



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA

“PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CAOBA (*Swietenia macrophylla* King
MELIACEAE) ESPECIE FORESTAL EN ESTADO DE VULNERABILIDAD”

AUTORES:

BACUSOY RODRIGUEZ JONATHAN GABRIEL

MACÍAS DE LA CRUZ GEMA ANDREA

TUTORA:

Ing. LILIANA COROZO QUIÑONEZ Mg. Sc.

REVISOR:

Ing. JOSÉ NEWTHON PICO MENDOZA PhD.

SANTA ANA – MANABÍ- ECUADOR

2019

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**Tema: “PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CAOBA (*SWIETENIA MACROPHYLLA*
KING) ESPECIE FORESTAL EN ESTADO DE VULNERABILIDAD”**

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del Tribunal de Seguimiento y Evaluación, legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADA POR:

Dra. Mariana García De Almeida PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Fernando Sánchez Mora PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Carlos Salas Macías PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN

Ing. **LILIANA COROZO QUIÑONEZ** Mg. Sc. Docente de la Facultad de ingeniería Agronómica de la universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CAOBA (*SWIETENIA MACROPHYLLA* KING) ESPECIE FORESTAL EN ESTADO DE VULNERABILIDAD**”, es trabajo original realizado por los estudiantes **BACUSOY RODRÍGUEZ JONATHAN GABRIEL** y **MACÍAS DE LA CRUZ GEMA ANDREA**, el cual fue realizado bajo mi tutoría.

Ing. Liliana Corozo Quiñonez. Mg. Sc.

TUTORA DE TESIS

CERTIFICACIÓN

DR. **JOSÉ NEWTHON PICO MENDOZA PhD**, Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la universidad Técnica de Manabí

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CAOBA (*Swietenia macrophylla* KING) ESPECIE FORESTAL EN ESTADO DE VULNERABILIDAD**”, es trabajo orinal realizado por los estudiantes **BACUSOY RODRÍGUEZ JONATHAN GABRIEL Y MACÍAS DE LA CRUZ GEMA ANDREA**, el cual fue realizado bajo mi revisión.

Ing. José Newthon Pico Mendoza PhD.

REVISOR DE TESIS

DECLARACIÓN

BACUSOY RODRIGUEZ JONATHAN GABRIEL y MACÍAS DE LA CRUZ GEMA ANDREA, declaráramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría; y que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración de este trabajo investigativo es de sumo derecho de propiedad intelectual de los autores.

Jonathan Gabriel Bacusoy Rodríguez
AUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Gema Andrea Macías De la Cruz
AUTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento infinito al que todo lo puede Dios, a nuestros padres y familia en general, por todo el apoyo incondicional que nos brindaron día a día para que el cumplimiento de nuestra meta sea hoy una realidad.

A la Universidad Técnica de Manabí- Facultad de Ciencias Agronómica – Escuela de Agronomía, por formarnos en sus aulas como profesionales de lucha, por enseñarnos conocimientos, así como valores.

A nuestra tutora, **Ingeniera LILIANA COROZO QUIÑONEZ Mg. Sc**, por todo el apoyo y la enseñanza brindada para que este trabajo investigativo se realice de la mejor manera.

A la **Ingeniera FÁTIMA CONSUELO MACÍAS PONCE** quien es la encargada del laboratorio de cultivos de tejido de nuestra facultad, a ella le agradecemos por las facilidades, consejos e invaluable ayuda en la realización del presente trabajo.

Al revisor de nuestro presente trabajo **Ingeniero JOSÉ PICO MENDOZA PHD**; por las sugerencias y correcciones hacia nuestro trabajo.

Y, por último, pero no menos importante agradecer a todas y cada una de las personas que formaron parte de este ciclo como son nuestros docentes, personal administrativo, amigos y compañeros de aula con quienes quedamos eternamente agradecidos por ser de ayuda a lo largo de nuestros días en la facultad.

Jonathan Bacusoy y Gema Macías

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a DIOS por darme sabiduría en el desarrollo de los estudios emprendidos y en el proceso de la investigación de titulación.

A mis padres Ramón Nicanor Bacusoy Gutiérrez y Carmen Magdalena Rodríguez Espinosa que han sido mi pilar fundamental e inspiración en mi proceso de impulso profesional, a mis tíos/a por haberme siempre apoyado en momentos difíciles, a mis compañeros de aula por su amistad, apoyo y alentarme en terminar este objetivo de estudio. A mi compañera de trabajo de titulación, porque juntos hemos logrado alcanzar esta meta.

A mi hermana Carmen por cada uno de sus consejos para así lograr alcanzar esta meta propuesta.

También quiero dedicarle mi trabajo de titulación a los docentes de la Universidad Técnica de Manabí quienes en los diversos niveles de estudio con cada enseñanza me fueron puliendo hasta convertirme en una excelente profesional.

Para todos ustedes mi lealtad, mi cariño y esfuerzo en este trabajo.

Jonathan Gabriel Bacusoy Rodríguez

DEDICATORIA

El presente trabajo refleja mi esfuerzo, mi dedicación y mi tiempo, tengo a bien dedicárselo a DIOS por ser el portador de la vida, de la fuerza y del desempeño que me permitió salir adelante siempre.

A mi madre María De la Cruz, quien fue la base fundamental de todos mis logros, el motor de mi vida y mi motivo de superación, es a ella a quien le debo todo lo que he logrado hasta el día de hoy, A mis padres-abuelos de crianza Don Carlos Guillen su esposa Sra. Bella Cedeño y familia quienes han estado en todos y cada uno de mis logros, a mi abuelita que, aunque ya no esté entre nosotros sé que estaría muy orgullosa de mí pues ella siempre me apoyó en todas y cada una mis metas.

A mi papá Wilson Macías quien de una u otra manera ha estado presente en todos estos años de estudio.

A la Ing., Mg. Sc, Liliana Corozo y a la Ing. Fátima Macías por depositar su confianza en mí y mi compañero durante la realización de este trabajo.

A Jesús Centeno quien ha sido de ayuda fundamental, ha estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos. Este proyecto no fue fácil, pero estuviste conmigo motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían. Te lo agradezco muchísimo, amor. A mis compañeros de estudios, quiero agradecerle y dedicarle este logro alcanzado, por nunca dejar de creer en mí, por ser quienes me motivaron a seguir preparándome profesionalmente, por su apoyo incondicional desde el inicio de mi etapa universitaria y por los gratos momentos que vivimos juntos, quien con sus sabios consejos y palabras de aliento me reconfortaron en todo momento.

A mi compañero de trabajo de titulación Jonathan Bacusoy, ya que juntos hemos cumplido una de nuestras metas.

No puedo dejar de dedicárselo a todos los docentes de la Universidad Técnica de Manabí de la Facultad de Agronomía, quienes hicieron de mí una gran profesional, este trabajo es para todos ustedes.

Gema Andrea Macías De la Cruz

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar la micropropagación de Caoba (*Swietenia macrophylla*) a partir de ápices de plántulas germinadas *in vitro*, el mismo que se realizó desde septiembre del 2018 a febrero del 2019 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí. La micropropagación se realizó en tres fases: para el establecimiento se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS), en la fase de multiplicación se emplearon como medios de cultivo Murashig y Skoog (M.S), Murashig y Skoog al 50 % (M.S/2) y Woody Plant Midium (WPM) suplementados con BAP 1 mg + GA3 0,2 mg. Mientras que para el enraizamiento se utilizó WPM con diferentes niveles de AIB (1,5mg, 2mg, 2,5mg). Los explantes fueron mantenidos en condiciones de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El mayor porcentaje de plántulas germinadas *in vitro* (8días) se obtuvo en las semillas sembradas sin testa. En la fase de multiplicación la mejor respuesta se obtuvo en el medio WPM obteniendo el mayor número de brotes 3.33, con un diámetro del tallo de 0.27 cm y con una altura de planta de 1.52 cm, sin embargo, en la fase de enraizamiento la mejor respuesta se obtuvo con Woody Plant Medium (WPM) + 2mg de AIB sin carbón activado.

Palabras claves: Micropropagación, enraizamiento, explantes, brotes, forestal.

SUMMARY

The objective of this work was to carry out the micropropagation of Mahogany (*Swietenia macrophylla* king) from sprouts of germinated seedlings in vitro, the same one that was carried out from September 2018 to February 2019 in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agronomic Engineering from the Technical University of Manabí. The micropropagation was carried out in three phases: for the establishment the basal medium of Murashige and Skoog (MS) was used, in the multiplication phase Murashige and Skoog (MS), Murashige and Skoog (MS / 2) were used as culture media and Woody Plant Medium (WPM) supplemented with BAP 1 mg + GA3 0.2 mg. While for rooting WPM was used with different levels of AIB (1.5mg, 2mg, 2.5mg). The explants were maintained under conditions of 24 + 2 ° C and a photoperiod of 16 light hours and 8 dark hours. The highest percentage of germinated seedlings in vitro (8 days) was obtained in seeds sown without testa. In the multiplication phase the best response was obtained in the WPM medium, obtaining the highest number of shoots 3.33, with a stem diameter of 0.27 cm and with a plant height of 1.52 cm, however, in the rooting phase the best response was obtained with Woody Plant Medium (WPM) + 2mg of AIB without activated carbon.

Keywords: Micropropagation, rooting, explants, shoots, forest.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
3.	JUSTIFICACIÓN.....	5
4.	OBJETIVOS	7
4.1.	General.....	7
4.2.	Específicos.....	7
5.	MARCO TEÓRICO.....	8
4.1.	Reseña histórica del cultivo de tejido	8
4.2.	Clasificación taxonómica de la caoba.....	9
4.3.	Generalidades de la especie de <i>S. macrophylla</i>	10
4.4.	Distribución de <i>S. macrophylla</i>	10
4.5.	Cultivos de tejidos vegetales.....	10
4.6.	Organogénesis	16
4.7.	Embriogénesis	16
4.8.	Factores que afectan el cultivo <i>in vitro</i> de plantas	17
4.9.	Importancia de la propagación <i>in vitro</i> en caoba.....	18
6.	DISEÑO METODOLÓGICO	19
5.1.	Ubicación del ensayo.....	19
5.2.	Metodología	19
5.3.	Material vegetal.....	19

5.4.	Fases de cultivo <i>in vitro</i>	19
5.5.	Establecimiento de semillas de caoba <i>in vitro</i>	20
5.5.1.	Germinación de semillas	20
5.5.1.1.	Porcentaje de germinación (%)	20
5.5.1.2.	Porcentaje de contaminación (%).....	20
5.6.	Introducción de los brotes de caoba	22
5.6.1.	Variables para la introducción (Cuadro 1)	22
5.6.1.1.	Porcentaje de supervivencia de los explantes (%).....	22
5.6.1.2.	Tiempo de respuesta (días).....	22
5.7.	Multiplicación y evaluación de la mejor respuesta del medio del cultivo para el desarrollo de los explantes de caoba <i>in vitro</i>	23
5.7.1.	Multiplicación de brotes	23
5.7.1.1.	Variables en la multiplicación <i>in vitro</i> de caoba.....	24
5.7.1.1.1.	Número promedio de brotes	24
5.7.1.1.2.	Longitud de brotes (cm)	24
5.7.1.1.3.	Diámetro de tallo (cm).....	25
5.8.	Enraizamiento <i>in vitro</i> de caoba establecido en condiciones de laboratorio	25
5.8.1.	Variables en enraizamiento <i>in vitro</i> de caoba.....	25
5.8.1.1.	Altura de planta (cm).....	25
5.8.1.2.	Número de raíces.....	25
5.8.1.3.	Longitud de raíces (cm).....	25
5.9.	Diseño experimental	26

7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1.	Fase de establecimiento e introducción	27
6.2.	Fase de multiplicación de brotes	28
6.3.	Fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de caoba establecida en condiciones de laboratorio	32
8.	CONCLUSIONES	34
9.	RECOMENDACIONES	35
10.	BIBLIOGRAFÍA	36
11.	ANEXOS	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores en estudio para la micropropagación de <i>S. macrophylla</i> King.	22
Cuadro 2. Tratamientos para la micropropagación de <i>S. macrophylla</i>	23
Cuadro 3. Tratamientos para la fase de enraizamiento	25
Cuadro 4. Porcentaje de germinación días a la germinación, contaminación y supervivencia de las semillas de caoba (<i>S. macrophylla</i>).....	28
Cuadro 5. Promedio (ANOVA) de diámetro de tallo, longitud y número de brotes de caoba (<i>S. macrophylla</i>).	30
Cuadro 6. Promedio de altura de planta, número de raíces y longitud de raíces de caoba (<i>Swietenia macrophylla</i> King) en respuesta a tres medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio.....	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pasos para el establecimiento de semillas de caoba en medio básico.....	21
Figura 2: Multiplicación de ápices de caoba en diferentes medios de cultivo.	24
Figura 3: Plántulas en medio de enraizamiento.	26
Figura 4. Longitud de brotes de caoba (<i>S. macrophylla</i>) en condiciones <i>in vitro</i> a la octava, décima y undécima semana después de la siembra.....	29
Figura 5. Número de brotes de caoba (<i>S. macrophylla</i>) en condiciones <i>in vitro</i>	30

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Metodología usada por Carranza <i>et al.</i> , (2013). En la propagación clonal <i>in vitro</i> de <i>S. macrophylla</i>	45
Anexo 2. Análisis de varianza diámetro de tallo.....	46
Anexo 3. Análisis de varianza longitud de brotes	46
Anexo 4. Análisis de varianza número de brotes	46
Anexo 5. Análisis de varianza altura de planta	47
Anexo 6. Análisis de varianza números de raíces en la fase de enraizamiento	47
Anexo 7. Análisis de varianza longitud de raíces en la fase de enraizamiento.....	47

INDICE DE ABREVIATURAS

AIA: Ácido indolacético.

