

I. INTRODUCCIÓN

Los bosques cubren aproximadamente una tercera parte de la superficie terrestre, sin embargo la tasa de pérdida de bosque tropical se estima en 11 millones de hectáreas por año. Una de las principales causas es la extracción de madera para la construcción, la industria del mueble y la producción de pulpa de papel. Estados Unidos, Japón y el Reino Unido son los principales importadores (Burley, 1978).

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

Las Meliáceas poseen alto valor comercial, que ha provocado la disminución acelerada de un gran número de sus ejemplares en los países tropicales, entre las cuales se encuentra la ***Swietenia macrophylla* King** (caoba), (Grogan *et al.*, 2003). Debido al alto valor comercial, la caoba se explota en zonas forestales donde su extracción es prohibida y existen poblaciones reducidas de esta especie. De continuar con la explotación se estima que dentro de pocos años la caoba estará extinta (Jiménez, 1996).

Además, uno de los factores limitantes para el normal desarrollo de la caoba, es que los árboles jóvenes en particular están sujetos al ataque de ***Hypsipyla grandella* Zell** (Lepidoptera-Pyralidae), el cual consume los meristemas apicales y los rebrotes, produciendo nuevos rebrotes laterales que posteriormente son atacados dando como resultado un fuste reducido y la muerte del árbol (Neill y Revelo, 1999).

En el Ecuador, no existen programas destinados a la conservación y mejora de esta especie, resultando necesario realizar investigaciones orientadas a dar fin a los problemas citados anteriormente; estableciéndose bases sólidas que permitan

estructurar un programa integral de rescate, conservación y mejora de la caoba, y así contribuir al desarrollo ecológico, económico y ambiental del sector forestal de nuestro país. Al respecto, la FAO ha expresado la necesidad de mantener el recurso genético de la caoba, de igual manera su conservación ha sido definida como de alta prioridad (FAO, 1999).

La propagación de la caoba, se realiza por vía sexual (semillas), cuyo origen es desconocido. Generalmente, las plantas de las cuales se toman las semillas no son seleccionadas por sus características fenotípicas y genotípicas. Por tal razón, la mayoría de las plantaciones presentan alta heterogeneidad (Sharma *et al.*, 1996).

El empleo de técnicas biotecnológicas contribuirá al rescate, conservación y mejora de caoba, mediante la propagación *in vitro* de estas especies (Sharma *et al.*, 1996). Esta investigación pretende estandarizar una metodología que permitirá el desarrollo de yemas terminales, aislando segmentos nodales de 1 a 1,5 cm de longitud.

A. Objetivos

1. General

Establecer el método apropiado que facilite la propagación *in vitro* de ***Swietenia macrophylla* King** (caoba).

2. Específicos

- Determinar el mejor protocolo de desinfección de explantes de caoba para su establecimiento *in vitro*.
- Establecer la concentración más eficiente de citoquininas y auxinas en la fase de multiplicación y enraizamiento *in vitro*.

B. Hipótesis

En el presente trabajo se plantearon las siguientes hipótesis:

Con una concentración de 15 g de Hipoclorito de Calcio y un tiempo de 20 minutos en la fase de establecimiento se obtendrá el mayor número de explantes asépticos, mediante la utilización de yemas terminales en la especie ***Swietenia macrophylla* King** (caoba), bajo condiciones *in vitro*.

Con 2mg L-1 de Bencilaminopurina (BAP) más 1 mg de Ácido Indolbutírico (AIB), se obtendrá una mayor proliferación de brotes de ***Swietenia macrophylla* King** (caoba).

A menor concentración de AIB se obtiene una alta proporción de plantas enraizadas de ***Swietenia macrophylla* King** (caoba).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Características Generales de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

La Caoba es originaria de los bosques del el Sur de México hasta la Cuenca del Amazonas (Gueilfus, 1994), específicamente hasta el rio Paraguay en Brasil y Bolivia (Lamb, 1966). Su distribución corresponde generalmente a los bosques húmedos tropicales de estos países.

2. UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

La *Swietenia macrophylla* King (caoba), pertenece a la familia Meliaceae (Gueilfus, 1994) Los sinononimos botánicos conocidos son: *Swietenia candollei* Pittier, *S. belizansis* Lundell, *S. krukovii* Gleason & Panshin y *S. tessmannii* Harms (Little, 1967). Los principales nombres comerciales son: Caoba del Sur, Aguano, Ahuano, Mara, Orura, Acajou d' Amérique, Araputang, Mahogany.

