

PROPAGACIÓN CLONAL *in vitro* DE *Swietenia macrophylla* King (CAOBA)

PROGRESS *in vitro* PROPAGATION *Swietenia Macrophylla* King (MAHOGANY)

Mercedes Carranza Patiño¹, Héctor Reyes Morán², Washington Mora Silva¹, Orly Cevallos Falquez¹, Ariel Escobar Troya¹,
María Cadme Arévalo¹, José Nieto Rodríguez¹, Jaime Morante Carriel¹.

¹Dirección de Investigación Científica y Tecnológica, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
Campus Ing. Manuel Haz Álvarez, km 1.5 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. C. P. 73. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

²Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Campus Ing. Manuel Haz
Álvarez, km 1.5 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. C. P. 73. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

Emails: mcarranza@uteq.edu.ec; hec_forestal@yahoo.es; wmora@uteq.edu.ec; fcevallos@uteq.edu.ec;
telariables@hotmail.com; mcadme@uteq.edu.ec; jnieto@uteq.edu.ec; jmorantec@gmail.com

RESUMEN

La caoba (*Swietenia macrophylla*) es una especie forestal maderable de múltiples usos, apreciada por su dureza, resistencia, belleza y calidad. La explotación intensiva y un inadecuado sistema de aprovechamiento de la especie han ocasionado la disminución de la variabilidad genética, haciendo imposible la aplicación de programas de mejoramiento genético de caoba en el Ecuador. El cultivo *in vitro* es una técnica que ayudaría a disminuir este problema mediante la producción de plantas con alta robustez genética. El objetivo de esta investigación fue establecer un método que facilite la propagación *in vitro* de caoba a partir de segmentos nodales, empleados en la fase de establecimiento con diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ y tiempos de exposición. La contaminación por microorganismos fue controlada con 15 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ durante 20 min, alcanzando el 95% de sobrevivencia. Los explantes sanos fueron transferidos a un medio de cultivo MS/2 con distintos niveles de bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) para su multiplicación *in vitro*, obteniéndose 70% de brotes con 2 mg L⁻¹ de BAP en combinación con 1 mg L⁻¹ de AIB. Los mejores brotes de la fase de multiplicación se colocaron en medio de cultivo MS/2 con diferentes concentraciones de ANA para facilitar su enraizamiento, ninguno de los tratamientos ensayados permitió generar raíces a los 21 días de su evaluación, aunque el mayor porcentaje de sobrevivencia (65%) se obtuvo al combinar 2 mg L⁻¹ BAP y 1 mg L⁻¹ ANA.

Palabras clave: Protocolo, propagación *in vitro*, *Swietenia macrophylla*, segmentos nodales

ABSTRACT

Mahogany (*Swietenia macrophylla*), is a widely used timber tree species valued for its hardness, strength, beauty and quality. Intensive exploitation and inadequate use of this species have resulted in the loss of genetic variability, making impossible the implementation of breeding programs of mahogany in Ecuador. *In vitro* culture is a promising technique that would help reducing this problem by producing plants with high genetic strength. The objective of this research was to establish a method to facilitate *in vitro* propagation of mahogany from nodal segments. In order to prevent contamination, nodal segments were treated with $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ solution for 20 min. Healthy explants were transferred to MS/2 culture medium with different concentrations of benzylaminopurine (BAP) and indolebutyric acid (IBA) for further *in vitro* proliferation, obtaining 70% of shoots on medium supplemented with 2 mg L⁻¹ of BAP and 1 mg L⁻¹ IBA. Bud treatment with different concentrations of ANA for *in vitro* rooting was not efficient, although the greatest survival rate (65%) was obtained on culture medium containing 2 mg L⁻¹ BAP and 1 mg L⁻¹ NAA.

Key words: Protocol, *in vitro* propagation, *Swietenia macrophylla*, nodal segments

Recibido: 02-abril-2013. Recibido en forma corregida: 5-Julio-2013.

Aceptado: 28-agosto-2013.