AIB: Ácido indolbutírico.

BAP: 6- Bencilamino purina.

BA: Benzil adenina

B5: Medio de cultivo (Gambor).

Ca (ClO)₂: Hipoclorito de calcio.

CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional en Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.

ITTO: Organización internacional de las maderas tropicales.

IUCN: Unión internacional para la conservación de la naturaleza.

MS: Murashig y Skoog.

OGM: Organismo genéticamente modificado.

WPM: Woody Plant Medium.

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP: N-6 (2- isopentenil) adenina.

QL: Medio de cultivo.

µm: Unidad milimicras

1. INTRODUCCIÓN

Swietenia macrophylla King (caoba de hoja grande, o caoba) es reconocida como una de las auténticas caobas junto con *Swietenia humilis* Zuccarini y *Swietenia caoba* (L.). Se distribuye desde la parte tropical de los bosques de América del Norte y del Sur que comienzan en México y finalizan en Bolivia y el sur de la Amazonia brasileña (Pastore *et al.*, 2011; Bergo *et al.*, 2016). En América Latina y el Caribe, los bosques en especial los húmedos tropicales, cuya mayor extensión se halla en la cuenca amazónica, comprende la más grande riqueza de especies, diversidad de hábitats y ecosistemas terrestres y son el hábitat de una gran cantidad de personas, especialmente pueblos indígenas que dependen de ellos para subsistir. Brasil, Colombia, Ecuador, México, Perú y Venezuela están dentro de los 17 países megadiversos del planeta (FAO, 2016).

De la misma manera, en Europa las especies forestales son de mucha importancia económica y ecológica, y juegan un papel fundamental en la conservación de la biodiversidad dentro de un ecosistema (Pijut *et al.*, 2011). Existen más de 600 especies de maderas tropicales en el mundo (Chudnoff, 1984), muchas de las cuales son comercialmente valiosas por la calidad y uso de su madera (USDA FAS, 2011). Sin embargo, algunas de estas especies, entre ellas *S. macrophylla* se encuentran en estado de vulnerabilidad (VU) según el libro Rojo de la IUCN (2018) debido a la intensa explotación, lo que ha reducido drásticamente sus poblaciones naturales.

S. macrophylla, es una de las especies madereras más valiosas en el mercado internacional, por los atributos que presenta, entre ellos, belleza, durabilidad, resistencia y versatilidad de su madera, la misma que es utilizada en distintos tipos de trabajos, como construcción de botes, puertas, pisos, muebles, construcciones de edificios pesados y livianos, muelles marinos, carpintería, instrumentos musicales, torneado y varios productos especiales de alta calidad (Falah *et al.*, 2012).

En Ecuador, esta especie fue objeto de una intensa explotación entre los años 1980 y 1990, y en la actualidad, las poblaciones de caoba silvestre solo son posibles de encontrar en ciertas comunidades de las provincias de Pastaza y Morona Santiago en la región Amazónica. Es por ello, que el Ministerio del ambiente (2017), mediante Acuerdo Ministerial N° 90, acordó establecer en todo el territorio continental del Ecuador, la veda de la especie *S. macrophylla*, entendiéndose como tal, la prohibición de la corta de árboles

y aprovechamiento de la referida especie, sus partes o derivados fácilmente identificables, por el plazo de 10 años. Así como también, brindar apoyo a las poblaciones que aún la conservan en proyectos de ecoturismo, planes productivos, inclusión en socio bosque, así como la opción de manejo de otras especies forestales que sustituyan la posible explotación de caoba.

Todo esto, debido a que su alto valor comercial, ha provocado la disminución acelerada de un gran número de sus ejemplares en los países tropicales. Mientras que la alta variabilidad generada por la reproducción sexual en caoba, ha ocasionado la pérdida de características importantes tales como: velocidad de crecimiento, rectitud del fuste y resistencia a plagas y enfermedades (Jiménez *et al.*, 2012).

S. macrophylla, ha sido explotada en bosque húmedo tropical, debido a la importancia económica de mercados nacionales e internacionales, lo que conlleva a una disminución de poblaciones naturales ocasionada por la tala ilegal que repercute negativamente en los ecosistemas (Cerdán, 2007, Acosta *et al.*, 2012).

S. macrophylla, está considerada como la especie arbórea más comercial del Neotrópico, la creciente demanda de madera de caoba sobrepasa la oferta disponible y aumenta la presión sobre esta especie, ocasionando una disminución de las poblaciones naturales y provocando su extinción comercial a lo largo de su área de distribución (Reynel *et al.*, 2003).

En este orden de ideas, plantaciones de madera dura como la caoba, serían un complemento valioso para la regeneración natural de los bosques tropicales, a fin de asegurar un suministro futuro de estas maderas de valor comercial (FAO, 2001).

Es por ello que, debido al alto valor de las especies de árboles tropicales, las tecnologías de propagación *in vitro* son un componente integral en un programa de conservación o mejora de árboles, para complementar el banco de semillas y las medidas *ex situ* para la conservación a largo plazo y la propagación clonal de germoplasma de especies de interés o de difícil propagación como es el caso de la caoba.

2. ANTECEDENTES

La intensa explotación de especies nativas de alto valor económico ha causado fuerte presión sobre los bosques, reduciendo la variabilidad genética de las poblaciones remanentes de la Amazonia (Lovera, 2008). Este hecho ha estimulado estudios e investigaciones sobre formas de propagación para el aumento de las áreas de plantaciones con fines comerciales, recuperación de áreas degradadas y programas de conservación y mejoramiento genético.

La mayor parte de la propagación de especies forestales se da por la vía sexual, debido a que la propagación vía semilla de especies como *S. macrophylla*, que, a pesar de poseer producción anual de semillas, capacidad de almacenamiento y conservación con elevado poder germinativo, tiene su uso limitado por la dificultad de recolección, por tratarse de semillas aladas (Loureiro *et al.*, 1979, Ferreira *et al.*, 2004).

En la literatura científica se encuentran diversos estudios referentes a la propagación *in vitro* de esta especie, entre ellos cabe resaltar los trabajos realizados por Collado *et al.*, (2006) quienes establecieron un protocolo para la obtención de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos en caoba, estudiando tres concentraciones de 2,4-D, lograron la formación de embriones somáticos, obteniendo mayores porcentajes de embriogénesis somática en un medio de cultivo compuesto por sales MS con 4.0 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de kinetina. Mientras que con dosis de 0.4 mg/L de 6-BAP se obtuvo el mayor porcentaje de embriones somáticos en etapa cotiledonal (91.70 %).

En trabajos realizados por Mona (2012), se estableció un protocolo para la micropropagación de *S. macrophylla* King, usando diferentes tipos de medio de cultivo (MS, QL, B5 y WPM), obteniendo mejores resultados con el medio de MS donde los explantes cultivados, indujeron el mayor número de brotes, en la etapa de multiplicación, de la misma manera el número de brotes, longitud, número de hojas y peso fresco y seco se obtuvieron debido a la aplicación de 4.0 mg / L de BAP + 0.4 mg / L de 2ip.

En Ecuador existe escasa información referente a propagación *in vitro* en caoba, siendo el trabajo realizado por Carranza *et al.*, (2013) uno de los pocos que estableció un método para facilitar la propagación *in vitro* de caoba a partir de segmentos nodales, empleando en la fase de establecimiento diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio (Ca

(CLO)₂) y tiempos de exposición y en la fase de multiplicación se utilizó el medio MS suplementado con 2mg/L de BAP y 1 mg/L de AIB, el mismo que permitió generar el 70% de brotes sanos, concluyendo que el establecimiento de segmentos nodales de caoba tiene una gran importancia ya que por vez primera se ha logrado obtener una metodología reproducible para la propagación *in vitro* de esta especie.

En trabajos realizados por Castro y Sánchez (2010), lograron propagar árboles plus de *Eucalyptus pellita*, mediante cultivo de tejidos, para la fase de establecimiento emplearon como fuente de explantes segmentos nodales obtenidos a partir de brotes epicórmicos de árboles plus. Para la proliferación evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de BAP, donde las dosis de 0,25 y 0,5 mg/L les permitieron obtener 8,83 y 7,88 brotes por explante en 30 días. El enraizamiento se logró cuando se adicionó al medio de cultivo 1 mg L⁻¹ de AIB con un 80% de brotes que formaron raíces.

En estudios realizados por Lee y Rao (1998), obtuvieron vástagos adventicios a partir de callos de caoba friables originados de segmentos nodales de plantas de diferentes edades, cultivados en un medio modificado de Murashige y Skoog complementado con benciladenina (BA) a concentraciones de 0,002 g/L y 0,005 g/L. Por otro lado, Albarrán (1990), encontró que los explantes de mayor potencial para lograr vástagos eran también los segmentos nodales de 0,5 cm, obtenidos de plantas germinadas *in vitro* y cultivados en un medio MS modificado con diferentes relaciones de auxina (ácido indol acético - AIA) y citoquinina (benciladenina BA).

3. JUSTIFICACIÓN

S. macrophylla comúnmente conocida como caoba, pertenece a la familia Meliaceae y se distribuye de forma natural desde el sur de México hasta la región amazónica de América del Sur, que incluyen los países de Ecuador, Colombia, Venezuela, Bolivia, Brasil y Perú (Lamb, 1966, Navarro, 1999, Brown *et al.*, 2003, García, 2006, Lemes *et al.*, 2007).

El progresivo aumento en la obtención de productos forestales maderables y el alto valor en los mercados, ha ocasionado la disminución de las poblaciones naturales de muchas especies en los bosques tropicales, tal es el caso de la caoba (*S. macrophylla*), árbol maderable de gran interés económico en el país y en muchos países del mundo (Carranza *et al.*, 2013). Actualmente, la caoba es una especie protegida por el Estado ecuatoriano (Acuerdo Ministerial N.º 90) debido a la fuerte explotación que ha sufrido, y al número reducido de individuos en bosques (Acosta, 2012). Además, la caoba fue incluida en la enmienda de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES, 2011) apéndice II, dada la actual explotación en Sudamérica. Los impactos ocasionados a su hábitat han conducido a que esta especie se encuentre amenazada (Patiño, 1997; Grogan *et al.*, 2002). Por esta razón, su conservación, estudio de la variabilidad genética, propagación y uso sostenible cobran gran importancia.

La propagación de la caoba no siempre suele ser exitosa debido a la baja eficiencia de los métodos de propagación convencionales. Es por ello que Marquetti (1992), planteó que la propagación asexual con el empleo de técnicas convencionales (injertos, estacas y margullos) es posible; pero las plantas resultantes pierden rápidamente su valor comercial debido a múltiples ramificaciones causadas por efectos topofíticos, convirtiéndose la micropropagación en la vía más apropiada para la reproducción artificial de esta especie en cantidades comerciales (Patiño, 1997).

Por otra parte, su establecimiento en plantaciones se ha visto interferido por el ataque del barrenador de las Meliaceae, la larva de la mariposa *Hypsipyla grandella* Zeller, que se alimenta de la yema apical y la destruye causando deformación y bifurcación del fuste lo cual disminuye la calidad y rentabilidad de la madera. Urge, por lo tanto, plantear estrategias para conservar la especie. Una posibilidad es la propagación *in vitro* y la selección de somaclones con características superiores (Tacoronte, 2004).

La FAO (2004), tiene una red que coordina todos los estudios que se realizan en el área de distribución natural de la caoba, y por ello la considera una de la especie prioritaria

para establecimiento de plantaciones comerciales de madera, Sin embargo, mientras no se garanticen individuos con características superiores (por ejemplo: resistencia a plagas y enfermedades) y se recurra a un método de propagación clonal masivo, será imposible lograr plantaciones verdaderamente rentables.

El uso de la biotecnología es un apoyo a los programas de reforestación, es una posibilidad actual que aliviaría la presión de deforestación que tienen las poblaciones naturales y de esta manera evitaría su extinción (Verdeil *et al.*, 1999).

El desarrollo de tecnologías de gran eficacia desde el punto de vista biológico, cuantitativo y económico, que faciliten un mayor grado de automatización en los procesos de almacenamiento y multiplicación de germoplasma valioso, permitirán a su vez disminuir los costos en la producción de plantas *in vitro*, lo que resulta altamente beneficioso para especies de interés agroforestal como la caoba (Medina y Sotolongo, 2004). Por ello, el empleo de métodos biotecnológicos como el cultivo de tejidos, para lograr volúmenes considerables de plantas seleccionadas y establecer plantaciones a corto plazo, es una alternativa que debe ser más explotada en estas especies (Rodríguez, 1999).

