer el crecimiento y rectitud de los rebrotes que se manejan (CCT 2000). En casi todos los países mesoamericanos la explotación de los bosques latifoliados se ha concentrado en pocas especies, principalmente en las especies preciosas como Caoba y Cedro (CCT 2000).

6. Propagación de Caoba

6.1 Propagación por semillas

La floración para especies de *Swietenia* en México, corresponde generalmente al periodo entre abril y junio y la época de producción de semillas ocurre generalmente entre febrero y abril (Patiño *et al.* 1983). Sin embargo, Navarro y Hernández (1996), señalan que en Centroamérica la época de producción de semillas de *S. macrophylla* varía entre noviembre y diciembre en Panamá y Costa Rica, y de enero a marzo en Nicaragua, Honduras, Guatemala y Belice.

Los frutos tienen una longitud de 12.5 a 13.0 cm y un diámetro de 5.0 cm. En promedio el 22% de la semilla es vana (Gomez y Jasso 1995, citado por Patiño 1997) y cada fruto puede contener hasta 63 semillas.

La dispersión por semilla es un método muy utilizado en los viveros forestales, donde se cultiva hasta la edad de 1 a 1.5 años y luego es transplantado al lugar definitivo. Además la semilla se puede almacenar por un tiempo prolongado.

6.2 Propagación por estacas

Los métodos convencionales de propagación vegetativa son por estacas enraizadas. Sin embargo, el número de plantas que puede ser obtenida a partir de la propagación de una planta en una estación es relativamente pequeña. Los factores limitantes para una propagación a gran escala son la restringida disponibilidad de un genotipo mejorado y el espacio. Además, en muchas especies de árboles, tales como *Fagus*, *Quercus*, *Eucaliptus* y muchas coníferas, las estacas leñosas de árboles maduros son difíciles de enraizar. Superando tales problemas, las técnicas *in vitro* ofrecen una clonación en masa de genotipos superiores a lo largo del año en un espacio limitado. (Ahuja y Muhs 1985).

Existen especies en las cuales la producción de estacas enraizadas es muy difícil, debido a una serie de problemas que varían entre especies y aún entre árboles. En general se puede decir que conforme aumenta la edad del árbol, disminuye la capacidad y velocidad de enraizamiento, la longitud de raíces así como su número (Orea Coria y Villalobos 1985).

En Caoba las estacas deben ser cosechadas de brotes de 30 a 50 cm de long. Cada brote genera de 6 a 10 estaquitas, cada una de las cuales consiste de una sección de entrenudo, una hoja y al menos una yema axilar, la cual da origen al nuevo tallo. Generalmente se utilizan estaquitas de 4 a 6 cm de longitud, y una concentración de 0,2% de AIB para el enraizamiento (Mesén 1998).

El mayor impedimento en usar estacas, es su dependencia de la edad, árboles jóvenes a menudo enraizarían sin esfuerzo, sin embargo, el mismo árbol en estado adulto puede ser casi imposible enraizar.

Otra mayor restricción en usar estacas de árboles maduros es que los propágulos algunas veces no crecen en la forma normal del árbol. Lo cual a menudo determina qué árboles están disponibles para investigación (Zobel y Talbert 1984).

7. Biotecnología en el mejoramiento de árboles

De acuerdo a Haines (1994), las posibilidades de aplicar la micropropagación en los programas de mejoramiento genético de árboles a corto plazo puede asociarse a dos grupos de especies:

- Especies industriales bien estudiadas biológicamente, las cuales cuentan con programas de mejoramiento genético bien establecidos.
 - Es importante en la multiplicación de individuos élite y en particular en lograr resistencia a enfermedades virales e insectos.
 - El uso de la micropropagación en los sistemas integrados de propagación clonal permite la plantación comercial de esquejes obtenidos a partir de plantas madres de clones seleccionados y micropropagados. Este método es únicamente útil en programas avanzados de mejoramiento en los cuales se incorpora la caracterización de clones valiosos dentro de un esquema estratégico de silvicultura clonal.

- Especies no industriales (la mayoría de tropicales arbóreas) en las cuales no cuenta con programas de mejoramiento genético bien desarrollado, la estrategia prioritaria de investigación para la aplicación de la biotecnología a corto y mediano plazo es el desarrollo de técnicas sencillas de micropropagación.

La mayor crítica de los programas actuales no es la metodología de propagación vegetativa *per se*, sino en llevar a cabo programas de mejoramiento para producir los mejores árboles para los programas de regeneración vegetativa. Aunque algunas organizaciones han combinado programas de mejoramiento genético con su regeneración vegetativa (Zobel y Talbert 1984).