Publicado como ARTÍCULO CIENTÍFICO en Ciencia y Tecnología 6(2): 1-8

Julio-Diciembre de 2013

ISSN 1390-4051 impreso; ISSN 1390-4043 electrónico

© Ciencia y Tecnología. UTEQ. Quevedo-Ecuador

INTRODUCCIÓN

La caoba (*Swietenia macrophylla*) se distribuye geográficamente en Belice, Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Venezuela y Ecuador en bosques nativos (Flora y Fauna Internacional, 2006). Está considerada una de las especies maderables más valiosas del mundo (Lamb, 1996). En plantaciones se obtiene subproductos como antipirético, tónico, astringente (RISE, 1995), producción de pulpa para papel, siendo Estados Unidos, Japón y el Reino Unido los principales importadores de caoba (Burley, 1987).

S. macrophylla, es una de las especies maderables con mayor índice de tala, más del 80% (Grogan *et al.*, 2002). Sus poblaciones muestran indicios de declives y fragmentación en la mayor parte del área de distribución, provocando su disminución acelerada (Winograd, 1995), incluyéndola en la lista de especies en peligro de extinción por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, 1994).

El factor biológico limitante para el desarrollo normal de árboles jóvenes de caoba está determinado en muchos casos por la susceptibilidad al ataque de *Hypsipyla grandella* Zell (Lepidoptera-Pyralidae), insecto barrenador de Meliáceas que ataca y consume los meristemos apicales y rebrotes (Howard y Mérida, 2004), reducción de fuste y muerte de la planta (Grogan *et al.*, 2003 y Pérez *et al.*, 2006).

Otros factores limitantes se deben a la baja germinación (10 al 70%) lo cual reduce la propagación sexual de la caoba (Quinto *et al.*, 2009), semillas de origen desconocido (Prado *et al.*, 2012), ensayos insuficientes de selección basados en características fenotípicas y genotípicas, resultan plantaciones de alta heterogeneidad (Neill y Revelo, 1998).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, 1994, 1997, 2001, 2010) sugiere mantener el recurso genético de la caoba de alta prioridad encontrándose por su situación en peligro de extinción (Jiménez *et al.*, 1996). Una de las estrategias para superar las dificultades de propagación y evitar la extinción de especies valiosas, es el cultivo *in vitro* de tejido vegetal (Delgado *et al.*, 2008). Esta técnica permite obtener plantas a partir de un fragmento pequeño de tejido cultivado en condiciones estériles (Murashige y Skoog, 1962). La propagación *in vitro* vía organogénesis directa incrementa de forma rápida el número de individuos, etapa importante en la producción de plántulas a nivel industrial y un banco de germoplasma con fines de rescate (Uribe *et al.*, 2008). Además, permite obtener plantas libres de enfermedades, en algunas ocasiones reduce el tiempo de propagación

(Rebolledo *et al.*, 2006). Debido a las dificultades de propagación sexual de caoba y escasa información disponible de propagación *in vitro* (Valverde *et al.*, 1998 y Collado *et al.*, 2004), se ha propuesto establecer un método reproducible que facilite el establecimiento y multiplicación de plantas de caoba, mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, vía organogénesis directa con fines de recuperación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, durante el año 2012.

Material vegetal y preparación de los explantes

Se empleó segmentos nodales de plantas de caoba de seis meses de edad de la Estación Experimental Boliche del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)-Ecuador. Previo a la recolección de los explantes, las plantas fueron trasladadas hasta el invernadero del Laboratorio de Biotecnología. Fumigadas dos veces por semana con mezcla de Agrimicin y Benlate a una concentración de 1 g L⁻¹ (Araya, 2006) para disminuir la contaminación de los segmentos nodales en el establecimiento *in vitro* (Figura 1A) (Rebolledo *et al.*, 2006 y Flores *et al.*, 2009).

Medios de cultivo

Se empleó el medio de cultivo MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) y Uribe *et al.* (2008), suplementado con bacto agar (Becton, Dickinson and Company) (7 g L⁻¹) como agente gelificante y los nitratos al 50% (MS/s) (Collado *et al.*, 2004 y Pierik, 1990), sacarosa (20 g L⁻¹), 20 mg L⁻¹ de gentamicina. El pH ajustado a 5.7 con NaOH a una concentración 0.1 N. El medio fue químicamente esterilizado con vitrofurul al 0.116 g L⁻¹, en la cámara de flujo laminar.