El árbol de Caoba puede medir de 30-45 m de altura habitualmente, pero que puede alcanzar los 50 m y 2 m de DAP. Produce un fuste libre de ramas en los primeros 12 - 18 m, cilíndrico, largo y recto, a menudo con grandes aletones. Las copas de los árboles mayores pueden alcanzar hasta 20 m de diámetro. La corteza, a nivel estreno esta profunda y ampliamente fisurada, de color pardo grisáceo a gris oscuro, internamente de color rosado a rojo y de textura fibrosa. Las hojas son compuestas, de 16-40 cm de largo, alternas y agrupadas al final de las ramillas. Cada hoja tiene 3-6 pares de hojuelas opuestas, 9-14 cm de largo. Posee flores pequeñas, con cinco pétalos blanco amarillentos, agrupadas en inflorescencias axilares. Son unisexuales y el árbol es monoico.

El fruto es una cápsula leñosa, erecta, 12 - 22 cm de largo por 6 - 10 cm de ancho. Cuando maduran y se secan, 4 a 5 valvas del fruto se abren desde la base. Las semillas quedan entonces expuestas y colgando por las alas en el

centro del fruto. Cada fruto contiene 35 - 45 semillas aladas, color marrón y de 7.5 - 12 cm de largo incluyendo el ala.

B. Propagación convencional de las especies forestales con énfasis en Caoba.

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

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

1. PROPAGACIÓN SEXUAL

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

Otro de los problemas de la propagación de árboles por semillas está relacionado con la disminución de germinación y viabilidad. La caoba, por ejemplo puede almacenarse temporalmente (corto plazo) con un contenido de humedad de 4 a 5%, en envases plásticos y a una temperatura constante de 15° C (Samaniego, 1995). Estudios realizados por Araujo (1971) sobre la viabilidad de las semillas determinaron que la germinación es bastante rápida, iniciándose de los 13 a 17 días, con un periodo de 10 días de duración, sin embargo el porcentaje de

germinación se reduce drásticamente conforme aumenta el periodo de almacenamiento, Hernández (1960) manifiesta que la reducción de la viabilidad de las semillas de Caoba es en forma rápida y se debe a su riqueza en aceites esenciales. En cuanto a condiciones físicas para su germinación, estudios realizado por Samaniego (1995), demostraron que es necesario temperaturas constantes de 30 y 28° C y un fotoperiodo de 16 horas por día. La germinación es hipogea y de tipo criptocotilar; durante ésta, los cotiledones mantienen su posición dentro de la semilla pero se inicia el desarrollo de estructuras peciolares mediante crecimiento intercalar. Los peciolos se curvan hacia el exterior y forman una concavidad entre ellos, por la que el epicotíleo inicia su salida. El desarrollo del epicotilo es tardío y posterior al crecimiento longitudinal de los peciolos cotiledonares. Este no puede emerger de otra forma, debido a la fusión de los cotiledones a lo largo de la superficie adaxial de sus láminas (Alvarenga *et al.*, 1988).

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

2. PROPAGACIÓN ASEXUAL

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

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

- ❖ Habilidad para una rápida captura de una gran producción de la variación aditiva y no aditiva.

- ❖ Eliminación de individuos auto fecundados en plantaciones comerciales.
- ❖ Producción masiva de genotipos de alto valor obtenidos por hibridación o ingeniería genética.
- ❖ Multiplicación de individuos raros los cuales tienen dos o más características favorables que son de correlación negativa.
- ❖ Habilidad para seleccionar y utilizar la mayor parte de la diversidad genética que normalmente se encuentra en una sola progenie.
- ❖ Habilidad para el uso de clones que son bien adaptados a un sitio en particular.
- ❖ Mayor simplicidad y facilidad en el manejo de grupos de plantas en comparación con huertos semilleros.
- ❖ Los periodos entre la selección y la producción son cortos con parados con los huertos semilleros.
- ❖ Incremento de la superioridad de los clones promedio de programas de selección y habilidad para usar árboles en estado maduro.
- ❖ Posiblemente el uso de la propagación vegetativa en dasonomía aumentara y ha llegado a ser una de las herramientas más importantes del forestal dedicado al mejoramiento genético del árbol donante.

Los métodos más utilizados son las estacas enraizadas y el injerto. El método más reciente de propagación vegetativa que ha recibido mayor interés y difusión es el cultivo de tejidos.

3. INJERTOS

Los injertos son utilizados generalmente para propagar clones que no pueden ser convencionalmente reproducidos por enraizamiento de estacas u otros métodos de reproducción asexual (Rawar *et al.*, 1994). La influencia positiva de la

injertación es también observada en términos de nutrición y aportes de características de juventud (Franclet, 1979) y la transferencia de hormonas sintetizadas en las raíces del porta injerto (Greenwood, 1987).