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar la respuesta de caoba (*Swietenia macrophylla* King) en tres medios de cultivo mediante el cultivo de ápices.

4.2. Específicos

1. Analizar el comportamiento de los explantes de caoba a diferentes medios de cultivo.
2. Identificar el mejor medio de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* para cultivar los explantes en la fase de enraizamiento.
3. Evaluar la respuesta de los brotes de caoba al enraizamiento *in vitro* en los diferentes niveles de auxinas.

5. MARCO TEÓRICO

4.1. Reseña histórica del cultivo de tejido

Del latín totuspotens: totus (todo) y potens (poder o habilidad), el término célula totipotencial, es utilizado en biología para referirse a células que poseen la capacidad de dar origen a diferentes tipos celulares, incluso pudiendo una sola de estas células dar origen a millones de células, tejidos, órganos e incluso embriones (Tobar, 2011).

Una planta al crecer va aumentando su población de células las cuales se especializan en sus funciones. El aumento de la población de células se realiza por medio de la división celular. Antes que una célula madre se divida en dos células hijas, hace una copia exacta de su primer genoma. Como resultado, las dos células hijas generalmente tienen exactamente la misma composición genética como la de su célula madre. Cada célula viva de la planta debe contener todos los genes y por lo tanto tiene la capacidad de generar una planta completa. Esto se llama: célula totipotencial (Tobar, 2011).

En 1838, Matthias Schleiden (1804-1881), un botánico alemán, afirmó que los vegetales son agregados de seres completamente individualizados, independientes y distintos, que son las células mismas. La palabra "célula" había sido usada por primera vez con un sentido biológico en 1665 por Robert Hooke (1635-1701) quien había notado que el corcho y otros tejidos vegetales están constituidos por pequeñas cavidades separadas por paredes.

Gottlieb Haberlandt (1854-1945), botánico austríaco, fue el primero en señalar la posibilidad del cultivo de tejidos aislados. Desde las primeras afirmaciones de Haberlandt, los métodos de cultivo de células y tejidos se han desarrollado, dando lugar a importantes descubrimientos en Biología y Medicina (Despommier, 2009).

La teoría propuesta por Schleiden y Schwann (1838), establece que las células son autosuficientes y que, en principio son capaces de regenerar una planta completa, lo anterior constituye el núcleo central del cual nace el cultivo de tejidos.

Haberlandt (1902) realizó los primeros intentos del cultivo de células vegetales aisladas utilizando un medio artificial; más tarde otros ensayos fueron realizados por Harrison, Burrows y Carrel entre 1907 y 1909. Nobécourt, Gautheret y White, consiguieron el primer cultivo de tejido auténtico en el año de 1939 (Pierik, 1990). Es decir, tuvieron que pasar 100 años para que la teoría de la totipotencia fuera comprobada.

Desde el año de 1939 este tema ha venido en progreso, pero ha tenido un desarrollo extraordinario en los últimos 30 años. La ciencia del cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales los microorganismos se hacen crecer en medios estériles para su producción e identificación (Salazar, 2010).

Para obtener buenos cultivos de células vegetales se debe partir de un explante rico en células capaces de una rápida proliferación, como las células apicales de la raíz, las yemas o semillas en germinación. A partir de ellas se puede obtener una masa indiferenciada denominada “callo”. El callo tisular puede propagarse indefinidamente por subdivisiones en un medio nutricional básico con fitohormonas (una auxina, una citoquinina y una giberelina, por ejemplo). El estado de diferenciación puede ser mantenido o alterado variando el tipo y concentración de fitohormonas en el medio, una concentración alta de auxinas frente a citoquininas inducirá la formación de raíces, mientras que concentraciones altas de citoquininas frente a auxinas induce la formación de tallos. Las concentraciones de hormonas adecuadas varían de una planta a otra, por lo que hay que determinarlas en cada caso experimentalmente (Izquierdo, 1999).

La investigación y las aplicaciones de la biotecnología en el sector forestal avanzan rápidamente, pudiéndose identificar cuatro biotécnicas que se utilizan principalmente: La micropropagación y el cultivo de tejidos, la biología molecular y los marcadores, la modificación genética, la genómica y la crioconservación. Entre las 2700 actividades de biotecnología que se realizaron en el mundo en los últimos 10 años, la modificación genética representa alrededor del 19% solamente. El potencial de los rasgos de interés para los árboles genéticamente modificados (OGM) son el aumento de la producción y calidad de madera, resistencia a insectos, enfermedades y herbicidas (FAO, 2004).

4.2. Clasificación taxonómica de la caoba

La clasificación taxonómica de la caoba según Roskov *et al.*, (2018) es la siguiente:

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Meliaceae

Género: *Swietenia*

4.3. Generalidades de la especie de *S. macrophylla*.

Es un árbol monoico perteneciente a la familia Meliaceae, mide entre 40 a 60 metros y tiene una corteza fisurada (Pennington, 2002; Ochoa, *et al.*, 2008). Las hojas son grandes con 6 a 12 hojuelas glabras, paripinnadas, alternas, sin glándulas y con raquis sin crecimiento terminal, con tres o más pares de hojuelas, Las flores son pequeñas y de colores pardos amarillentos, en panículas y unisexuales, pero con vestigios bien desarrollados del sexo opuesto (Pennington, 2002; Ochoa *et al.*, 2008).

Los frutos son cápsulas leñosas erectas, alargadas ancho, café grisáceas, lisas o finalmente verrugosas, la parte interna de las valvas más delgada, ápice agudo, semillas numerosas, con alas esponjosas y frágiles, de color castaño a pardo rojizo (Ochoa *et al.*, 2008).

Según Gómez y Jasso, (1995) y Navarro, (1999), el fruto tiene un peso de 300gr y origina entre 40 y 60 semillas viables. En el año 2000, el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), indicó que la semilla *S. macrophylla*, son de tipo ortodoxas.

4.4. Distribución de *S. macrophylla*.

Es una especie originaria de América. Se distribuye desde el sur de México y la vertiente del Atlántico en América Central, desde Belice, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. En América del Sur, es nativa de Venezuela, Colombia, Ecuador y hasta el Valle del Amazonas de Brasil, Perú y Bolivia (Pennington y Sarukhán, 2005, Aguilar *et al.*, 1992).

Forma parte del bosque tropical y subtropical y se desarrolla en altitudes de 50-500 msnm, hasta los 1,400 msnm; las temperaturas varían de 22-28°C, en climas secos, húmedos o muy húmedos; precipitaciones entre 1,000 y 2,500 mm. Pero prefiere suelos aluviales profundos, bien drenados y fértiles, de alcalinos a neutros, aunque también puede crecer en suelos ácidos con un pH hasta 4.5 (Barrance *et al.*, 2003, Conabio, 2012).

4.5. Cultivos de tejidos vegetales

En su acepción amplia, el cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante, o sea, unas

partes separadas del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos; se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas. Cada fragmento origina una planta idéntica a aquella de donde se tomó el fragmento, aunque, también puede ser modificada genéticamente para tener variedades artificiales (Mroginski *et al.*, 2010).

Estas técnicas pueden ser utilizadas en vegetales como herramientas para la micropropagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal (Mroginski *et al.*, 2010).

El cultivo *in vitro* de plantas consiste en reproducir numerosos ejemplares a partir de pequeñas partes de tejido de una planta madre, obteniendo plantas homogéneas, en grandes cantidades, libres de patógenos y en cualquier época del año. Esta técnica permite tener una mayor tasa de reproducción que en los cultivos tradicionales y es de gran ayuda para la conservación de especies que estén en peligro de extinción o en estado de vulnerabilidad. Existe una gran diferencia entre las plantas herbáceas y las plantas leñosas, debido a que estas últimas son difíciles de clonar porque tienen una capacidad regenerativa relativamente lenta (Pierik, 1990).

Las arbóreas (recalcitrantes) han presentado mayores dificultades por su condición estructural y porque los procesos morfológicos fisiológicos y biológicos han sido menos estudiados (Perea, 1990). Los avances actuales en biotecnología-genómica están teniendo un gran impacto en el uso de material selecto en muchos programas de mejora. La embriogénesis somática está contribuyendo a la producción de plantas transgénicas y a la consecución de la silvicultura clonal de alta productividad, con calidad de madera mejorada y menor impacto de enfermedades, en plantaciones forestales (Celestino, 2005).

En la embriogénesis somática el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinares y radicales. Las plantas producidas asexualmente a través de organogénesis *in vitro*, son de calidad uniforme, y pueden ser reproducidas más rápidamente que a través de la sexual o por técnicas convencionales de propagación. Tales plantas crecen y maduran más rápido que las plantas propagadas por semillas (Vasil y Vasil, 1980).

La multiplicación *in vitro* de especies agroforestales puede lograrse por tres rutas diferentes: 1) por desarrollo de brotes preexistentes, 2) por formación de meristemas adventicios, y, 3) por diferenciación de embriones somáticos (Aguilar *et al.*, 2010). Hasta la fecha, la multiplicación de plantas por medio de ápices preexistentes es el método más común para la propagación clonal de maderas duras, siendo el más utilizado en coníferas.

En esta técnica se utilizan ápices de yemas terminales, axilares y nudos. Este sistema de propagación tiene la ventaja de que los brotes se multiplican directamente, sin una fase intermedia de callo (masa de células no diferenciadas) siendo en general, las plantas regeneradas, genéticamente estables; sin embargo, el número de plantas que se produce es limitado debido a que depende del número de brotes preexistentes en el explante. Si bien la tasa de multiplicación inicial es baja, ésta se incrementa durante los primeros subcultivos y eventualmente se puede alcanzar una tasa considerable de multiplicación (Thorpe *et al.*, 1991).

No es frecuente encontrar en la naturaleza estados juveniles en árboles adultos como fuente de material para propagación, aunque para algunas especies puede ser resuelto a través de la obtención de rebrotes de tocón, brotes epicórmicos, podas a ras de suelo, enraizamiento seriado de estacas, injertos y etiolación (Carrizosa y Serrano, 1996).

Ante este panorama, la biotecnología se presenta como una alternativa para la producción y mejoramiento de especies forestales. En la silvicultura mundial, la aplicación de técnicas de micropropagación en especies forestales de uso maderable ha constituido una alternativa muy útil para aumentar el número de plantas requeridas para el establecimiento de plantaciones en los programas de propagación masiva (ITTO, 2001), protección y aprovechamiento (Adams, 2002). Así mismo, para aquellas en que sus comportamientos son más recalcitrantes, el desarrollo de sistemas de propagación vegetativa mediante micropropagación y embriogénesis somática *in vitro* permite la obtención masiva de clones de genotipos seleccionados (Hartmann *et al.*, 1997).

Bajo estas condiciones es posible producir material vegetal en cualquier época del año y entregarlo de acuerdo con el programa de siembra establecido por el reforestador. Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en la agricultura (Saucedo *et al.*, 2007), sin embargo, su utilización en especies leñosas se ha visto limitada por problemas en el establecimiento (por fenolización), falta de respuesta a la inducción, hiperhidricidad y los relativos a la aclimatación del material propagado (Lynch, 1999).

En la mayoría de los casos, la micropropagación en especies leñosas se ha llevado a cabo utilizando semillas como fuente de explantes, formación vía callos (Clemente, 1999) y un reducido número de especies en las que ha sido exitosa la embriogénesis somática y las yemas axilares (Fay *et al.*, 1999).

A pesar de estas dificultades para muchas especies forestales de gran valor económico y sujeto a una gran sobreexplotación esta constituye una opción para su recuperación y ensayos preliminares de mejoramiento genético. Actualmente el cultivo de tejidos de especies forestales es un alternativa cuyas ventajas más sobresalientes sobre los sistemas tradicionales de propagación es utilizar poco material como fuente de inicio para establecer el cultivo, elimina el efecto de las estaciones del año, es factible obtener plantas libres de enfermedades y en algunas ocasiones los tiempos de propagación son más cortos; además ha tenido un papel muy importante como herramienta para varios estudios fisiológicos, bioquímicos, anatómicos y morfológicos (Luna, 2002, Sánchez, 2002).

Dentro de esta técnica de propagación el cultivo de meristemas, yemas y ápices es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizarse y producir así nuevas plantas. Este sistema se basa en la formación de nuevos brotes a partir de meristemas preexistentes, por lo que no implica fenómenos de dediferenciación y rediferenciación celular como ocurre en organogénesis y embriogénesis somática. Con estos planteamientos coinciden (Toribio y Celestino, 2000), quienes enfatizan en que la inducción del desarrollo de brotes axilares, seguido del enraizamiento de los mismos, además de ser la forma más común de regeneración, es la que presenta mayores garantías de estabilidad genética.