Fases de la propagación *in vitro*

Establecimiento aséptico del cultivo. Explantes de 2.5 y 3.5 cm de longitud fueron sumergidos en 100 mL de agua destilada estéril con 2 gotas de tween 20 (polioxietileno de sorbitan, un detergente líquido) durante dos minutos, transferidos a 10 y 15 g de hipoclorito de calcio en 100 mL de agua destilada durante 10, 15 y 20 minutos, con tres enjuagues de agua destilada estéril. El último enjuague los explantes fueron sumergidos en gentamicina de 20 mg L⁻¹ por 20 minutos en cámara de flujo laminar vertical (figura 1A-B). Los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo

con 15 mL de medio de cultivo e incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 21 días.

Fase de multiplicación. Subsiguientemente, explantes libres de agentes contaminantes de entre 1.5 y 2 cm de longitud, fueron transferidos a un medio de cultivo MS de multiplicación, con bencilaminopurina (BAP) (1, 2 y 3 mg L^{-1}) y ácido indolbutírico (AIB) (0.5 y 1 mg L^{-1}), siguiendo el método descrito por Gupta *et al.* (1980). Se efectuaron tres siembras a intervalos constantes de 21 días.

Fase de enraizamiento. Se seleccionaron brotes de 3 cm de longitud de la fase de multiplicación, se ubicaron en el medio de cultivo MS con AIB a concentraciones de 1; 1.5; 2 y 2.5 mg L^{-1} (Figura 1E). Los explantes fueron evaluados a los 21 días de su establecimiento. En el Cuadro 1 se muestran los tratamientos y las variables evaluadas en las distintas fases de la propagación *in vitro*.

Incubación y fotoperíodo de vitroplantas. La incubación en las tres etapas se efectuó en una cámara

de cultivo con intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 16 h y temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para analizar las condiciones del ensayo en la fase de establecimiento, se empleó un Diseño Completo al Azar (DCA) con arreglo factorial (2x3) (Cuadro 1) con seis tratamientos, cuatro repeticiones. En la fase de multiplicación, se aplicó un DCA con arreglo factorial (3x2) (Cuadro 1), con seis tratamientos, cuatro repeticiones. La fase de enraizamiento, se evaluó mediante un DCA con cuatro tratamientos, cuatro repeticiones. Se utilizaron cinco unidades experimentales en cada fase.

Los datos de cada una de las variables se sometieron a un análisis de varianza ANDEVA y separación de medias al 95% de probabilidad, empleando el programa estadístico MSTAT-C (Michigan State University, 1983). Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se efectuó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($p < 0.05$). Los datos con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula: $\sqrt{(x+0.5)}$.

Cuadro 1. Tratamientos y variables evaluadas en las distintas fases de la propagación *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (caoba)

Fases de la propagación <i>in vitro</i>	Variables analizadas por fase
Establecimiento	
T1 10 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 10 min	Contaminación hongos
T2 10 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 15 min	Contaminación bacterias
T3 10 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 20 min	Número de explantes quemados (necrosis)
T4 15 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 10 min	Porcentaje de explantes vivos
T5 15 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 15 min	Número de brotes
T6 15 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 20 min	Longitud de brotes
Multiplicación	
T1 1 mg L^{-1} BAP + 0.5 mg L^{-1} AIB	Contaminación hongos
T2 1 mg L^{-1} BAP + 1 mg L^{-1} AIB	Contaminación bacterias
T3 2 mg L^{-1} BAP + 0.5 mg L^{-1} AIB	Porcentaje de brotes
T4 2 mg L^{-1} BAP + 1 mg L^{-1} AIB	Número de brotes
T5 3 mg L^{-1} BAP + 0.5 mg L^{-1} AIB	Longitud de brote mayor
T6 3 mg L^{-1} BAP + 1 mg L^{-1} AIB	
Enraizamiento	
T1 1 mg L^{-1} BAP + 0.5 mg L^{-1} ANA	Contaminación hongos
T2 1 mg L^{-1} BAP + 1 mg L^{-1} ANA	Contaminación bacterias
T3 2 mg L^{-1} BAP + 0.5 mg L^{-1} ANA	Porcentaje de explantes vivos
T4 2 mg L^{-1} BAP + 1 mg L^{-1} ANA	Número de raíces
	Longitud de raíces

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de establecimiento

La contaminación por bacterias, número de brotes y longitud de brotes (tratamientos T3, T6 y T5) no mostraron diferencia ($p < 0.05$). En los explantes contaminados por hongos, quemados y vivos (%), se observan diferencias notables ($p < 0.05$), obteniendo los promedios más altos en los tratamientos T2, T5 y T6. Al aplicar 15 g de hipoclorito de calcio durante 20 minutos (T6), no se observó diferencias, alcanzando un 95% de explantes vivos, libres de contaminación por hongos y bacterias a los 21 días de evaluación (Cuadro 2).