La biotecnología tiene muchas ventajas sobre los clásicos programas de mejoramiento en árboles forestales. Esta tecnología puede reducir el tiempo necesario para introducir nuevos rasgos deseables para la producción de genotipos mejorados (Ostry y Michler 1993).

Dentro del mejoramiento genético de especies forestales, la propagación vegetativa representa un camino más directo para retener las características genéticas de un árbol élite maduro, y dentro de este tipo de propagación, el cultivo de tejidos ofrece un gran potencial con respecto a los métodos tradicionales. Incrementa el proceso de producción de variedades genéticamente superiores provenientes de la selección de poblaciones naturales o del mejoramiento convencional (Orea Coria y Villalobos 1985). La propagación vegetativa es ahora una parte aceptada de los programas de mejoramiento de árboles, porque ofrece un panorama para la selección y mantenimiento del efecto de genes aditivos y no aditivos. El efecto de genes no aditivos es producido por la interacción de genes que no son normalmente transmitidos a través de la reproducción sexual. Este efecto puede dar origen a individuos excepcionales entre familias superiores y además puede ser capturado por la propagación vegetativa (Ahuja y Muhs 1985).

7.1 Micropropagación de especies leñosas tropicales

Se han realizado muchos trabajos para encontrar métodos de propagación en especies arbóreas, que conserven fielmente las características de la planta seleccionada. Hay factores que afectan las diferentes etapas de la micropropagación, éstos incluyen la fuente de explante y las condiciones químicas (medio de cultivo) y físicas (luz y temperatura) de cultivo. López Peralta (1985), menciona que el origen del explante y los compuestos nutritivos esenciales como sales inorgánicas (macro y micronutrientes), la fuente de carbono, vitaminas y reguladores del crecimiento son factores relevantes a tomar en cuenta para el éxito en el cultivo *in vitro*.

La mayoría de los programas de mejoramiento genético en los trópicos se ha basado en la evaluación de especies y procedencias seguida por el establecimiento de ensayos de progenies y huertos semilleros con los mejores individuos. Sin embargo, actualmente se reconoce que la propagación vegetativa y la selección clonal ofrecen los medios para lograr mayores ganancias

en el menor tiempo posible (Mesén 1998). Las técnicas actuales de mejoramiento tienen posibilidades limitadas, por las complicaciones que se derivan de características inherentes a los árboles tales como los largos ciclos de vida, las pronunciadas fases de juvenilidad y madurez, la posición inaccesible de los órganos reproductivos y las grandes distancias entre árboles deseables (Orea Coria y Villalobos 1985).

La propagación vegetativa representa un camino más directo para retener las características genéticas de un árbol élite maduro. Dentro de éste tipo de propagación, el cultivo de tejidos ofrece un gran potencial de ayuda a los métodos tradicionales al facilitar el proceso de producción de variedades genéticamente superiores (Orea Coria y Villalobos 1985).

La regeneración de plantas *in vitro* puede llevarse a cabo mediante el empleo de órganos, células y cultivo de protoplastos. Como mencionamos anteriormente, los explantes de especies leñosas son generalmente difíciles para crecer y diferenciarse *in vitro*. Sin embargo, los diferentes tipos de explantes, han sido empleados con varios grados de éxito para la micropropagación de numerosas plantas leñosas (Ahuja 1993).

Aunque el cultivo de callos fue inicialmente usado para la regeneración de plantas, el cultivo de órganos (embriones, cotiledones, yemas meristemáticas) es rutinariamente empleado para la micropropagación (Ahuja 1993).

7.1.1 Cultivo de yemas axilares

La producción de plantas a partir de yemas axilares ha probado ser el método más aplicable y confiable de la propagación *in vitro* (Sherrington y George 1984). En el cultivo de yemas axilares, son usados dos métodos dependiendo de la especie, el cultivo de explantes nodales o microestacas y el cultivo de ápices. Ambos métodos se basan en la estimulación del crecimiento de yemas laterales debido a la ruptura de la dominancia apical. Los brotes axilares producidos son a su vez subdivididos en brotes apicales y segmentos nodales que sirven como explantes secundarios para proliferación futura (Kane 2000).

Margara (1988), menciona que esa aptitud para la proliferación de yemas axilares es un carácter pre-adaptativo favorable a la multiplicación; un factor importante a considerar reside en la intensidad de la dominancia apical, es decir, en la inhibición de crecimiento ejercida por la yema terminal sobre las axilares. Cuando esta dominancia es casi absoluta, hay pocas probabilidades para que la planta pueda multiplicarse de una manera espontánea, aunque también se puede provocar esa ruptura mediante la poda artificial para la extracción de microestacas.