La propagación clonal de plantas a partir de yemas apicales, meristemas apicales o explantes nodales, generalmente ha acelerado la proliferación de brotes axilares durante los subcultivos. Existen cuatro pasos para este tipo de micropropagación: el establecimiento, la multiplicación, el enraizamiento y la aclimatación. El desarrollo de este tipo de protocolos para especies de árboles tropicales es importante para la producción masiva de germoplasma, que de otra manera se pudiera perder por la imposibilidad de propagar este material o la incompatibilidad del material vegetal usado en los métodos de propagación convencional (por ejemplo: enraizamiento de estacas o injertos) (Pijut *et al.*, 2012) Por otra parte en estudios realizados por (Arora *et al.*, 2010) lograron la propagación clonal de un árbol de 40 años de edad de *Azadirachta indica* en (Murashige y Skoog) que contenía 1.11 μm de BA (benzadenina), 1.43 μm de AIA (ácido indolacético), y 81.43 μm de hemisulfato de adenina.

En general, las ventajas de estos métodos son constituir un sistema ideal para la propagación clonal, ofrecen la máxima estabilidad genética; son relativamente sencillos, fácilmente se encuentran las condiciones adecuadas; son ideales para la conservación *in vitro* de germoplasma, ya sea por crecimiento retardado o por criopreservación. Particularmente en el cultivo de ápices se requieren explantes de mayor tamaño que los utilizados en el cultivo de yemas axilares, lo que facilita la manipulación y tienen una mayor probabilidad de supervivencia, sin embargo, este método no es aplicable cuando se requieren plantas libres de patógenos (Pérez *et al.*, 1999).

Todos estos métodos de cultivo de tejidos parten de contar con el material vegetal o explantes bajo condiciones asépticas para garantizar su óptimo desarrollo, por lo que debe eliminarse todo tipo de organismos ajenos; el material y medio deben ser esterilizados, a fin de evitar al máximo cualquier contaminación. Este es uno de los puntos críticos al requerirse la experimentación de diversos métodos de desinfección adecuados al tipo de explantes, que permitan la eliminación de contaminantes sin dañar el tejido vegetal (Rebolledo y Camacho *et al.*, 2006).

Sin embargo, en los procesos de micropropagación vegetal, la presencia de microorganismos contaminantes tanto externos como endógenos, afectan el desempeño de los explantes una vez inoculados en condiciones *in vitro*, haciendo indispensable el uso de técnicas que permitan la eliminación de dichos contaminantes (Pérez y Jiménez, 1995; Leifert y Cassells, 2001, Suárez, 2003, Jiménez *et al.*, 2006, López, 2007).

La desinfección de explantes aislados de plantas leñosas perennes, ha sido siempre una de las limitantes más severas para el establecimiento *in vitro* de este tipo de especies, reportándose contaminaciones superiores a 90%, como en explantes de guayaba dulce (*Psidium guajava* Myrtaceae) (Viloria, 1993); caoba (*Swietenia macrophylla* King), cedro (*Cedrela odorata*) (Abdelnour y Muñoz, 1997); Quillay (Quillaja saponaria Mol) (Prehn *et al.*, 2003); y roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC) (Suárez *et al.*, 2006). López-Franco *et al.*, (2010) evaluaron diferentes protocolos de desinfección de explantes (disco de hoja) de *Cordia alliodora*, para determinar la eficiencia en el menor grado de contaminación sin comprometer su viabilidad Collado *et al.*, (2004) con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King), emplearon brotes jóvenes tomados de plantas sembradas en condiciones de campo.

De acuerdo con un estudio previo desarrollado para la propagación *in vitro* de material vegetal seleccionado de *Tabebuia rosea* y *Cordia alliodora* (Ramírez *et al.*, 2004)

permitió ajustar protocolos de este material en cultivo *in vitro*. Schuler *et al.*, (2005) Sobre la base de estos resultados produjeron plantas de *Tabebuia rosea* y *Cordia alliodora* a partir de semillas de árboles plus y llegan a la conclusión de que esta última especie mostró ser recalcitrante para el cultivo *in vitro*, dada su baja tasa de velocidad de multiplicación y alta tasa de pérdida.

Las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes. El incremento de conocimientos acerca del control ambiental del cultivo de tejidos en condiciones estériles, está provocando una evolución de las distintas técnicas empleadas en la micropropagación de plantas. El ambiente *in vitro* en recipientes con baja tasa de ventilación presenta unas tasas bajas de flujo de materia y energía, con mínimas variaciones de temperatura, elevada humedad relativa y grandes cambios diarios de la concentración de CO₂ en el interior de los recipientes (Cañal *et al.*, 2001).

El tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre) puede condicionar la evolución de la composición gaseosa en su interior durante el período de cultivo. Ante los distintos factores de estrés que tienen que soportar durante las fases, la micropropagación las plantas producidas en recipientes con nulo o escaso intercambio gaseoso, pueden manifestar alteraciones o déficit en cuanto a su estructura anatómica, morfológica y fisiológica. Como consecuencia, estas plantas presentan un fenotipo incapaz de sobrevivir al trasplante directo al invernadero o campo (Cañal *et al.*, 2001).

La caoba 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).

Las poblaciones de caoba 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 meristemas 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.

4.6. Organogénesis

Esta vía puede ser directa o indirecta. En la primera forma, a partir del explantes se forman directamente de brotes o yemas adventicias que pueden ser enraizadas. En la ruta de la organogénesis directa a partir del explantes se forman primero un callo y luego a partir de este, se induce un brote o una yema (Ramírez *et al.*, 2012).

4.7. Embriogénesis

Esta vía puede ser directa o indirecta. En la indirecta, a partir del explantes se consigue diferenciar estructuras parecidas a embriones, y la indirecta previamente se debe inducir un callo, antes de los embriones. Sin embargo, las estructuras obtenidas son parecidas a embriones cigóticos, no son productos de la unión de dos gametos y por tanto deben considerarse embriones somáticos (Ramírez *et al.*, 2012).

4.8. Factores que afectan el cultivo *in vitro* de plantas

El cultivo *in vitro* de tejidos, células u órganos vegetales depende de unas series de factores que se deben considerar en forma adecuada para lograr alcanzar el éxito en la regeneración de plantas.

Asepsia: Se refiere a la condición de todo material, tejido o explantes el sitio de trabajo que se encuentran libre de contaminantes ya sean microorganismos o esporas. Entre las posibles fuentes de contaminación se incluyen los explantes, el medio de cultivo, el área o sitio de transferencia, las herramientas de trabajo, la cristalería donde se mantiene el medio de cultivo, el operario. Para minimizar los riesgos iniciales y futuros de pérdidas de medio y explantes, durante el proceso de cultivo es necesario mantener un estricto control continuo en cada una de las fases (Ramírez *et al.*, 2012).

Estado fisiológico de la planta del donante: En el cultivo de tejidos se observa que los explantes provenientes de plantas jóvenes tiene mayor capacidad de regeneración que aquellas provenientes de plantas adultas. Esta condición es más evidente en el cultivo *in vitro* de especies forestales (Ramírez *et al.*, 2012).

El tipo de explantes: La elección de los explantes depende del objetivo que se persiga al implementar la técnica de cultivo *in vitro* sobre la especie vegetal específica. En la producción de callos, cual tipo de explantes podría posible; por lo tanto, en la propagación clonal, los explantes apropiados son los meristemos apicales y los brotes axilares. Y para obtención de individuos haploides, se puede recurrir al cultivo de óvulos (células femeninas), micrósporas o anteras (células masculinas) (Ramírez *et al.*, 2012).

La composición del medio de cultivo: Es unos de los factores que determinan el éxito en el cultivo de tejidos vegetales, ya que cada especie tiene requisitos particulares de nutrición y condiciones ambientales específicas para su desarrollo (Ramírez *et al.*, 2012).

Por otra parte, podemos mencionar que las condiciones ambientales que afectan el cultivo *in vitro* son:

El fotoperiodo: Es la relación alterna de horas luz y oscuridad (16hrs luz y 8hrs oscuridad). Se ha demostrado que para ciertas especies la longitud del día afecta los niveles endógenos de las auxinas y las citoquininas (Ramírez *et al.*, 2012).

La temperatura: La respuesta de tejidos vegetales al cultivo *in vitro* puede variar de acuerdo con la temperatura de incubación; por ejemplo, en algunas especies de *Brassica*

la embriogénesis somática aumenta en la medida que se eleva la temperatura. En forma general, las especies tropicales crecen bien en temperaturas variables entre 25°C y 28° C (Ramírez *et al.*, 2012).

La humedad relativa: La interacción entre la temperatura y la humedad es un factor importante en condiciones *in vitro*, por su efecto sobre la tasa de crecimiento y por su asociación con aspectos fitosanitarios. Una alta temperatura y una humedad relativa baja producen pérdida de agua en los medios, aún en los líquidos. Por lo general, una alta temperatura y una alta humedad relativa aumenta la probabilidad de aparición de problemas asociados con hongos. En los cuartos incubación debe de ser, aproximadamente, de 70% (Ramírez *et al.*, 2012).

4.9. Importancia de la propagación *in vitro* en caoba

Las técnicas de cultivo *in vitro* son significativas, por la serie de ventajas que proporcionan, entre las cuales se destaca la reproducción de un gran número de plantas en tiempos muy reducidos, a partir de un fragmento pequeño de tejido cultivado en condiciones estériles, y la conservación de un banco de germoplasma con fines de rescate de especies (Uribe *et al.*, 2008).

Esta técnica ayuda obtener plantas libres de enfermedades, y en algunas ocasiones reduce el tiempo de propagación, en especies de propagación sexual como es el caso de la caoba (Rebolledo *et al.*, 2006).

6. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Ubicación del ensayo

La presente investigación se realizó durante los meses de septiembre del 2018 a febrero del 2019, en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí (UTM). El material genético vegetal de caoba nativa (*Swietenia macrophylla* King), fue colectado en el Jardín Universitario de la UTM.

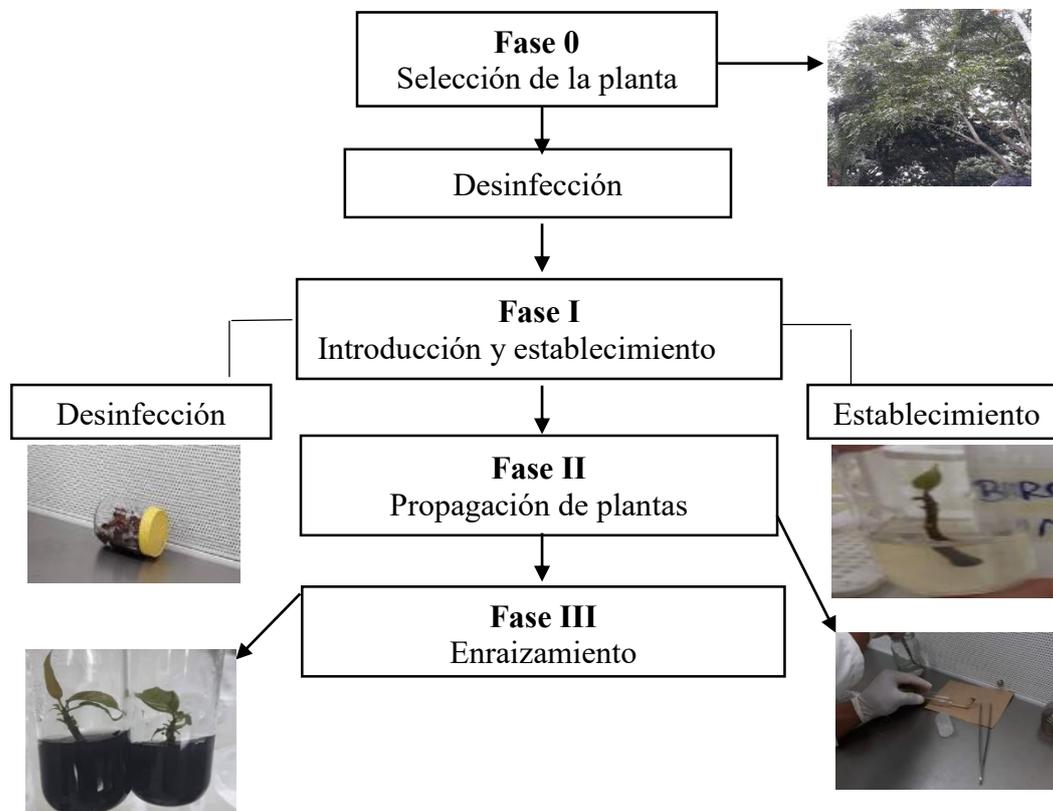
5.2. Metodología

Para el establecimiento del material de caoba *in vitro*, se utilizó la metodología descrita por Carranza *et al.*, (2013), con ciertas modificaciones (**Anexo 1**).

5.3. Material vegetal

Se utilizaron 140 semillas de *S. macrophylla*, de un árbol establecido en el Jardín Universitario (**Figura 1 A y B**), considerando el periodo de fructificación para realizar las colectas de los frutos en estado de madurez fisiológica (**Figura 1 C**).

5.4. Fases de cultivo *in vitro*



5.5. Establecimiento de semillas de caoba *in vitro*

Se lavaron los frutos con jabón líquido durante 4 minutos y se procedió a enjuagar con abundante agua corriente, posteriormente el fruto fue llevado a condiciones de asepsia, (cámara de flujo laminar), para extraer las semillas (**Figura 1 D y E**), las mismas que fueron colocadas en un vaso de precipitación para su respectiva desinfección, con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), cloro comercial diluido al 5% y gotas de Tween-20 durante 10 minutos en agitación constante (**Figura 1 F**), luego de este lapso se enjuagaron por tres ocasiones con agua esterilizada y se procedió a separar la testa de la semilla (**Figura 1 G**).