Los resultados obtenidos en esta fase, superan a los descritos para *Tectona grandis* utilizando hipoclorito de calcio al 4% por 10 minutos con 31.67% de explantes vivos (Abdelnour y Muñoz, 2005). Mroginski *et al.* (2003) al emplear 1.8% de NaOCl por 30 min encontraron un 35% de contaminación en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Toona ciliata* (Meliaceae) de 2 años de edad. Flores *et al.* (2009) en *Ficus carica*, al emplear hipoclorito de calcio al 8 y 10% por 10 y 20 min, obtiene un 64% de sobrevivencia, respectivamente. Pérez *et al.* (2012) aplicaron hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min en explantes de caoba, logrando reducir la contaminación hasta un 14%.

Aunque los problemas en el establecimiento *in vitro* de especies leñosas, se debe en gran medida a la contaminación microbiana de los explantes provenientes del invernadero, los resultados obtenidos sugieren que la contaminación presente en el material vegetal de caoba puede ser impedido mediante la desinfección con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ o por la adición de éste al medio de cultivo.

Fase de multiplicación

Si bien, no se encontró diferencias ($p < 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 3), al añadir 2 mg L⁻¹ de BAP en combinación con 1 mg L⁻¹ de AIB, se obtuvo el 70% de explantes con brotes y un promedio de 0.17 cm de longitud (T4). Estos resultados son superiores a los obtenidos por Collado *et al.* (2004) quienes alcanzaron un 63.9% de explantes brotados con 0.2 mg L⁻¹ de 6-BAP empleando ápices y segmentos nodales de caoba. Según Vázquez y Torres (1995) el comportamiento de los explantes en esta fase de la propagación *in vitro* requiere un adecuado balance endógeno de reguladores del crecimiento, siendo imprescindible para la multiplicación *in vitro* de tejidos vegetales.

La combinación de BAP y AIB incrementaron el porcentaje de explantes brotados al efecto sobre la división celular. Además, Tacoronte (1998) desarrolló yemas axilares en segmentos nodales de plantas de caoba germinadas *in vitro* en el medio de cultivo MS/2 con la utilización de BA (benciladenina), 2 mg L⁻¹ y AIA (ácido indol acético), 2 mg L⁻¹, con un porcentaje de brotes inferior a los obtenidos en este trabajo.

El efecto inhibitorio en la emisión y elongación de los brotes por aumento en la concentración exógena de hormonas es diferente dependiendo del tipo de hormona a emplear, reducción de los niveles, ya sea de auxina o citoquinina, teniendo efectos distintos sobre el desarrollo de las plántulas *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2004). Para inducir la división y elongación celular, es necesario un balance apropiado entre citoquininas y auxinas, en un medio nutritivo, además de las que se encuentran

Cuadro 2. Establecimiento aséptico de segmentos nodales para el cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (caoba)

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	10 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 10 min	10 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 15 min	10 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 20 min	15 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 10 min	15 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 15 min	15 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$
Número de bacterias	0.30 a	0.25 a	0.40 a	0.35 a	0.19 a	0.00 a
Número de hongos	0.30 b	0.70 a	0.25 b	0.15 bc	0.10 bc	0.00 c
Número de explantes quemados	0.05 b	0.00 b	0.10 ab	0.05 ab	0.20 a	0.00 b
Explantes vivos (%)	35.00 bc	5.00 c	25.00 bc	35.00 bc	55.00 ab	95.00 a
Número de brotes	0.60 a	0.05 b	0.25 ab	0.40 ab	0.55 a	0.65 a
Longitud de brotes (cm)	0.53 a	0.13 a	0.20 a	0.63 a	0.75 a	0.63 a
DE*	0.34	0.25	0.31	0.31	0.33	0.19

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$).