Teóricamente las yemas axilares o laterales pueden a su vez producir brotes axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo, en un medio suplementado con reguladores de crecimiento normalmente citocininas (George 1993, citado por Kane 2000); por lo tanto el método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal (Krikorian 1982)

7.2 Micropropagación de la Caoba

Explantos nodales de plántulas de semillas y segmentos nodales de brotes basales de árboles de *S. macrophylla* fueron usados como explantes en estudios *in vitro*. Ellos fueron cultivados en medio MS suplementado con AIA de 0 a 10 ppm y BA de 0 a 10 ppm. Los brotes adventicios fueron obtenidos de un callo friable producido sobre segmentos nodales cultivados en medio con BA (2 y 5 ppm)(Lee y Rao 1988).

Valverde (1998), utilizó secciones de 1.5 cm de hipocotilos como explantes. La mejor respuesta en la producción de brotes adventicios fue obtenida al utilizar el medio MS con 35.5 y 44.4 uM de BA. El 15% de los explantes desarrollaron brotes adventicios.

Orellana (1997), estudió diferentes tipos de explantes a partir de segmentos nodales de plántulas de semillas de Caoba, germinadas *in vitro*, utilizó yemas eofilares, yemas de escamas foliares y yemas de nudo cotiledonar. Encontró que las yemas del nudo cotiledonar dieron mejor respuesta, en medio básico MS, suplementado con sacarosa al 3% y 2,46 uM de 2-ip.

Medina y Sotolongo (1999), lograron callos al utilizar como explantes hojas de Caoba como explantes. Para la formación de callo usaron 1 mg/l de 2,4-D. Los resultados muestran que las sales MS con el doble de macronutrientes, caseína hidrolizada (250 mg/l), carbón activado (1 mg/l) y PVP (polivinil pirrolidone) como antioxidante permitieron la mejor respuesta.

7.3 Factores que influyen en la micropropagación especies leñosas

7.3.1 Fuente de explantes

Durante la micropropagación la selección del explante, debe tomar en cuenta el órgano que sirve como fuente de explante, la edad fisiológica u ontogénica del órgano, la estación en que el explante es obtenido, el tamaño del explante y la calidad de la planta que suministra los explantes (Dirr *et al.* 1987)

La calidad del explante y subsecuentemente la sensibilidad *in vitro* son influenciadas por las condiciones fisiológicas y fitosanitarias de las plantas donantes (Kane 2000). Es aconsejable seleccionar los explantes de plantas sanas y no de plantas con mal nutrición o stress por agua o plantas que exhiban síntomas de enfermedades (Smith 2000). Es por eso que previo al establecimiento del cultivo, se da atención cuidadosa a plantas donantes, bajo condiciones controladas de crecimiento (Kane 2000).

Lo óptimo es seleccionar explantes potencialmente aptos a la micropropagación. Por ejemplo, las plantas tienen diferentes balances hormonales a través de toda la planta y dependiendo de la localización de los explantes, se puede tener diferentes niveles de reguladores de crecimiento endógenos. Estas diferencias en el balance hormonal endógeno pueden resultar en la variación de respuestas *in vitro* (Smith 2000).

7.3.2 Incidencia de contaminantes

7.3.2.1 Desinfección superficial

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas por un elevado rango de microorganismos que no son patógenos bajo condiciones normales. Sin embargo, cuando el tejido u órgano es cultivado *in vitro* en un medio enriquecido, el crecimiento de los microorganismos es acelerado a un grado tal que puede limitar el desarrollo de los cultivos

(Villegas Monter 1985). Hay dos causas para la contaminación en cultivo *in vitro*: cuando la técnica de desinfección superficial ha sido inadecuada y cuando los contaminantes de la microflora natural sistémica han sobrevivido a la aplicación de desinfectantes. El medio *in vitro* en que normalmente se incuban los cultivos conforma un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos como bacterias y hongos, los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo ó modificarlo (Roca y Mroginski 1991).

Los métodos y productos utilizados para la desinfección del material vegetativo, varían de acuerdo a las especies, condiciones en que se desarrolla la planta original, época de siembra, disponibilidad de los productos y tipo de tejidos (Villegas Monter 1985).

Sin embargo, a veces es difícil esterilizar superficialmente el material sin dañar el tejido. Algunas veces los microorganismos están en la parte interna como en escamas de yemas, y no en los primordios foliares. El cultivo de tejidos libre de tales microorganismos puede ser obtenido cuando el explante proviene del meristemo apical (Bonga y Durzan 1982).