Previo a la siembra, el medio de cultivo (M/S) fue justado a un pH de 5,7 y esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos, y se colocó las semillas para su germinación en tubos de ensayos la mitad de estas (70) con testa y la otra mitad sin testa, conteniendo medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) (**Figura 1 H y I**).

5.5.1. Germinación de semillas

5.5.1.1. Porcentaje de germinación (%)

Se realizaron evaluaciones diarias del porcentaje de germinación, durante dos semanas después de la siembra.

5.5.1.2. Porcentaje de contaminación (%)

Se evaluó el porcentaje de semillas contaminadas por bacterias y hongos, las evaluaciones se realizaron diariamente hasta su germinación (8 días semillas sin testa y 15 días semillas con testa).



Figura 1. Pasos para el establecimiento de semillas de caoba en medio básico: **A)** Árbol de Caoba. **B)** Colecta del fruto de caoba. **C)** Frutos de caoba **D)** Extracción de semillas. **E)** Semillas de caoba. **F)** Desinfección de semillas. **G)** Limpieza de semillas. **H)** Semilla sin testa en medio básico. **I)** Semilla con testa en medio básico.

5.6. Introducción de los brotes de caoba

Los explantes para la inducción fueron tomados de plántulas germinadas *in vitro* a los 22 días de su germinación cortando las yemas apicales con un tamaño de 1cm (**Figura 2 A y B**), previo a la siembra fueron colocados en los tres medios de cultivos (**Figura 2 C**) siguiendo la metodología descrita por Azofeifa *et al.*, (2009), Carranza *et al.*, (2013) Ocampo y Núñez, (2007), para lo cual se empleó: MS (100%), MS (50%) y WPM (100%) respectivamente, utilizando concentraciones de reguladores de crecimientos (**Cuadro 1**) (**Figura 2. D, E, F**). Las hormonas que se utilizaron en esta fase fueron citoquinina (6-bencilaminopurina/6-BAP), y una giberelina (ácido giberelico GA₃) en los medios descritos anteriormente, los brotes se indujeron en tubos de ensayo tapados y sellados con plástico de embalaje.

Cuadro 1. Factores en estudio para la micropropagación de *S. macrophylla* King.

Factor A	Medios de cultivo
	M1 = Murashig y Skoog (M.S) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg
	M2 = Murashig y Skoog (M.S/2) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg.
	M3 = Woody Plant medium (WPM) + BAP 1mg+ GA ₃ 0,2mg
Factor B	Periodo de cultivo
	P1 = 8 semanas
	P2 = 10 semanas
	P3 = 12 semanas

Nota: **M**: Medios de cultivo. **P**: Periodo de cultivo.

5.6.1. Variables para la introducción (Cuadro 1)

5.6.1.1. Porcentaje de supervivencia de los explantes (%)

Una vez que los explantes ya estaban inducidos en los medios de cultivos de estudio (MS, MS/2 y WPM) se evaluó el porcentaje de supervivencia, semanalmente.

5.6.1.2. Tiempo de respuesta (días)

Se registró el tiempo de respuesta en días, desde el momento del establecimiento hasta la observación de los brotes. Esta variable se evaluó una sola vez.

5.7. Multiplicación y evaluación de la mejor respuesta del medio del cultivo para el desarrollo de los explantes de caoba *in vitro*

5.7.1. Multiplicación de brotes

Los brotes fueron transferidos a los medios de estudio (**Figura 2 D, E y F**). Los subcultivos de los pequeños brotes producidos se efectuaron a las 8, 10, 12, semanas después de la siembra donde fueron ubicados para propagarlos en un medio nuevo. En cada una de las fases del cultivo, realizada la siembra, el material vegetativo se mantuvo en cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 horas luz con una temperatura de 24 ± 2 grados centígrado.

Cuadro 2. Tratamientos para la micropropagación de *S. macrophylla*.

T1	M1 P1(Murashig y Skoog (M.S) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg/8 semanas)
T2	M1 P2(Murashig y Skoog (M.S) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg/10 semanas)
T3	M1 P3(Murashig y Skoog (M.S) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg/12 semanas)
T4	M2 P1(Murashig y Skoog (M.S(2) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg/8 semanas)
T5	M2 P2(Murashig y Skoog (M.S(2) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg/10 semanas)
T6	M2 P3(Murashig y Skoog (M.S(2) + BAP 1mg + GA ₃ 0,2mg/12 semanas)
T7	M3 P1(Woody Plant medium (WPM) + BAP 1mg+ GA ₃ 0,2mg /8 semanas)
T8	M3 P2(Woody Plant medium (WPM) + BAP 1mg+ GA ₃ 0,2mg /10 semanas)
T9	M3 P3(Woody Plant medium (WPM) + BAP 1mg+ GA ₃ 0,2mg /12 semanas)

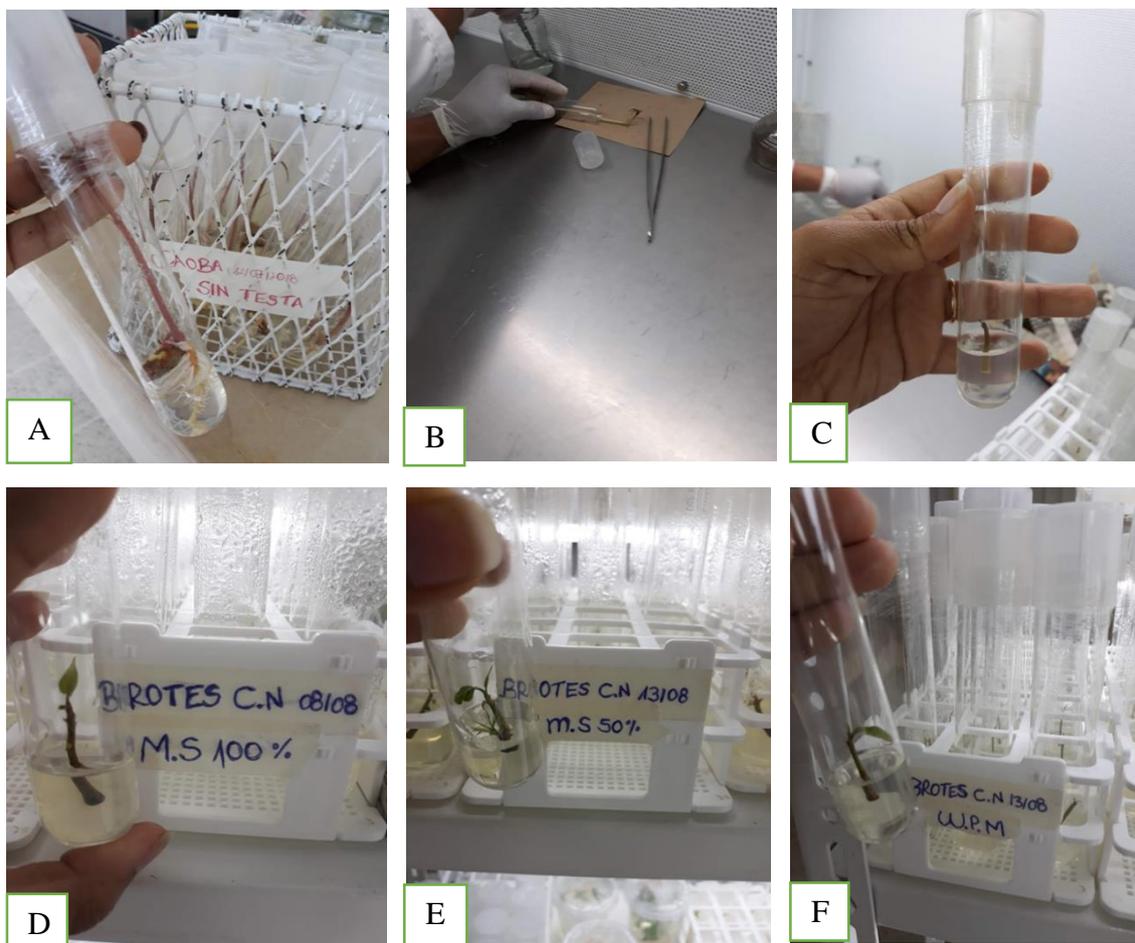


Figura 2: Multiplicación de apices de caoba en diferentes medios de cultivo: **A)** Explante para la inducción. **B)** Explante previo a la siembra. **C)** Brote inducido. **D)** Brote en medio MS 100%. **E)** Brote en medio MS 50%. **F)** Brote en medio WPM.

5.7.1.1. Variables en la multiplicación *in vitro* de caoba

5.7.1.1.1. Número promedio de brotes

Se registró por tratamiento, el número de nuevos brotes emitidos, esta actividad se realizó a la octava semana después de la siembra, cada dos semanas hasta la semana doce.

5.7.1.1.2. Longitud de brotes (cm)

Por cada tratamiento se midió la longitud de 5 brotes, dando un total de 15 brotes tomados al azar. Esta variable se midió con un calibrador digital y en condiciones de cámara de flujo.

5.7.1.1.3. Diámetro de tallo (cm)

En el momento que se registraron los datos correspondientes a la longitud de brotes, se midió el diámetro del tallo de la caoba con el calibrador en la parte media del explante, considerando cinco (5) brotes por tratamiento.

5.8. Enraizamiento *in vitro* de caoba establecido en condiciones de laboratorio

En la inducción al enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación se utilizó el mejor medio (WPM) con diferentes niveles de concentración de AIB (1,5mg, 2mg, 2,5mg) (**Cuadro 3; Figura 3**). Los explantes fueron cultivados en tubos de ensayo, fueron mantenidos en condiciones de 24 ± 2 grados centígrados y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad.

Cuadro 3. Tratamientos para la fase de enraizamiento

T1	Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg
T2	Ácido indolbutírico (AIB) 2 mg
T3	Ácido indolbutírico (AIB) 2,5 mg

5.8.1. Variables en enraizamiento *in vitro* de caoba.

5.8.1.1. Altura de planta (cm)

Se procedió a medir la altura de la planta en centímetros a las 8 semanas en la fase de enraizamiento.

5.8.1.2. Número de raíces

Se determinó a realizar el conteo de número de raíces en los diferentes tratamientos a las 8 semanas.

5.8.1.3. Longitud de raíces (cm)

Se realizó la medición de la longitud de las raíces en centímetros a las 8 semanas.

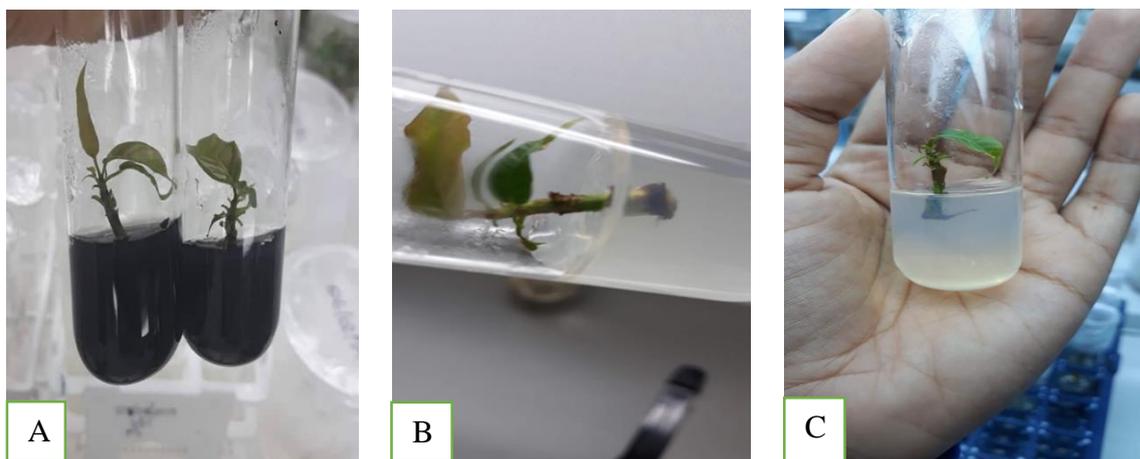


Figura 3: Plántulas en medio de enraizamiento: **A)** Plántulas en medio de enraizamiento con presencia de carbón activado **B)** Plántulas en medio de enraizamiento sin presencia de carbón activado **C)** Presencia de raíces.

5.9. Diseño experimental

En la fase de multiplicación se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con arreglo factorial 3x3. El mismo que incluyó nueve (9) tratamientos. Mientras que en la fase de enraizamiento los brotes fueron sembrados en medio Woody Plant Medium (WPM), con un Diseño Completamente al Azar, el mismo que incluyó tres (3) tratamientos. Los resultados obtenidos en esta investigación fueron procesados con el paquete estadístico Infostat versión 2017, para la comparación de medias entre los tratamientos fue utilizado el test de Tukey al 5%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Fase de establecimiento e introducción

En la fase de establecimiento se alcanzó el máximo nivel de germinación (100%) con el número total de semillas sembradas, esta condición pudo estar asociada a la alta viabilidad de las semillas en esta especie. Mientras tanto, no existió contaminación en la siembra de caoba en medios de cultivo. Se presume que esta situación ocurrió por el uso de antibiótico (amoxicilina) para evitar la contaminación con bacterias.