Cuadro 3. Fase de multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King (caoba)

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1 mg L ⁻¹ BAP+ 0.5 mg L ⁻¹ AIB	1 mg L ⁻¹ BAP+ 1 mg L ⁻¹ AIB	2 mg L ⁻¹ BAP+ 0.5 mg L ⁻¹ AIB	2 mg L ⁻¹ BAP+ 1 mg L ⁻¹ AIB	3 mg L ⁻¹ BAP+ 0.5 mg L ⁻¹ AIB	3 mg L ⁻¹ BAP+ 1 mg L ⁻¹ AIB
Número de bacterias	0.35 a	0.10 a	0.15 a	0.05 a	0.35 a	0.15 a
Número de hongos	0.30 a	0.50 a	0.15 a	0.15 a	0.45 a	0.50 a
Explantos vivos (%)	35.00 a	35.00 a	65.00 a	70.00 a	30.00 a	50.00 a
Número de brotes	0.35 a	0.40 a	0.65 a	0.70 a	0.40 a	0.45 a
Longitud de brotes (cm)	0.09 a	0.08 a	0.17 a	0.07 a	0.03 a	0.16 a
DE*	0.11	0.03	0.05	0.08	0.10	0.03

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, p>0.05).

en forma endógena en los explantes *in vitro* (Cob *et al.*, 2010; Martínez y Pacheco, 2006). Los resultados encontrados en esta investigación respecto del número de brotes (0.35 a 0.70) concuerdan con lo expresado por Bernal *et al.* (2009), que los requerimientos de citoquinina en las plantas *in vitro* son extremadamente variables y las respuestas a la inducción de brotes dependen del contenido endógeno de cada especie y del tipo de explante utilizado.

La aplicación de los reguladores del crecimiento al medio de cultivo va a depender del tipo de diferenciación que se desea obtener. La estimulación de las yemas terminales en la etapa de micropropagación se suele realizar mediante el empleo de bencilaminopurina (BAP), puesto que esta citoquinina aplicada en bajas concentraciones, promueve no sólo la división celular sino también la brotación y elongación de las yemas (Collado *et al.*, 2004). En éste estudio, la combinación de BAP y AIB, en una relación 2:1 mg L⁻¹ fue suficiente para conseguir alto porcentaje de brotación y aceptable longitud de brotes de caoba.

Fase de enraizamiento

De todos los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento (cuadro 4) ninguno permitió la formación de raíces, sin embargo, con el tratamiento T4: 2 mg L⁻¹ BAP + 1 mg L⁻¹ ANA se obtuvo un 65% de explantes vivos. Estos resultados fueron similares a los descritos por Bernal *et al.* (2009) en el enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *S. macrophylla*. La baja capacidad de enraizamiento se mostró con la auxina AIB, inhibida completamente en las diferentes concentraciones utilizadas. En *Tectona grandis* (Teca) la respuesta rizogénica fue de 13.3% al utilizar 3 mg L⁻¹ de ANA y 18% al emplear 2.5 mg L⁻¹ de AIB enraizaron (Abdelnour y Muñoz, 2005).

Silva *et al.* (2010) indican que no todas las auxinas naturales o sintéticas pueden inducir primordios radicales *in vitro*. En algunas especies vegetales se dificulta el arraigado aún en presencia de auxinas, siendo otros factores los que influyen en la inducción de raíces (Vázquez y Torres, 1995). Algunas especies de plantas no necesitan pasar por la etapa de enraizamiento y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde

Cuadro 4. Fase de enraizamiento *in vitro* de yemas axilares de *Swietenia macrophylla* King (caoba)

Variables	T1	T2	T3	T4
	1 mg L ⁻¹ BAP + 0.5 mg L ⁻¹ AIB	1 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ ANA	2 mg L ⁻¹ BAP + 0.5 mg L ⁻¹ ANA	2 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ ANA
Número de bacterias	0.50 a	0.20 b	0.20 b	0.20 b
Número de hongos	0.05 a	0.05 a	0.10 a	0.00 a
Explantos vivos (%)	25.00 b	50.00 ab	20.00 b	65.00 a
Número de raíces	0.25 a	0.95 a	0.25 a	0.70 a
Longitud de raíces (cm)	0.15 a	0.55 a	0.10 a	0.25 a
DE*	0.11	0.16	0.09	0.08

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, p>0.05).

desarrollan yemas nuevas, ocurriendo el proceso de multiplicación y enraizamiento en forma simultánea (Sánchez *et al.*, 2004). En esta investigación se realizó una combinación de citoquinina BAP y la auxina AIA, siendo la más utilizada en la inducción radical (Collado *et al.*, 2004).