Las leñosas o plantas de campo, normalmente son muy dificultosas para desinfectar (Trigiano 2000) y constituyen un serio problema para el cultivo *in vitro*, a menos que la planta produzca brotes juveniles que no son difíciles de desinfectar (Bonga y Von Aderkas 1992). Los explantes tomados de ramas en crecimiento activo, son más fáciles de esterilizar superficialmente, que explantes similares de secciones de ramas viejas. El grado de contaminación superficial está además determinado por las condiciones climáticas; es mucho más difícil obtener explantes limpios de plantas en crecimiento en clima tropical húmedo que en clima fríos o ambientes secos (Bonga y Von Aderkas, 1992).

7.3.2.2 Agentes desinfectantes.

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes (Mroginski 1991).

El hipoclorito de calcio $[Ca(OCl)_2]$, se recomienda en concentraciones entre 3.6 a 7.1%. (Usui *et al.* 1996), y se considera que las sales de calcio son menos tóxicas para tejidos que las sales de sodio. Sin embargo, el hipoclorito de calcio reacciona con el dióxido de carbono de la

atmósfera y además es químicamente inestable. Smith (2000), menciona que se puede usar al 0,8% (v/v) agitando por 5 a 10 min. y tratar el tejido por 5 a 30 min. Luego del tratamiento de desinfección, todo el hipoclorito deber ser eliminado del tejido, porque cantidades trazas interfieren con el consumo de aminoácidos y el metabolismo del explante.

El hipoclorito de sodio (NaOCl), generalmente es diluído en agua de 5-25% (v/v) con 2 gotas de Tween 20 agregado para cada 100 ml de solución (Smith 2000). La capacidad de desinfección del NaOCl se pierde a medida que pasa el tiempo (Usui *et al.* 1996). La duración del tratamiento es usualmente de 5-30 min. Cuando se usa después de unas horas de preparado, el blanqueador produce el gas clorine que disminuye la efectividad. Se consigue generalmente como blanqueador comercial que contiene entre 5 – 6% de hipoclorito de sodio (Montoya Henao 1991; Trigiano 2000).

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), es un poderoso oxidante, que suele ser usado en una concentración de 3-10% (v/v) durante 1 a 30 min, previo al enjuague con agua destilada en combinación con otros desinfectantes o solo. Una interacción entre NaOCl y H₂O₂ es tóxico para el tejido de plantas (Smith 2000).

El etanol ó alcohol al 70% (v/v) puede ser usado con algodón para limpiar el material de la planta previo a la desinfección y para bañar el material de 1 a 5 min. antes o después del tratamiento con hipoclorito de sodio o de calcio (Smith 2000). Una concentración al 70% es la más eficiente para desinfectar, comparada con otras concentraciones (Usui *et al.* 1996).

El cloruro de mercurio (HgCl₂) es otro desinfectante, no obstante es altamente tóxico y no es fácilmente removible del explante (Villegas Monter 1985). Este desinfectante solubilizado en alcohol al 50% ha sido usado para esterilizar pino, tambien ha sido usado en agua para tratar brotes de sándalo (*Santalum album* sp) (Bonga y Durzan 1982). Las concentraciones al 0,2% que se utilizan generalmente son bajas (Trigiano 2000).

La efectividad de los agentes desinfectantes, puede ser mejorada, incorporando pequeñas cantidades de detergente, en la solución del desinfectante. El detergente rompe la tensión

superficial y permite que el agente penetre y ataque a los microorganismos. (Villegas Monter, 1985). En muchos casos se demostró la utilidad de agregar agentes tenso activos pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol 70%. (Mroginski 1991).

El detergente mas utilizado es el Tween 20 (0.01- 0.1%) y tambien el Tween 80 (Mroginski 1991).

En la mayoría de los casos los agentes desinfectantes no son utilizados solos, siempre van complementados con otros desinfectantes (Smith 2000) y con alcohol al 70% el cual normalmente es usado previo a la desinfección con hipoclorito de sodio o de calcio (Smith 2000).

7.3.2.3 Contaminación endofítica

La contaminación por hongos y bacterias es una de las más importantes razones para la pérdida de material vegetal durante el cultivo de plantas *in vitro*. Sin embargo, ciertas bacterias, permanecen “latentes” *in vitro* (no produciendo crecimiento visible en el medio de cultivo ó síntoma sobre el tejido de plantas) y pueden o no manifestarse dependiendo de las circunstancias favorables o desfavorables (Dirr *et al.* 1987) debido a que requieren nutrientes adicionales para crecer en el medio de cultivo (Leifert *et al.* 1991). Normalmente la infección con bacterias “latentes” es detectada sólo después que una gran cantidad de plantas han sido propagadas (Leifert *et al.* 1991).