El uso de amoxicilina durante el desarrollo del ensayo permitió reducir de manera eficaz la incidencia de agentes microbianos contaminantes. La amoxicilina es un antibiótico derivado de las penicilinas con efecto sobre un amplio espectro de bacterias gram positivas y grandes negativas, que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias Duchefa, (2012) y Torres *et al.*, (2011) manifestaron que en *Acacia mangium* el uso de amoxicilina, cefalexina y ambramicina logró reducir la contaminación a menos del 26%, alcanzando a su vez altos porcentajes en la sobrevivencia de los explantes (76%). El uso de antibióticos tales como cefotaxima, penicilina y tetraciclina han demostrado tener gran capacidad de controlar la contaminación bacteriana en medios de cultivos para la propagación *in vitro* de especies como el agave (*Agave fourcroydes* Lem.) alcanzando porcentaje de control de la contaminación hasta del 97% (Abreu *et al.*, 2016). Asimismo, la ampicilina y cloranfenicol han reducido la contaminación en banana a valores por debajo del 30% (Alves *et al.*, 2014).

Al igual que la germinación, la sobrevivencia alcanzó un 100%. Por otro lado, la semilla con testa (SCT) germinó a los 15 días después de la siembra (DDS) en comparación con la siembra de la semilla sin testa (SST) la misma que germinó a los 8 días DDS lo que posiblemente se deba, al contacto directo de la semilla con el medio de cultivo (**Cuadro 4**), lo que coincide con los reportes de Sánchez *et al.*, (1983) quienes estudiaron la germinación de las semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell). Resultados semejantes fueron también obtenidos por Cuquel *et al.*, (1994). La velocidad de germinación presentada por las semillas de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sin testa fue superior, se puede deducir una intervención negativa de la testa en el proceso germinación. Por otro lado, Bewley y Black, (1994), Omokhafa y Alike, (2004). La testa protege al embrión de las condiciones ambientales adversas, pero también puede afectar negativamente la captación de agua impidiendo el inicio de las reacciones bioquímicas que finalizan en el proceso de germinación.

Cuadro 4. Porcentaje de germinación días a la germinación, contaminación y supervivencia de las semillas de caoba (*S. macrophylla*).

Germinación (%)		Días a la germinación		Contaminación (%)	Supervivencia (%)
SCT	SST	SCT	SST	0	100
100	100	15	8		

SCT: Semillas con testa, SST: Semillas sin testa

6.2. Fase de multiplicación de brotes

El número de brotes de caoba no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$). En relación al diámetro de tallo, el ANOVA no mostró diferencias significativas para la interacción de medio y periodo de cultivo, aunque se evidenció diferencias estadísticas para los medios de cultivos utilizados (**Figura 4; Anexo 2**); donde la respuesta más favorable fue obtenida con brotes desarrollados en WPM y 1 mg BAP + 0,2 mg GA3 durante un periodo de ocho semanas, con promedios de 0,34 cm, no obstante, este fue estadísticamente similar a los brotes sometidos bajo el tratamiento con el medio Murashig y Skoog (M/S) /2 + BAP 1 mg + GA3 0,2 mg durante el mismo tiempo de crecimiento (ocho semanas) (**Figura 4**).

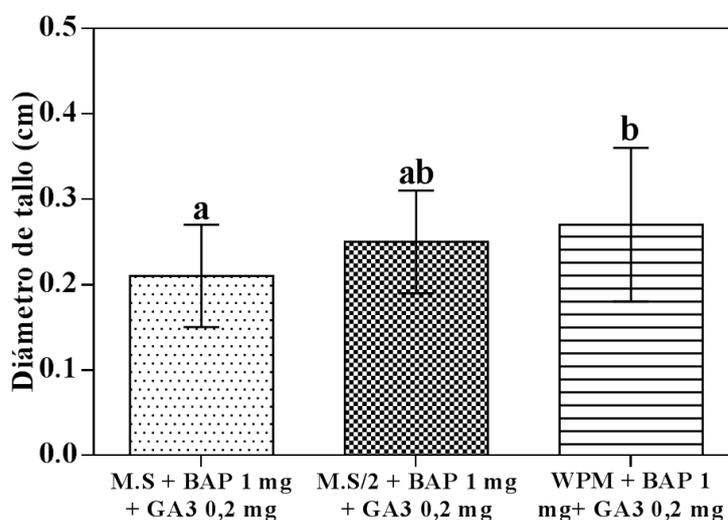


Figura 4. Diámetro de tallo de brotes de caoba (*S. macrophylla*) bajo condiciones *in vitro*. Barras con letras en común no difieren estadísticamente según el test LSD de Fisher ($P > 0,05$).

El uso de medio M/S + BAP 1 mg + GA3 0,2 mg, produjo brotes con menor diámetro de tallo. Además, se observó que el medio de cultivo es el factor con mayor efecto sobre el

crecimiento en diámetro de los brotes y no el periodo de tiempo durante el cual las plántulas permanecieron en estudio.

Por otra parte, se registraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) en la longitud de brotes, alcanzó su máximo de crecimiento a la octava semana después de la siembra de los explantes. Mientras tanto, no se observaron diferencias con los medios ni en la interacción medio por periodo de cultivo (**Cuadro 5; Anexo 3**). Los brotes con mayor longitud se encontraron tanto a la octava como undécima semana con valores promedios que se movieron en un rango entre 2,33 y 2,06 cm, mientras que los brotes de menor longitud fueron percibidos a la semana 10 del periodo de cultivo (**Figura 5**).

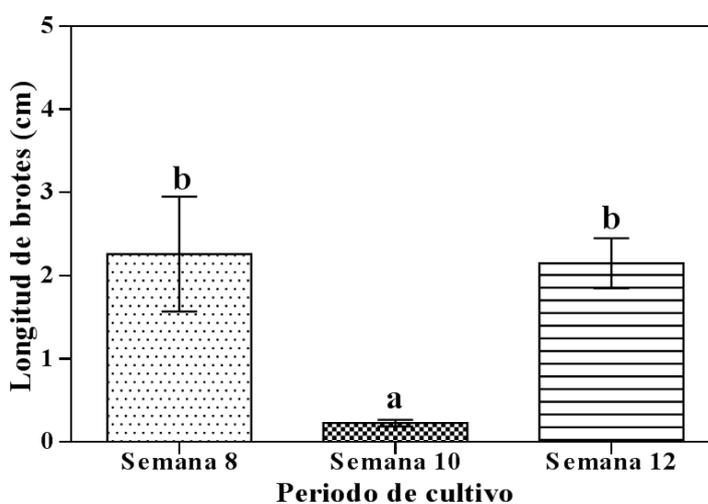


Figura 5. Longitud de brotes de caoba (*S. macrophylla*) en condiciones *in vitro* a la octava, décima y undécima semana después de la siembra. Barras con letras en común no difieren estadísticamente según el test LSD de Fisher ($P < 0,05$).

La producción de brotes mostró alta significancia estadística ($P < 0,05$) tanto para interacción de los factores en estudio de medio de cultivo por tiempo de crecimiento, así como para los efectos individuales de los factores en estudio, siendo estadísticamente superior. Los brotes de caoba produjeron el mayor número de brotes a la duodécima semana (3,6 brotes) siendo estadísticamente superior al número ($P < 0,01$) en relación a la brotación, en la octava y decima semana, cabe recalcar que la menor longitud de brote en la semana 10 se dio por que la semana 8 se realizó la medición y corte de los brotes para proceder a ubicarlos en un nuevo medio de cultivo, donde estos no desarrollaron lo suficiente y simplemente se tomó la medición y se transfirieron al nuevo medio (**Figura 6; Anexo 4**). Sin embargo, también hubo interacciones significativas con los medios de cultivo (**Cuadro 5**), la combinación más favorable de estas interacciones ocurrió con WPM + BAP 1 mg + GA3 0,2 mg y P3, registró el mayor número de brotes (5) (**Figura**

6). La interacción del medio de cultivo, en términos de tipo de nutrientes y concentración de reguladores de crecimiento podría explicar los resultados mostrados de las diferentes variables analizadas en el ensayo. Se asume que la composición de WPM proporciona los macro y microelementos esenciales, además de un gran número de vitaminas (mioinositol, ácido nicotínico, piridoxina, y glicina), que promueven adecuado desenvolvimiento metabólico de los explantes, en especial de plantas leñosas, para lo cual este medio es el más indicado (Duchefa, 2012).

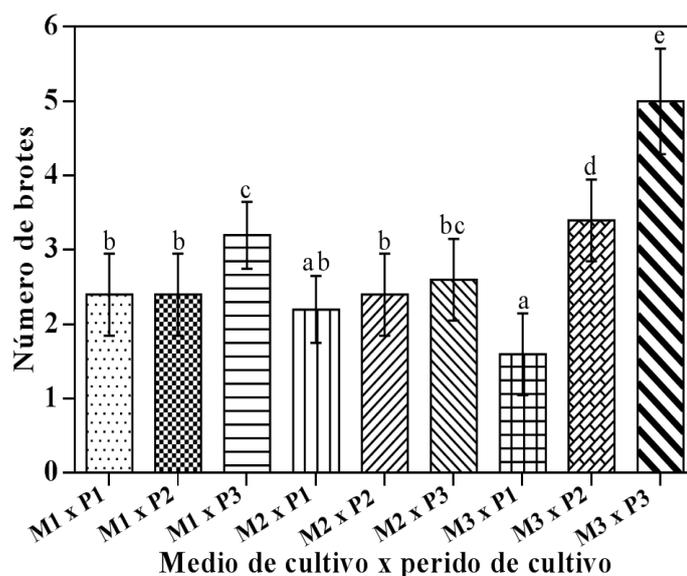


Figura 6. Número de brotes de caoba (*S. macrophylla*) en condiciones *in vitro*. M1= M.S + BAP 1 mg + GA3 0,2 mg; M2= M.S/2 + BAP 1 mg + GA3 0,2 mg; M3= WPM + BAP 1 mg+ GA3 0,2 mg; P1= 8 semanas; P2= 10 semanas; y P3= 12 semanas. Barras con letras en común no difieren estadísticamente según el test LSD de Fisher ($P > 0,05$).

Cuadro 5. Promedio (ANOVA) de diámetro de tallo, longitud y número de brotes de caoba (*S. macrophylla*).

Factor de variación	Diámetro de tallo	Longitud de brote	Número de brotes
Medio	0,0478 ^{NS}	0,3915 ^{NS}	0,0001**
Tiempo	0,4973 ^{NS}	<0,0001**	<0,0001**
Medio x Tiempo	0,1361 ^{NS}	0,8383 ^{NS}	<0,0001**
C.V. (%)	28,85	18,54	19,56

Los valores mostrados en la tabla representan los *P*- valores de los análisis de varianza para medio, tiempo e interacción medio x tiempo en las variables diámetro de tallo, longitud de brote y número de brotes.

NS. Diferencias no significativas entre medio, tiempo o medio x tiempo ($P < 0,05$).

* Diferencias significativas ($P < 0,05$) y ** diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre medio, tiempo o medio x Tiempo ($P < 0,05$).

C.V. (%) coeficiente de variación de Pearson.

La caoba responde eficientemente al uso de BAP con 2 mg/L, es posible obtener porcentajes de 70% brotación de explantes, además también se obtiene mayor longitud de brotes en medio MS (Carranza *et al.*, 2013).

Collado *et al.*, (2004) encontraron resultados similares de brotación (63%) de los explantes con una concentración de 0,2 mg/L de 6 BAP utilizando ápices y segmentos nodales de caoba. Por otra parte, otros autores señalan que no son necesarias dosis prominentes de esta hormona para inducir la brotación, dado que dosis más altas pueden generar un efecto inhibitorio en la emisión y elongación de brotes en la fase de multiplicación de la caoba dado que si la concentración de auxina es mayor que la citoquinina, hay tendencia a obtener pocos vástagos por motivo de intoxicación de los tejidos, sin embargo, estas respuestas varían según la especie vegetal (Sánchez *et al.*, 2004).

Por esta razón, BAP aplicada en bajas concentraciones, promueve no sólo la división celular sino también la brotación y elongación de las yemas (Collado *et al.*, 2004). Los requerimientos de citoquinas en plantas *in vitro* suelen ser muy variables y las respuestas a la inducción de brotes dependen del contenido endógeno de cada especie y del tipo de explantes utilizado (Carranza *et al.*, 2013).

Por otro lado, Vásquez y Torres (1995), exponen que el balance endógeno de reguladores de crecimiento en caoba es alcanzado de manera natural en la planta, no obstante, cuando los tejidos son aislados en medios artificiales para multiplicarlos, como es el caso del cultivo *in vitro*, la adición y acción exógena de reguladores de crecimiento es indiscutible debido a su efecto sobre la división celular. Para este estudio se observó que el BAP agregado especialmente WPM produce un mayor número de brotes y el desarrollo de estos es satisfactorio.