Identificación de agentes patógenos

En el proceso de la propagación *in vitro* de caoba se evidenció la presencia de diversos hongos filamentosos, así como bacterias en los diferentes tratamientos. La clasificación y detección se realizó a nivel de género en el caso de hongos, de acuerdo a claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1972). Uno de los hongos encontrados en el cultivo *in vitro* de caoba pertenece al género *Curvularia*. Estos resultados coinciden con los descritos por Acosta *et al.* (2002) quien encontró varios géneros

de hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de árboles leñosos, incluido *Curvularia*.

A pesar de que se han implementado protocolos para propagar un gran número de especies forestales por cultivo *in vitro*, la contaminación fúngica y bacteriana de los explantes constituye uno de los problemas que limita su aplicación (Acosta *et al.*, 2009 y Alvarado, 1998). Los principales microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* son los hongos filamentosos, las levaduras y las bacterias, los cuales habitan comúnmente plantas *in vivo*, pero tienen efectos devastadores en el cultivo *in vitro* (George, 1993; Leifert *et al.*, 1994; Leifert y Cassells, 2001).

En la Figura 1, se muestran los resultados de la propagación *in vitro* de caoba, desde la desinfección de los segmentos nodales hasta su multiplicación y enraizamiento.

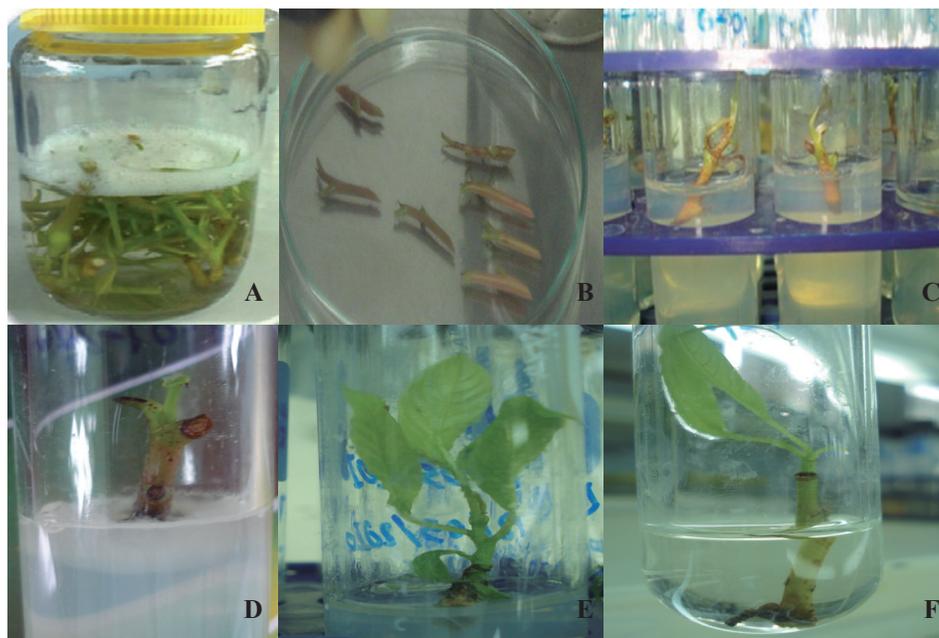


Figura 1. Desinfección de explantes (A), explantes en la fase de establecimiento aséptico (B, C), explante contaminado por hongo (D), fase de multiplicación (E), fase de enraizamiento (F)

CONCLUSIONES

En la fase de establecimiento *in vitro* de explantes de caoba, se demuestra que la aplicación de 15 g de hipoclorito de calcio durante 20 min, permite reducir significativamente la contaminación de los explantes por microorganismos. En la fase de multiplicación *in vitro*, el medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIB, permitió generar el 70% de brotes sanos.