En un estudio en dos laboratorios de micropropagación comercial, se identificaron 293 bacterias: 26% fueron *Staphylococcus* ó *Micrococcus*, 19% *Pseudomonas*, 13% *Bacillus*, 12% *Enterobacter* o *Erwinia* y 11% *Lactobacillus*, 3% *Agrobacterium* y 3% *Acinetobacter* (Leifert y Waites 1990).

En otro estudio, de 235 bacterias aisladas en 12 meses de cultivo de 12 diferentes especies de plantas, 75% fueron Gram positiva y 25% Gram negativas (Leifert y Waites 1990).

Las causas de la contaminación bacterial en el laboratorio, pueden deberse a métodos ineficientes de esterilización de explantes tomados de plantas *in vivo*, la detección de

contaminantes en cultivo de plantas *in vitro*, la manipulación aséptica de materiales de plantas y la inadecuada esterilización de recipientes, instrumentos y medios de cultivo (Leifert y Waites 1990).

El uso de antimicrobiales, medio acidificado y la expresión de mecanismos de resistencia por el cultivo de tejidos de plantas, pueden disminuir ó suprimir el crecimiento de contaminantes (Leifert y Cassells 2001). De persistir aún la presencia de contaminantes bacteriales entonces se hace necesaria la aplicación de antibióticos.

Sin embargo, la adición de los antibióticos al medio de cultivo no es la solución a los problemas, aunque sí ayuda a eliminarlos temporalmente o por lo menos a controlarlos. Por ejemplo, los antibióticos del grupo de los aminoglicosidos (estreptomina, neomicina, gentamicina, vancomicina, etc), enlazan la sub-unidad ribosomal 30S de la célula bacterial, é inhiben la síntesis de proteínas (Young *et al.*1984). Este efecto particular de los aminoglicosidos, puede hacerlas fitotóxicos quizás debido a la inhibición de la síntesis de proteínas de cloroplastos y mitocondrias, los cuales, como las bacterias, contienen sub-unidades ribosomales 30S y 50S (Young *et al.*1984) Los varios agentes que actúan con replicación de DNA ribosomal y síntesis de proteínas es más probable que sean fitotóxicos que los que actúan específicamente sobre estructuras bacteriales, tales como la pared celular y las membranas (Falkner 1990).

La ventaja de este grupo de antibióticos es que son bactericidas contra un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Aunque es posible que éstos antibióticos sean tóxicos en diferentes grados, la estreptomina es el menos tóxico de ellos (Pollock *et al.* 1983).

7.3.2.4 Contaminantes no microbiales

Los fenoles son compuestos que no tienen una función reconocida en los procesos fisiológicos fundamentales; tienen múltiples funciones en la planta como por ejemplo protegerlas contra los depredadores, permitirles competir por el habitat, atraer polinizadores y simbiontes, protección contra el estrés, etc (Roca y Mroginski 1991).

Cuando los explantes son aislados, la superficie del corte generalmente se torna marrón a los pocos minutos, por la oxidación de fenoles a quinonas tóxicas en las células dañadas. Este es un fenómeno corriente en cultivo *in vitro*, en respuesta al estrés de las condiciones de cultivo (Margara 1988).

Ocurre con frecuencia que ésta excisión de los explantes primarios, promueve la liberación de los compuestos fenólicos y taninos (Beyl 2000), lo cual provoca a la vez, un oscurecimiento del medio y la inhibición del crecimiento de los tejidos, a veces, con acompañamiento de necrosis (Margara 1988). La oxidación fenólica de los tejidos puede afectar el metabolismo de los explantes debido a la exudación de fenoles tóxicos (Bonga y Von Aderkas 1992).

Dirr *et al.* 1987, sugieren que la oxidación puede ser controlada mediante la reducción de los compuestos polifenólicos y los productos oxidativos, inhibiendo la acción de las polifenol-oxidasas y disminuyendo el suministro de oxígeno. En algunos casos se aplica Polivinil Pirrolidona (PVP, 10 g/litro); ácido ascórbico (100 mg/l) y ácido cítrico (150 mg/l) al medio de cultivo para disminuir los efectos de la oxidación (López Peralta, 1985)

7.3.3 Edad fisiológica o Juvenilidad

Orea Coria y Villalobos (1985), mencionan que el carácter juvenil de los materiales a introducir *in vitro* es determinante para el éxito de la micropropagación; en un árbol maduro, algunas de sus yemas y ramas aún pueden retener características juveniles de acuerdo a su localización en el árbol y por lo tanto las yemas adventicias que se deriven de ésta, exhibirán características de juvenilidad. Asimismo, fisiológicamente los tejidos de plantas jóvenes son mucho más sensibles *in vitro*, y generalmente son más fáciles de desinfectar para establecer cultivos limpios (Smith 2000).