6.3. Fase de enraizamiento *in vitro* de caoba establecida en condiciones de laboratorio.

Los explantes que crecieron en Woody Plant Medium + 2,0 mg AIB y Woody Plant Medium + 2,5 mg AIB mostraron una altura de brotes de 2,78 y 2,60 cm, respectivamente, las cuales fueron superiores respecto a Woody Plant Medium + 1,5 mg AIB, registrándose diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos (**Cuadro 6; Anexo 5**).

Por otra parte, las variables número y longitud de raíces no reportaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) cuando se utilizaron los tres medios de cultivo en el proceso de adaptación de la caoba (**Cuadro 6; Anexo 6 y 7**). Por lo tanto, en las diferentes de concentraciones de AIB no ejercieron influencia en el enraizamiento de esta especie vegetal bajo condiciones de laboratorio. Aunque no existieron diferencias estadísticas entre los medios para las variables número de raíces y longitud se percibió una aceptable diferencia numérica relacionada al efecto de AIB lo cual podría ser sujeto de análisis al momento de seleccionar el medio para el enraizamiento de una especie vegetal en particular.

Cuadro 6. Promedio de altura de planta, número de raíces y longitud de raíces de caoba (*Swietenia macrophylla* King) en respuesta a tres medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio.

Medios de cultivos	Altura de planta cm	Número de raíces	Longitud de raíces cm
Woody Plant medium + 1,5 mg AIB	2,02	0,10	0,10
Woody Plant medium + 2,5 mg AIB	2,60	0,46	0,32
Woody Plant medium + 2,0 mg AIB	2,78	0,64	0,36
C.V. (%) ^z	14,28	67,08	46,23

^{SD} Desviación estándar de la media

^{CV} Coeficiente de variación de Pearson

Columnas con letras en común no son estadísticamente diferentes de acuerdo con el test LSD de Fisher ($P > 0,05$).

Altura de planta y longitud de raíces fue medida en centímetros (cm) después de 30 días de la inducción al enraizamiento.

^Z Coeficiente de variación de Pearson de las medias de los tratamientos.

La longitud de los brotes es afectada por la concentración de AIB de manera considerable como lo afirma Carranza *et al.*, (2013) haciendo mención que el uso único de esta hormona puede en ocasiones causar bajo porcentaje de brotación por lo cual se ha recomendado la utilización de una relación 2:1 auxina: citoquinina para mejorar el desarrollo de los brotes en caoba.

En el caso de caoba el número de raíces no se ve influenciado por el tipo de medio, sin embargo y aunque cada especie vegetal tiene sus propios requerimientos para la multiplicación *in vitro*, en especies como *Nothofagus alpina* el medio de cultivo juega un rol importante en la producción de raíces por explantes como lo reportó (García *et al.*, 2015).

Los parámetros de enraizamiento son muy sensibles a las concentraciones de hormonas, mayores concentraciones de hormonas normalmente conducen a la reducción del número y longitud de raíces. De esta manera, cuando no se añaden reguladores de crecimiento al medio en la multiplicación de la caoba *in vitro* durante la fase de enraizamiento es imposible obtener formación de raíces (Carranza *et al.*, 2013), resultados que también fueron reportados por Bernal *et al.*, (2009) en el enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de *S. macrophylla*.

Por ejemplo, en *Cedrela odorata* la utilización de 5.000 ppm de AIB incrementa entre tres cinco y tres veces más el número de raíces de primer y segundo orden respecto a tratamientos sin AIB, mientras que la variación en la longitud de raíces de primer y segundo orden no es significativa. Un efecto adverso es encontrado cuando las concentraciones de AIB son superiores, dado que con 10.000 ppm ocurre disminución en el número de raíces posiblemente por intoxicación (Sampayo Maldonado *et al.*, 2016).

Las auxinas son potentes hormonas que estimulan el desarrollo de raíces adventicias en el enraizamiento de estacas (Kumar *et al.*, 2011) motivo por el cual se ha recomendado el uso de AIB para especies en las que el enraizamiento se califica como difícil (Castillo *et al.*, 2013), logrando así promover la actividad del cambium y movilización de reservas hacia el sitio de iniciación de las raíces a través de la aplicación de este tipo de hormonas (Dhillon *et al.*, 2011).

8. CONCLUSIONES

- Los explantes de caoba se comportan de manera similar desde la octava hasta la duodécima semana sin que observen diferencias importantes por el efecto del factor tiempo.
- Los medios de cultivo para la multiplicación de la caoba no tienen influencia sobre los parámetros de longitud y diámetro de brotes, pero sí sobre el número de brotes, lo cual aumenta con el uso de WPM + BAP 1mg + GA3 0,2 mg.
- Woody Plant Medium suplementado con 2 mg de AIB ofrece condiciones ideales para el enraizamiento *in vitro* de los brotes de caoba, dado que es un medio óptimo para programas de multiplicación de especies leñosas *in vitro*.

9. RECOMENDACIONES

- Continuar con investigaciones sobre propagación in vitro, en especies forestales nativas.
- Realizar la aclimatación de las plántulas para conocer las condiciones óptimas y medidas de manejo necesarias para completar el proceso de propagación de la caoba.
- Probar el medio Woddy Plant midium con otras auxinas para provocar enraizamiento en caoba.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu E; Sosa M; Ascunce G; Gonzalez G. 2016. Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. Biotecnología vegetal 16 (1): 31-36 pp.
2. Acosta G; Mendizábal L; Alba J; Alderete A; De la Cruz L. 2012. Variación de semillas y germinación de *Swietenia macrophylla* King de tres procedencias del Estado de Tabasco, México. Forestal Veracruzana 14(1):35-42 pp.
3. Adams M. 2002. Cultivar los mercados antes de cultivar la madera. Actualidad Forestal Tropical. 10 (4): 19-20 pp.
4. Aguilar J; Aguilar M. 1992. Árboles de la Biosfera Maya Petén, Guía para las especies del Parque Nacional Tikal. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología, Centro de Estudios Conservacionistas (CECON). 272 p.
5. Albarrán J. 1990. Estudios de condiciones óptimas para la regeneración *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King. Trabajo Especial de Grado. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
6. Alves G; Conceicao A; Furlani E. 2014. Uso da ampicilina sódica y cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagacao de bananeira *Thap maeo*. Ceres 61(3):299-305 pp.
7. Arora K; Sharma M; Srivastava J; Ranade S; Sharma A. 2010. Rapid *in vitro* cloning of a 40 year old tree of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) employing nodal stem segments. Agroforestry Systems, 78: 53-63 pp.
8. Azofeifa J; Rojas A; Hine A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliaceae). Tecnología en Marcha 22(3):34-41 pp.
9. Barrance A; Beer J; Boshier D; Chamberlain J; Cordero J; Detlefsen G. 2003. Árboles de Centroamérica. Oxford Forestry Institute Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 901-906 pp.
10. Bergo M; Pastore M; Coradin V; Wiedenhoeft A; Braga J. 2016. Identification of *Swietenia macrophylla* is robust across specimens from 27 countries. IAWA J. 37:420–430 pp.
11. Bernal J; Rojas A; Hine A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliácea), Tecnología en Marcha 22(3): 34-41 pp.

12. Bewley J; Black M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 445 p.
13. Brown N; Jennings S; Clements T. 2003. The ecology, silviculture and biogeography of mahogany (*Swietenia macrophylla*): a critical review of the evidence. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 6(1.2): 37-49 pp.
14. Burley J. 1987. Applications of biotechnology in silviculture and development rural. Common. Mérida, Venezuela. Forest Review 66(4): 357-367 pp.
15. Cañal M; Rodríguez R; Fernández B; Sánchez R; Majada J. 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. Biotecnología vegetal 1: 3-9 pp.
16. Carranza M; Reyes H; Mora W; Cevallos O; Escobar A; Cadme M. 2013. Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King.
17. Carrizosa M; Serrano C. 1996. Sistemas modelo para la micropropagación y conservación de especies forestales. En: Memorias de IV Congreso. La investigación en la Universidad Javeriana. Bogotá D. C: Pontificia Universidad Javeriana. 261-272 pp.
18. Castillo J; López M; López U; Cetina V; Hernández T. 2013. Influence factors in rooting of cuttings of *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. et Cham. Rev Chapingo, Ser. Cien. Forestales Amb. 19: 175-184 pp.
19. Celestino C; Hernández I; Carneros E; López D; Toribio M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal.
20. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) 2000. Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. Volumen 1. Turrialba, Costa Rica. (Serie Técnica, Manual Técnico N. 41). CATIE-PROSEFORDFSC. Turrialba, Costa Rica. 204 p.
21. Cerdán C. 2007. La Tala ilegal de caoba (*Swietenia macrophylla*) en la Amazonía Peruana y su comercialización al mercado exterior.
22. Chudnoff M. 1984. Tropical timbers of the world. Agriculture Handbook 607. United States Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC, 464 p.
23. Clemente M. 1999. *In Vitro* Culture (IVC) and Plant Conservation. En: A Colour atlas of Plant Propagation Conservation. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London. 77-86 pp.
24. Colegio Nacional de Ingenieros Forestales (CONIFOR) 2007. Propuesta Nacional para el manejo de la *Swietenia Macrophylla* King “Caoba” en Ecuador.

25. Collado R; Barbón R; Agramonte D; Jiménez F; Pérez M; Gutiérrez O. 2006. Embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King, (Vol. 6).
26. Collado R; Barbón R; Agramonte D; Jiménez F; Pérez M; Odalys G; Ramírez D. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King, *Biotecnología Vegetal* 4(3): 143-146 pp.
27. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2012. *Swietenia macrophylla*. En línea. (19 de enero del 2019) http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/37melia5m.pdf.
28. Convención sobre el Comercio Internacional en Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) 2011. "CITES Appendices." En línea en <http://cites.org/eng/app/index.shtml>.
29. Cuquel F; De Carvalho M; Chamma H. 1994. Aliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.). *Sci. Agric. Piracaba*, 51(3): 415-421 pp.
30. Despommier D. 2009. A Farm on Every Flor. *The New York Times*. En línea: <http://www.nytimes.com/2009/08/24/opinion/24Despommier.html>
31. Dhillon R; Hooda M; Pundeer J; Ahlawat K; Chopra I. 2011. Effects of auxins and thiamine on the efficacy of techniques of clonal propagation in *Jatropha curcas* L. *Biomass Bioenerg.* 35: 1502-1510 pp.
32. Duchefa. 2012. *Plant Cell and Tissue Culture, Phytopathology, Biochemicals*. En línea: www.getter-biomed.co.il
33. Falah S; Suzuki T; Katayama T. 2012. Chemical constituents from *Swietenia macrophylla* bark and their antioxidant activity. *Pak. J. Biol. Sci.*
34. Fay M; Bunn E; Ramsay M. 1999. *In Vitro Propagation*. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London. 97-107 pp.
35. Ferreira E; Alfenas A; Goncalves R; García H; Cardoso R; Penchel R. 2004. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. *Revista Árvore*, 28(2), 183-187 pp. En línea: <https://doi.org/10.1590/s0100-67622004000200004>
36. García B. 2006. Informe final de diagnóstico, investigación y servicios desarrollados en la Unidad de Plagas forestales del Proyecto de Protección forestal / Investigación: Caracterización de enfermedades fungosas de especies forestales

- en plantaciones PINFOR ubicadas en Escuintla, Suchitepéquez y Retalhuleu. Tesis Lic. Ing. agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 136 p.
37. García L; Carrasco J; Morante J; Luna R; González B; Castro J. 2015. Micropropagación *in vitro* de *Nothofagus alpina* utilizando fitohormonas. Ciencia y Tecnología 8(1): 1-10 pp.
 38. Gómez T; Jasso M. 1995. Variación morfológica de frutos de *Swietenia macrophylla* King. II Congreso Mexicano sobre Recursos Forestales. Montecillo, MX .11 p.
 39. Grogan J; Barreto P; Veríssimo A. 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.
 40. GRUPO INFOSTAT: InfoStat software estadístico InfoStat versión 2017, manual de usuario, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
 41. Hartmann H; Kester D; Dovies J; Geneve E. 1997. Plant propagation principles and practices. 6th ed. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice
 42. International Tropical Timber Organization (ITTO) 2001. Plan Action 1998 to 2001. En línea: <http://www.itto.or.jp>.
 43. Izquierdo M. 1999. Ingeniería genética y Transferencia génica. Editorial Pirámide. Madrid. España; 50- 55 pp.
 44. Jiménez F; Agramonte D. 2012. Biotecnología Vegetal, 13(1), Disponible en: <<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/89/456>>.
 45. Kumar D; Singh S; Sharma R; Kumar V; Chandra H; Malhotra K. 2011. Above-ground morphological predictors of rooting success in rooted cuttings of *Jatropha curcas* L. Biomass Bioenerg. 35: 3891-3895 pp.
 46. Lamb F. 1966. Mahogany of Tropical America: its ecology and management. University of Michigan, Ann. Arbor. 220 p.
 47. Lee S; Rao. 1998. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King. Through tissue culture. Gard. Bull. (Singapore) 41:11-18 pp.
 48. Leifert C; Cassells A. 2001. Microbial hazards in plant tissues and cellculture. *In vitro* Cell and Developmental Biology Plant. 367:133-138 pp.
 49. Lemes M; Grattapaglia D; Grogan J. 2007. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implication for the management of a threatened neotropical tree species. Plant Ecology192: 169-179 pp.