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

4. ESTACAS ENRAIZADAS

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

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

En caoba, mediante el uso de propagadores de subirrigación y AIB en una concentración de 0.2%, se logró un 50% de enraizamiento de estacas

provenientes de tallos ortotropicos juveniles de plántulas (Mesén *et al.*, 1992). Este sistema demuestra la capacidad de producción de plantas clónales a partir de material juvenil de caoba, lo que permitirá la propagación vegetativa a partir de semillas mejorada obtenida a través del programa de mejoramiento forestal.

C. Propagación *in vitro* de árboles forestales

La propagación *in vitro* permite la regeneración de plantas a partir del uso de los callos, órganos, embriones, cultivos de células y protoplastos. En el cultivo de ápices se espera lograr la formación de ramas axilares que pueden separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que sub-cultive cada brote recién formado o cada ex plante de nudo, por lo tanto, este método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal (Krikorian, 1991).

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

A largo plazo, la producción en masa de clones forestales seleccionados probablemente se realizara *in vitro*, sin embargo, pocas especies se han

investigado al grado de que pueden ser producidas comercialmente (Leaket, 1987).

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

1. ENCISIÓN DE EMBRIONES

En las especies leñosas es muy difícil introducir el material adulto *in vitro*, por lo que se utiliza embriones zigóticos para su cultivo. Esta técnica se emplea también en caso de especies que producen semillas abortivas (Bonga y Von Aderkas, 1992), cuando la producción de semillas es esporádica, y en especies de semillas recalcitrantes que no se pueden almacenar y la técnica de propagación vegetativa no ha sido ampliamente adoptada.

En el cultivo *in vitro*, de especies forestales, se hace necesario la desinfección de las mismas para lo cual se utilizan diferentes productos como el hipoclorito de calcio y sodio, etanol al 70%, el peróxido de hidrógeno y el bicloruro de mercurio. En algunas especies es necesario realizar tratamientos previos de inmersión de las semillas en agua destilada estéril por periodo de 2 a 7 días a temperaturas de 4° C en la oscuridad para proceder a la extracción del embrión (Hammatt y Ridout, 1992).

Para la germinación de embriones se han utilizado medios simples como el medio Murashige y Skoog con sales reducidas a la mitad y normalmente libres de reguladores de crecimiento (Hammatt y Ridout, 1992). Las temperaturas para la germinación *in vitro*, van desde 20 a 30° C, pero por lo general el promedio utilizado es 25° C bajo condiciones iniciales de oscuridad, para continuar con fotoperiodos de 16 horas luz (Scott *et al.*, 1995).

2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática se usa en la horticultura y agricultura como la forma rápida de multiplicar variedades elites o clones de plantas (Suntton *et al.*, 1993). Han sido poco desarrollada en arboles, pero cada vez más común. Los embriones somáticos pueden ser formados directamente sobre la superficie del ex plante o indirectamente a partir de callos subcultivándose, o bien, a partir de masas celulares compuestos de pequeños embrioides y de células en suspensión (Bonga y Von, 1992).

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con ejes radical- apical, y no poseen conexiones vasculares con el tejido maternal (generalmente aislados por una epidermis). La embriogénesis somática y zigóticos presentan procesos ontogénicos idénticos o muy similares desde el estado globular hasta la conversión en plantas completas (Williams y maheswar, 1986).

Existen factores que afectan la embriogénesis somática, como el genotipo de explante, el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, las condiciones físicas de cultivo entre otros (Litz y Jarret, 1991).

La embriogénesis es generalmente preferida sobre la propagación por brotes axilares u organogénesis cuando uno o pocos genotipos se propagan a gran escala, debido a las siguientes ventajas:

- ❖ La embriogénesis produce más cantidad de propágulos que otros métodos de propagación.
- ❖ En la embriogénesis, no se requiere la inducción de raíces, como un paso separado.
- ❖ Un componente importante de la embriogénesis somática es su habilidad para capturar la ganancia genética en familias seleccionadas en programas de mejoramiento genético dirigido a la producción, la calidad de madera y la resistencia a plagas y enfermedades.

- ❖ Se espera que el futuro el encapsulamiento de embrioides podrá ser usado como semilla artificial, lo que en gran medida simplificará la transferencia de los propágulos de *in vitro* al campo.
- ❖ Otra ventaja es desarrollar un protocolo eficiente para la regeneración rápida de plántulas que puedan ser usadas en explantes de transformación genética.

3. CULTIVO DE MICROESTACAS

La micropropagación por microestacas consiste en estimular con la ayuda de reguladores de crecimiento, el desarrollo de las yemas axilares, que normalmente están dormantes por la dominancia apical. El sub cultivo de estos explantes permite la producción de brotes de forma exponencial (Dirr y Heuser, 1987). Sin embargo, la esterilización de los explantes es una de las principales dificultades, especialmente cuando el material vegetativo es colectado de arboles maduros del bosque (Meier-Dinkel, 1992).