Margara (1988), define la juvenilidad como la manifestación de la aparición de la potencialidad que puede traducirse en una morfogénesis diferente, modificación de las características fisiológicas y en una mayor aptitud para la rizogénesis.

Wesley (1993), dice que los procedimientos para obtener material juvenil de plantas maduras es de valor considerable para la micropropagación de especies leñosas, porque el establecimiento de explantes *in vitro* es grandemente influenciado por el estado de maduración usado por los explantes primarios.

Sobre este tema (Haynes 1994), considera que uno de los objetivos más importantes de la investigación estratégica a largo plazo para el mejoramiento de especies forestales, sigue siendo un control más estricto del estado de madurez. El interés de los fenómenos de juvenilidad puede ser considerado principalmente para la multiplicación de especies leñosas (Margara 1988). La regresión al estado juvenil es útil sobre todo cuando ya están en marcha los programas adecuados de mejoramiento y donde existan limitaciones para la aplicación de técnicas clonales (Haines 1994).

7.3.4 Estacionalidad

La estación del año puede tener efectos sobre la contaminación y la respuesta en el cultivo *in vitro*. Por ejemplo, las yemas o brotes tomados durante la primavera, es decir cuando los brotes están en un estado de crecimiento, son más reactivos que las yemas dormantes. El tejido que es fisiológicamente dormante no es reactivo hasta que los requerimientos para romper la dormancia sean adecuados en el cultivo (Smith 2000).

Cuando las plantas donantes están creciendo en el invernadero, las etapas de desarrollo están disponibles a lo largo del año, aunque no están totalmente aisladas de la influencia del medio externo. Sin embargo, los materiales de árboles en el campo solo están en óptimas condiciones para micropropagación, cuando están en época de brotación (Bonga y Von Aderkas 1992).

7.3.5 Medios de cultivo

Los medios de cultivo, son un factor importante a considerar, debido a que son usados para promover la organogénesis en plantas. En especies leñosas se utilizan los medios de

Murashige y Skoog (MS 1962); White (1963); B₅ (Gamborg *et al.* 1968), Shenk y Hildebrandt (SH 1972); Heller (1953) y el de Lloyd y McCown (WPM 1980) citado por Orea Coria y villalobos (1985).

El crecimiento y desarrollo de explantes *in vitro* son producto de la genética, el ambiente y los componentes del medio de cultivo; este último es más fácil de manipular para nuestros fines en cultivo *in vitro* (Trigiano 2000). El medio de cultivo consiste de un 95% de agua, macro y micronutrientes, reguladores de crecimiento, vitaminas, azúcares, agentes gelificantes (Smith 2000). Además el medio puede incluir aminoácidos, antibióticos o complejos naturales. La selección o desarrollo de un medio de cultivo es vital para el éxito en cultivo de tejidos (Smith 2000, Trigiano 2000).

El medio MS (Murashige y Skoog 1962) es el más popular entre todos los medios. Hay especies que crecen bien sobre un amplio rango de medios de cultivo por lo que no es preciso optimizar un medio para éstos. Hay casos donde la selección de un genotipo conveniente es más importante que precisar la optimización de un medio de cultivo (Bonga y Von Aderkas 1992).

7.3.5.1 Sales inorgánicas.

Casi cualquiera de las fórmulas salinas basales de las soluciones de cultivo que se tienen actualmente como estandar deberían ser más que suficiente para suministrar un mínimo esencial de los elementos requeridos. Sin embargo, sería útil ensayar éstas soluciones a diferentes concentraciones totales; p. ej. el de Murashige y Skoog es un medio con relativamente alto contenido de sales (Krikorian 1991), porque muchas plantas reaccionan favorablemente en esas condiciones. Sin embargo, no necesariamente resulta ser óptimo para el crecimiento y desarrollo de otras especies (Beyl 2000).

El medio MS es el más comúnmente usado y el más adecuado medio básico para regeneración de plantas de tejidos y callos. Es un medio con alto contenido de sales debido al contenido de K y N. Los macroelementos del medio MS son a menudo diluidos a un medio o un tercio de su nivel original. Igualmente sucede con otros medios (Bonga y Von Aderkas 1992).

Para contrarrestar la sensibilidad a las sales en algunas especies leñosas, Lloyd y McCown (1980) desarrollaron el Woody Plant Medium (WPM). Shenk y Hildebrandt (1972) desarrollaron el medio SH para el cultivo de callos de monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Para la micropropagación de higo (*Ficus carica* L cv *gular*) se probó tres medios de cultivo, el MS, el B₅ y el SH suplementado con concentraciones de 1 a 5 mg/l de BAP en combinación con 0.2 mg/l de ANA para iniciación de brotes. El medio MS suplementado con 2 mg/l de ANA permitió la emergencia de las yemas apicales a partir de los 12 días. Se observó una respuesta morfogénica significativa después de cinco semanas de cultivo, la proliferación de brotes en medio SH ó B₅ fue mayor comparado con el del medio MS (Kumar *et al.* 1998).