50. Lloyd G; McCown B. 1981 Woody Plant Medium (WPM) A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. HortScience 16: 453-453 pp.
51. Loureiro A; Da Silva M; Alencar J. 1979 Essências Madeireiras da Amazonia. Vol. I and II. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus, AM. Brazil, 245 p. (Vol. I) and 187 p. (Vol. II).
52. Lovera M. 2008. Los Bosques y el Convenio sobre Diversidad Biológica: Supervisión Independiente de la Aplicación del Programa de Trabajo Ampliado. Miguel Lovera (editor), Coalición Mundial por los Bosques, Amsterdam, 45-48 pp.
53. Luna M. 2002. Inducción de respuestas morfogénicas en *Abies religiosa* (Kunth) Schldtl & Cham. Y *A. hickelii* Flous y Gausen de la región del Cofre de Perote Veracruz. Tesis. Maestría en Ecología Forestal. Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver. México, 64 p.
54. Lynch P. 1999. Tissue Culture Techniques *in Vitro* Plant Conservation. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, 41-62 pp.
55. Marquetti J. 1992. Posibilidad de hibridación en *Toona ciliata* por *Cedrela fissilis* mediante el uso del injerto múltiple. Baracoa 22(3): 39-42 pp.
56. Medina M; Sotolongo R. 2004. Avances en el cultivo de tejidos de *Swietenia macrophylla* King. X *Swietenia mahogani* Jaco. Revista Forestal Baracoa (2) 23: 19-26 pp.
57. Ministerio del Ambiente (MAE) 2017. Acuerdo Ministerial N° 090.
58. Mona A. 2012. *in vitro* Propagation of *Swietenia macrophylla* King.
59. Mroginski L; Sansberro P; Flaschland E. 2010. Establecimiento de cultivos Vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argenbio. INTA. 70-84 pp.
60. Murashige T. and Skoog F. 1962 A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497 pp. En línea: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
61. Navarro C. 1999. Diagnóstico de la caoba (*Swietenia macrophylla* King) en Mesoamérica: Silvicultura Genética. San José, CR, Centro Científico Tropical (CCT). 25 p.

62. Ocampo F; Núñez V. 2007. Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajaba*), mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. Ciencia y Tecnología Agropecuaria.
63. Ochoa G; Pérez I; Jiménez N. 2008. Descripción de las especies de árboles más comunes de la sierra de Tenosique, Tabasco, México. Colegio frontera Sur proyecto FOMIX CONASYT ESTADO Tabasco.
64. Omokhafa K; Alika J. 2004. Clonal variation and correlation of seed characters in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Indust. Crops Prod. 19: 175-184 pp.
65. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) 2001. Situación de los Bosques del Mundo 2001. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia. En línea: <http://www.fao.org/3/y0900s/y0900s00.htm>.
66. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) 2004. Biotechnology in forestry, including: Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E.Roma. En línea: <http://www.fao.org/forestry/92070/es/>.
67. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) 2016. El Estado de los bosques del mundo. Los bosques y la agricultura, desafíos y oportunidades en relación con el uso de la tierra. En línea: <http://www.fao.org/3/i5588s/i5588s.pdf>.
68. Pastore T; Braga J; Coradin V; Magalhães W; Okino E; Camargo J; Muñoz G; Bressan O; Davrieux F. 2011 Near infrared spectroscopy (NIRS) as a potential tool for monitoring trade of similar woods: dis-crimination of true mahogany, cedar, andiroba, and curupixá. *Holzforschung* 65:73–80 pp.
69. Patiño F. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotrópicos: Propuestas para acciones coordinadas. Roma, IT, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 58 p. (FAO, Departamento de Montes, proyecto FAO/GCP/RLA/128/NET).
70. Pennington T. 2002. Mahogany carving a future. *Biologist* 49(5): 204-208 pp.
71. Pennington T; Saraukán J. 2005. Árboles tropicales de México. Manual de identificación de las principales especies. 3ª edición. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. México. 523 p.
72. Perea D. 1990. Biotecnología agrícola mediante la utilización de los sistemas *in vitro*. Agricultura de las Américas. Bogotá.
73. Pérez P; Jiménez G. 1995. Micropropagación y fundamentos teóricos prácticos del cultivo *in vitro*". Conferencias en Biotecnología Agrícola. 1-10 pp.

74. Pierik R. 1990. *In vitro* Culture of higher plants. Holland. Kluwer Academic Publisher.
75. Pijut P; Lawson S; Michler C. 2011. Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *in vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 47: 123-147 pp.
76. Ramírez H; Guevara M; Escobar R. 2012. Cultivo de tejidos vegetales: conceptos y prácticas. Edición Alberto Ramírez. Universidad Nacional de Colombia. Cali, Colombia: 23-24 pp.
77. Rebolledo V; Aparicio R; Cruz A. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Forestal Veracruzana* 8(2):19-22 pp.
78. Rebolledo V; Aparicio A; Cruz H. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana*, año/Vol. 8, No. 002. Universidad Veracruzana, Xalapa, México: 27-32 pp.
79. Reynel C; Pennington R; Pennington T; Flores C; Daza A. 2003. Árboles útiles de la Amazonía Peruana. Manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Perú.
80. Reforestation Species (RISE). 1995. Mahogany (*Swietenia macrophylla* King) and Narra (*Pterocarpus* spp.). Ecosystem Research and Development Bureau College. Languna Philippines, 7(1).
81. Rodríguez R. 1999. Bases fisiológicas del envejecimiento y revigorización vegetal. Libro de reportes cortos. En: IV Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba: 9-13 pp.
82. Roskov Y; Abucay L; Orrell T; Nicolson D; Bailly N; Kirk P. 2018. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2018 Annual Checklist. DVD. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.
83. Salazar R. 2010. Historia del cultivo de tejidos vegetales. Disponible en: www.calameo.com/subscriptions/632868.
84. Sampayo M; Jiménez C; López U; Sánchez M; Jasso M; Equihu M; Castillo M. 2016. Enraizado de miniestacas de *Cedrela Odorata* L. *Agrociencia*. 50: 919-929 pp.
85. Sánchez M; Ríos D; Pedraza M; Pereira G; Castellanos H; Escobar R. 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* (Poepp. et Endl.) Oerst) a partir de embriones aislados. *Revista Forestal Bosque* 25(1): 123-128 pp.

86. Saucedo S; Ramos L; Reyes T. 2007. Efecto de reguladores de crecimiento para la propagación *in vitro* de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Ciencia y Tecnología 1:17-21. 2008 pp.
87. Schleiden N; Schwann K. 1938. Los organismos están formados por células. 7 ed. 564 p.
88. Tacoronte M; Vielma M; Mora A; Valecillos C. 2004. propagacion *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* KING) a partir de yemas axilares. (Vol. 55).
89. Thorpe A; Harry I; Kumar P. 1991. Application of micropropagation to forestry. In: P.C. Deberghy, R.H. Zimmerman (eds). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers (Netherlands): 311-33 pp.
90. Tobar C. 2011. Totipotencialidad. Disponible en: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Totipotencialidad/1499061.html>.
91. Toribio M; Celestino C. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Investigaciones agrarias. (España) Fuera de Serie. N°. 2.
92. Torres L; Suarez I; Gatti K. 2011. Propagación *in vitro* de *Acacia mangium* Will. Rev. Bio. Agro. 11(1):81-87 pp.
93. Unites States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service USDA FAS. 2011. Global Agricultural Trade System (GATS), Forest products trade statistics. Access: <http://www.fas.usda.gov/gats/default.aspx>.
94. Unites States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service USDA FPL. 2011. Center for Wood Anatomy Research, Madison, Wisconsin. Access: <http://www.fpl.fs.fed.us/research/centers/woodanatomy/index.php>.
95. Uribe M; Delaveau C; Garcés M; Escobar R. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque 29(1): 5864 pp.
96. Vasil I; Vasil V. 1980. Clonal propagation. In: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Int. Rev. Cytol. Supp. 11A. Ed: I. K. Vasil. pp. 143-173 pp.
97. Vázquez E; Torres S. 1995. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. Segunda edición. Ciudad de la Habana. 60-63 pp.
98. Verdeil J; Hornung R; Huet C; Jacobsen H; Rillo E; Oropeza C; Bourdeix R; N'cho Y; Hocher V; Hamon S; Sangare A. 1999. Recent progress on coconutmicropropagation through a joined effort involving different countries. En: Oropeza C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cárdena R y Santamaría JM (Eds).

Current Advances in Coconut Biotechnology, Kluwer Academia publishers,
Dordrech: 391-405 pp.

99. World Conservation Monitoring Centre 1998. *Swietenia macrophylla*. The IUCN Red List of Threatened Species. En línea: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK>.

11. ANEXOS

Anexo 1. Metodología usada por Carranza *et al.*, (2013). En la propagación clonal *in vitro* de *S. macrophylla*.

Fases de la propagación *in vitro*

Establecimiento aséptico del cultivo. Los 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 por 20 minutos en cámara de flujo laminar vertical 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. Los 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) y ácido indolbutírico (AIB) (0.5 y 1 mg/ L), 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. Los explantes fueron evaluados a los 21 días de su establecimiento.

Modificaciones a la metodología descrita por Carranza 2013

Establecimiento: Se colectaron los frutos de los árboles de caoba del Jardín Universitario en estado de madurez fisiológica, se procedió a realizar el lavado de los frutos con jabón líquido por cuatro minutos y después llevarlo a la cámara de flujo laminar para extraer las semillas y ubicarla en un vaso con agua esterilizada con 2 gotas de tween20 por 10 minutos en agitación, luego se realizó el respetivo enjuague y posteriormente se retiró la testa a la mitad de las semillas utilizadas y el resto se las sembró con la testa en tubos de ensayos con 15 ml de medio de cultivo básico con 0,2mg de antibiótico (amoxicilina) para evitar contaminación bacteriana hasta su germinación.

En cada una de las fases del cultivo, realizada la siembra, el material vegetativo se mantuvo en cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 horas luz con una temperatura de 24 ± 2 grados centígrados.

Multiplicación: Los explantes libres de agentes contaminantes de entre 1,5 y 2 cm de longitud, fueron transferidos a medios de cultivo MS100%, MS50% y WPM de multiplicación, con bencilaminopurina (BAP) (1 mg/L) y ácido Giberelico (GA₃) (0.2 mg/L).

Enraizamiento: Se seleccionaron los brotes del mejor medio de la fase de multiplicación, se ubicaron en el medio WPM con AIB a concentraciones de 1,5; 2 y 2,5 mg/ L. Los explantes fueron evaluados a las 8 semanas de su establecimiento.

Anexo 2. Análisis de varianza diámetro de tallo

F.V.	SC	gl	CM	F	p- valor
Modelo	0,08	8	44 1,94	0,0832	
Medio	0,03	2	0,02	3,31	0,0478
Tiempo	0,01	2	3,5E-03	0,71	0,4973
Medio*Tiempo	0,04	4	0,01	1,87	0,1361
Error	0,18	36	4,9E-03		
Total	0,25	44			

Anexo 3. Análisis de varianza longitud de brotes

F.V.	SC	GL	CM	F	P- VALOR
Modelo	39,63	8	4,95	60,26	<0,0001
Medio	0,16	2	0,08	0,96	0,3915
Tiempo	39,35	2	19,68	239,36	<0,0001
Medio*Tiempo	0,12	4	0,03	0,36	0,8383
Error	2,96	36	0,08		
Total	42,59	44			

Anexo 4. Análisis de varianza número de brotes

F.V.	SC	GL	CM	F	P- VALOR
Modelo	38,40	8	4,80	16,00	<0,0001
Medio	6,93	2	3,47	11,56	0,0001
Tiempo	17,73	2	8,87	29,56	<0,0001
Medio*Tiempo	13,73	4	3,43	11,44	<0,0001
Error	10,80	36	0,30		
Total	49,20	44			

Anexo 5. Análisis de varianza altura de planta

F.V.	SC	GL	CM	F	P- VALOR
Modelo	1,58	2	0,79	9,50	0,0034
Dosis	1,58	2	0,79	9,50	0,0034
Error	1,00	12	0,08		
Total	2,57	14			

Anexo 6. Análisis de varianza números de raíces en la fase de enraizamiento

F.V.	SC	GL	CM	F	P- VALOR
Modelo	0,76	2	0,38	2,33	0,1393
Dosis	0,76	2	0,38	2,33	0,1393
Error	1,94	12	0,16		
Total	2,70	14			

Anexo 7. Análisis de varianza longitud de raíces en la fase de enraizamiento

F.V.	SC	GL	CM	F	P- VALOR
Modelo	0,20	2	0,10	1,90	0,1924
Dosis	0,20	2	0,10	1,90	0,1924
Error	0,62	12	0,05		
Total	0,82	14			