El enraizamiento de brotes de caoba en dosis

combinadas de BAP/AIB y BAP/ANA, no presentó efecto alguno. La ausencia de raíces puede estar asociada al corto periodo de evaluación de los explantes y a las bajas dosis. Siendo necesario, evaluar concentraciones de BAP, ANA y AIA superiores a 2 mg L⁻¹. El establecimiento de segmentos nodales de caoba tiene gran importancia ya que por vez primera se ha logrado obtener una metodología reproducible para la propagación *in vitro* de esta especie en el Ecuador.

LITERATURA CITADA

- Abdelnour, A., A. Muñoz. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: Revista Forestal 2(5): 11
- Araya, J. 2006. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de caña de azúcar a partir de explantes foliares y yemas axilares. Proyecto presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, p. 26-30.
- Acosta, M., Y. Alvarado, I. Caballero. 2002. Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). Biotecnología Vegetal 2(2): 67-71.
- Acosta, M., Y. Alvarado, M. Cruz, M. Leiva, C. Sánchez, B. Roque, E. Quijala, M. Chávez, F. Jiménez, R. Barbón, R. Collado, M. Rodríguez, M. Feria, I. Borroto, M. Pérez. 2009. Microbiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales. Cuba. Biotecnología Vegetal 9(2): 99-103.
- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In Pérez, J. (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, CU, Instituto de Biotecnología de las Plantas. p. 81-104.
- Barnett, H., B. Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3 ed. Estados Unidos: Burgess Publishing Company.
- Bernal, J., A. Rojas, A. Hine. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitropiantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliáceas), Tecnología en Marcha 22(3): 34-41.
- Burley, J. 1987. Applications of biotechnology in silviculture and development rural. Common. Mérida, Venezuela. Forest Review 66(4): 357-367.
- CITES. 1994. Proposal to include in Appendix II Neotropical populations of *Swietenia macrophylla* and natural hybrids with *S. Mahagoni* and *S. Humilis*. Ninth Meeting of the conference of the parties. Fort Lauderdale, Florida, USA.
- Cob, J., A. Sabja, D. Ríos, A. Lara, P. Donoso, L. Arias, B. Escobar. 2010. Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación *in vitro* de *Persea lingue* en la zona Centro-Sur de Chile. Bosque (Valdivia) 31(3): 202-208
- Collado, R., R. Barbón, D. Agramonte, F. Jiménez, M. Pérez, G. Odalys, D. Ramírez. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King, Universidad Central "Marta Abreu", Cuba. Biotecnología Vegetal 4(3): 143-146.
- Delgado, M. F., M. Cuba, P. Hechenleitner, O. Thiers. 2008. Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosá*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. Bosque (Valdivia) 29(2): 120-126.
- FAO. 1994. Informe: Cuadro de Expertos de la FAO en recursos genéticos forestales. Octava Reunión. FO: FGR/8/Rep. Roma, Italia, 28-30 de junio de 1993. 57 p.
- FAO. 1997. Informe: Cuadro de Expertos de la FAO en recursos genéticos forestales. Novena Reunión. FO: FRG/9/ Rep. Roma, p. 58.
- FAO. 2001. Situación de los Bosques del Mundo 2001. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- FAO. 2010. FAO Forestry, XIII World Forestry Congress. Unasylva. 61(234-235): 71-73.
- Flora y Fauna Internacional. 2006. Estado y aprovechamiento sostenible de la caoba en Centroamérica. Reino Unido, ISBN 1903703 21 2. 48 p.
- Flores, M., V. Jiménez, R. Chacon. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas, Revista Forestal Agronomía Mesoamericana 20(2): 319-325.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. p. 130-143.
- Grogan J., M. Ashton, J. Galvao. 2003. Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedling survival and growth across a topographic gradient in southeast Pará, Brasil. Forest Ecology and Management 186: 311-326.
- Grogan, J., P. Barreto, A. Veríssimo. 2002. Mahogany in the brazilian amazon: Ecology and perspectives on management / Mogno na Amazônia Brasileira: Ecologia e perspectivas de manejo. Belén (Brasil), Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazonia. 58 p
- Gupta, P., A. Nadgir, A. Mascarenhas, V. Fagannathan. 1980. Tissue culture of foresta trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. Plant Science Letters 17:259-268.
- Howard, F. W., M. A. Mérida. 2004. El taladrador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae). EDIS/IFAS, University of Florida. Document EENY-337. (en línea). Disponible http://edis.ifas.ufl.edu/document_in614.
- Jiménez, H., E. Alpizar, J. Ledezma, J. Tosi, R. Bolanos, R. Solórzano, J. Echeverría, P. Onorio, M. Castillo, R. Macilla. 1996. Estudio sobre el estado de regeneración natural de *Swietenia macrophylla*