En Neem (*Azadirachta excelsa*) después de probar diferentes explantes, el ápice demostró tener la más alta tasa de formación de brotes, en el medio MS suplementado con 0.5 mg/l de BAP. La combinación de otros medios (B₅, WPM) citocininas no fue exitosa (Awang 1997).

7.3.5.2 Fuentes de energía

El azúcar es una parte muy importante de los medios nutritivos y es esencial para el crecimiento y el desarrollo de un cultivo *in vitro*. Muchos cultivos de plantas son incapaces de fotosintetizar efectivamente, por una variedad de razones incluyendo insuficiencia celular organizada y desarrollo de tejidos, ausencia de clorofila, intercambio de gases y CO₂ en el recipiente de cultivo. La ausencia de condiciones ambientales óptimas tales como baja luminosidad (Beyl 2000), producen insuficiencia de asimilación clorofílica (Margara 1988)

Bonga y Von Aderkas (1992), coinciden en afirmar que para el crecimiento celular los carbohidratos son obligatorios, más aún cuando las células en cultivo de tejidos están expuestas a niveles de luz no fotosintéticos. Muchos cultivos dependen de una fuente de carbohidratos aún en la fase de aclimatación.

La elección de la concentración de azúcar es dependiente del tipo y edad del explante en cultivo. Es necesario entonces, determinar la concentración óptima de azúcares para el crecimiento de los cultivos. Algunos autores sugieren que la concentración adecuada óptima

de sacarosa está entre el 2 y 8% (Margara, 1988; Mroginski y Roca 1991). Concentraciones entre 2 a 5% de sacarosa son usualmente óptimas para micropropagación. No obstante, la sacarosa es la fuente energética más utilizada debido a que el azúcar es sintetizado y transportado naturalmente por la planta (Beyl 2000). Sin embargo, hay que poner atención a los efectos de los niveles de sacarosa sobre la morfogénesis y desarrollo de las plantas. Los niveles de sacarosa que resultan en un buen crecimiento de callo, normalmente no son óptimos para la morfogénesis (Sherrington y George 1984).

Las sales nutritivas contribuyen aproximadamente del 20 a 50% del potencial osmótico del medio en tanto que el azúcar es responsable del resto (Beyl 2000)

Bonga y Von Aderkas(1992), dicen que el aporte de los glúcidos no tiene por objeto exclusivo optimizar el crecimiento. Igualmente, puede orientar la organogénesis, aumenta la presión osmótica y producir efectos morfogenéticos distintos. Por consiguiente Margara (1988), afirma que la falta de azúcares es con frecuencia un factor limitante en los cultivos.

La capacidad para utilizar varias fuentes de carbono para crecimiento y desarrollo *in vitro* indican que los azúcares o sus productos degradables deben ser tomados dentro de la célula, convertidos a una forma metabolizada y finalmente integrados al metabolismo celular (Thorpe 1985). Sin embargo, la capacidad de los tejidos para utilizar otros carbohidratos varía con las especies. Además, cultivos derivados de diferentes cultivares, diferentes órganos de la misma planta y aún una célula simple aislada del mismo clon, difieren grandemente en su respuesta a un carbohidrato particular (Thorpe 1985).

Asimismo, la eficiencia de los iones de nitrato y amonio dependen de la concentración de sacarosa y los efectos de la citocinina sobre la división celular pueden ser dependientes de la disponibilidad de azúcar. Una interacción ha sido encontrado entre glucosa y 2-ip sobre la inducción de la división celular en cultivo de células apicales (Sherrington y George 1984).

7.3.5.3 Reguladores de Crecimiento

Todos los sistemas de cultivo de órganos y tejidos hacen uso de reguladores de crecimiento ya sea de fuente natural o artificial. Sin agregar hormonas, muchos tejidos no permanecen viables y mucho menos crecen en la manera que esperamos (Zaerr y Mapes 1985).

Los reguladores de crecimiento ejercen múltiples efectos a bajas concentraciones (0,001 a 10 uM). Ellos regulan la iniciación y desarrollo de brotes, raíces y embriones somáticos sobre explantes en medios de cultivo semisólido o líquidos. Además, estimulan la división y crecimiento celular. Algunas veces un tejido o un explante es autótrofo y puede producir su propio suministro de reguladores de crecimiento, pero usualmente los reguladores de crecimiento (PGR's) deben ser suministrados en el medio (Beyl 2000).

Estudios fisiológicos han indicado que casi todos los aspectos del desarrollo de plantas son influenciados por hormonas de plantas. La aparición natural, transporte y efecto en plantas superiores han sido bien dilucidadas principalmente de observaciones recopiladas de aplicaciones exógenas para cultivo de células, tejidos y órganos (Smigocki y Owens 1999).

Piqueras y Debergh (1999), mencionan que entre los componentes de un medio de cultivo los "biorreguladores" son los mejor documentados aunque probablemente los menos entendidos, sobre los elementos que controlan la respuesta morfogénica en micropropagación. El papel mencionado, enfatiza la posibilidad para manipular la caulogénesis, callogénesis y rizogénesis.

Smigocki y Owens (1999), manifiestan que la clase más importante de los PGR's usados en cultivo de tejidos son las auxinas y citocininas. El efecto relativo de auxinas y citocininas sobre la morfogénesis de tejidos cultivados fue demostrado por Skoog y Miller (1957) y aún hoy se utiliza como la base para la manipulación del cultivo de tejidos de plantas. Algunos de esos PGR's son hormonas naturalmente sintetizadas por plantas superiores y los otros son compuestos sintéticos.

Las auxinas, juegan un rol importante en muchos procesos de desarrollo, incluyendo alargamiento celular, dominancia apical, formación de raíces adventicias é inducción de la embriogénesis somática. Generalmente, cuando la concentración es baja, la iniciación de

raíces es favorecida y cuando la concentración es alta, ocurre la formación de callo. Las auxinas sintéticas más comúnmente usadas son el ácido 1-naphthalen acético (ANA), el ácido 2,4-diclorophenoxyacético (2,4-D) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2 pyridinecarboxilic (Picloram). En forma natural se producen el ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) que son también frecuentemente usados.

El AIA es la más débil de las auxinas y es típicamente usada a concentraciones entre 0.01 y 10 mg/l. Las auxinas más activas son el ANA, AIB, 2,4-D y Picloram, usadas a concentraciones de entre 0.01 a 10 mg/l (Beyl 2000).

En cuanto a las citocininas, promueven la división celular y estimulan la iniciación y crecimiento de brotes *in vitro* (Beyl 2000; Smith 2000). Las citocininas más comúnmente usadas son la zeatina, kinetina, benziladenina, el thidiazuron y el 2-ip. En concentraciones altas (1 a 10 mg/l) inducen la formación de brotes adventicios, pero inhiben la formación de raíces. Ellas promueven la formación de brotes axilares por oposición a la dominancia apical reguladas por las auxinas (Beyl 2000).

La 6-benzilaminopurina (BAP) es la citocinina más utilizada en cultivo de tejidos. Es estable, barata, disponible en seguida y –lo más importante- es altamente efectiva. Numerosos investigadores han reportado su uso en la formación de callo, pero el rol más importante es el de promover la formación de brotes. La razón para la gran efectividad de la BAP puede estar relacionada a la habilidad del tejido vegetal para metabolizar la hormona rápidamente. Se sugiere que la BAP podría inducir la producción de hormona natural tal como la Zeatina al interior del tejido y así trabajar en un sistema de hormona natural para inducir la organogénesis (Zaerr y Mapes 1985).

Los pocos casos en los cuales la 2-ip ha sido usada en el cultivo de árboles forestales indica resultados similares a los encontrados con Zeatina.

7.3.6 Condiciones físicas

Para evitar la contaminación, el cultivo de tejidos es manejado en recipientes cerrados, los cuales restringen el intercambio de gases entre la atmósfera interna del cultivo en el tubo y el ambiente gaseoso externo. La composición del ambiente interno en los tubos viales está influenciado por el tipo de recipiente, la situación de estrés del explante, el ambiente externo y el medio de cultivo (Piqueras y Debergh 1999).

La excesiva acumulación de CO₂ (más de 20%) puede ser responsable del enanismo o la aparición de albinismo en los brotes. El cultivo de tejido de plantas genera CO₂ durante la respiración y solo es tomado en cantidades insignificantes por las células o tejidos fotosintéticamente activos (Piqueras y Debergh 1999).

La concentración de O₂ en el ambiente interno de un recipiente de cultivo influencia el metabolismo y tejidos cultivados por regulación de la cantidad de energía disponible para crecimiento y desarrollo. Cada respuesta morfogenética puede requerir una concentración de oxígeno óptima para un órgano dado y especie (Piqueras y Debergh 1999). Estos autores, también consideran que la luz tiene una fuerte influencia sobre el desarrollo morfológico de las plantas y su acción puede manifestarse de dos maneras, por la vía fotosintética y por la vía de la fotomorfogénesis.