- King "Mara" en Santa Cruz, Bolivia. World Wildlife Fund. p. 102.
- Lamb, F. B. 1996. Mahogany of tropical America: Its ecology and management, Ann. Arbor: University of Michigan Press, p. 219.
- Leifert, C., C. Morris, W. Waites. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue cultura and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences 13:139-183.
- Leifert, C., A. Cassells. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures *in vitro*. Cell Dev. Biol. Plant 37(2):133-138.
- Martínez. M., J. Pacheco. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea microphylla* Baker. Agronomía Colombiana 24(2): 207-213.
- Michigan State University. 1989. MSTAT-C. A software program for the design, management, and analysis of agronomic research experiments. Russell, D.F. (Director MSTAT). Michigan State University, Department of Crop and Soil Sciences and Department of Agricultural Economic, East Lansing, Michigan, USA.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and biossays of tobacco cultures. Physiological Plantarum 15: 473-497.
- Mroginski, E., H. Rey, A. Mroginski. 2003. *In vitro* plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliata*, Meliaceae). New Forests 25: 177-184.
- Neill, D., N. Revelo. 1998. Silvicultural trials of Mahogany (*Swietenia macrophylla*) interplanted with two Inga species in Amazonian Ecuador. In the genus Inga: utilization. Terence D. Pennington y Erick C. Fernades. Kew, In. The Royal Botanical Gardens. p. 141-150.
- Pérez, F., M. Aguilar, T. Roca. 2012. Assays for the *in vitro* establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. Rev. Colomb. Biotecnol. 14(1): 20-30
- Pérez, J., F. Mesén, M. Aguilar, L. Hilje. 2006. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Fases de desarrollo y enraizamiento. Recursos Naturales y Ambiente 46-47: 146-151.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores Ediciones mundi-prensa. Madrid España 326 pp.
- Prado, L., C. Samaniego, J. Ugarte-Guerra. 2012. Estudio de las cadenas de abastecimiento de germoplasma forestal en Ecuador. ICRAF working paper No 115. World Agroforestry Centre (ICRAF), Lima, Peru.
- Quinto, L., P. Martínez-Hernández, L. Pimentel-Bribiesca, D. Rodríguez-Trejo. 2009. Alternativas para mejorar la germinación de semillas de tres árboles tropicales. Revista. Chapingo 15(1): 23-28.
- Rebolledo, V., R. Aparicio, A. Cruz. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. Foresta Veracruzana 8(2):19-22.
- RISE (Reforestation Species). 1995. Mahogany (*Swietenia macrophylla* King) and Narra (*Pterocarpus* spp.). Ecosystem Research and Development Bureau College. Languna Philippines, 7(1).
- Sánchez, M., D. Ríos, M. Pedraza, G. Pereira, H. Castellanos, R. Escobar. 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst) a partir de embriones aislados, Revista Forestal, Bosque 25(1): 123-128.
- Silva, L., P. de Tarso, S. de Souza, C. de Queiroz, H. Brandão. 2010. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Acta Amaz. 40(2): 275-279.
- Tacoronte, B. 1998. Cultivo *in vitro*. Una alternativa de propagación vegetativa en caoba, *Swietenia macrophylla* King. Revista Forestal Venezolana 42(1): 235-238
- Uribe, M., C. Delaveau, M. Garcés, R. Escobar. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque 29(1): 58-64.
- Valverde, L., M. Dufour, V. Villalobos. 1998. *In vitro* organogénesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabácea, meliácea). Rev. Trop., 46(2): 225-228.
- Vázquez, E., S. Torres. 1995. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. Segunda edición. Ciudad de la Habana.
- Winograd, M. 1995. Indicadores ambientales para Latinoamérica y el Caribe: Hacia la sostenibilidad en el uso de tierras. San José, C R. GASE, Proyecto IICA/GTZ, OEA, WRI, p. 85.