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

a. Asepsia del material vegetal y establecimiento de cultivo

El primer paso en la microporpagación es la obtención de material vegetal adecuado para usarlo como explantes, por esta razón los contaminante, como bacterias y hongos deben ser removidos (Conger, 1981). Sin embargo, en especies leñosas las tasas de contaminación son mayores cuando el material proveniente de arboles que creciendo en el campo. El grado de contaminación también está determinado por las condiciones climáticas de la región; es más difícil obtener explantes limpios de plantas del trópico húmedo que de las regiones frías o secas (Bonga y Von Anderkas, 1992).

En muchos casos, bacterias y hongos pueden permanecer latentes dentro de las plantas debido a su habilidad para formar esporas dormantes, ante esta situación se han realizado algunas prácticas para reducir la actividad de contaminantes internos, como son las aplicaciones de antibióticos antes de extracción de los explantes los cuales tienen diferentes grados de acción (Mondal *et al.*, 1990).

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

Una vez lograda la asepsia de explantes nodales, el establecimiento del cultivo primario depende de la reactividad de la yema a desarrollarse y del ambiente químico y físico del cultivo *in vitro*. Segmentos nodales de plantas de campo, de plántulas invernadero y de embriones germinados *in vitro*, son colocados sobre medios que estimulen la emergencia de las yemas axilares.

b. Fase de multiplicación

Los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir otros brotes mediante la repetición de ciclos de cultivo o bien mediante la inducción de brotes de novo u organogénesis. La multiplicación clonal ha sido aplicada a una gran variedad de especies, desde herbáceas hasta leñosas (Krikorian, 1991). Durante la fase de multiplicación, las citoquininas son los reguladores del crecimiento más utilizados. Además de la influencia de las citoquininas existen otros factores que afectan la multiplicación *in vitro*. La posición del explante sobre la superficie del medio de cultivo constituye otro factor.

D. Fase de enraizamiento y aclimatación

1. ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*

La fase de enraizamiento tiene como objetivo producir plántulas que puedan sobrevivir a las condiciones de trasplantes (Krikorian, 1991). El enraizamiento de los brotes es con frecuencia inducido *in vitro* y tiene la ventaja de obtener

plántulas asépticas con mayor probabilidad de sobrevivir al ambiente *ex vitro*. Sin embargo, es una labor más intensa que la realizada durante el enraizamiento *ex vitro* (Bonga y Von Anderkas, 1992).

Existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento *in vitro*. El estrés hídrico, la alta temperatura, la oxigenación, la baja intensidad de luz y el suelo de carbón activado son factores físicos que estimulan el enraizamiento. La influencia positiva del carbón activado en el enraizamiento de micro estacas, puede ser interpretada por su defecto en la reducción de la luz en la base de los brotes, promoviendo en un sentido la acumulación de auxinas o cofactores foto sensitivos y en otro sentido la absorción de productos tóxicos (poli fenoles) y de inhibidores de formación de raíces adventicias. Sin embargo hay que considerar que el potencial del carbón activado como inductor de enraizamiento está asociado con la madurez del explante.

Un ambiente químico favorable al desarrollo de raíces puede lograrse mediante la reducción en la concentración de sales minerales del medio de cultivo, o bien, mediante el incremento de ciertos elementos menores (Br, Ca, y Mn) o por adición de algunos fenoles y de vitamina D (Gaspar y Coumans, citados por Bonga y Von Anderkas, 1992). En algunos casos, es necesario el uso de un medio para el desarrollo del brote ante del enraizamiento; así mismo se requiere un balance hormonal adecuado dirigido al aumento en auxinas exógenas (Villalobos y Thorpe, 1991).

2. ENRAIZAMIENTO *EX VITRO*

Algunas veces la inducción de raíces es realizada *ex vitro*, lo cual reduce los pasos en la micropropagación (Mascarenhas *et al.*, 1993). Esto trae como ventajas que el sistema radicular no es afectado durante el trasplante al suelo, la tasas de enraizamiento pueden ser mayores y la calidad de las raíces pueden ser superior (Lakshmi Sita, 1993).

En la propagación a gran escala de especie ornamentales se ha observado que la diferenciación del sistema radical bajo condiciones *in vitro*, no es económicamente

costeable, por lo que en algunas empresas se ha sustituido esta fase del proceso por el enraizamiento de brotes en cámaras de humidificación.

3. ACLIMATACIÓN

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

La aclimatación es un proceso de adaptación de un organismo a un cambio de ambiente (Brainerd y Fuchigami, 1981). Según Bonga y Von Anderkas (1992), las plantas micropropagadas generalmente son susceptibles al trasplante debido a que en condiciones *in vitro*, ellas son mixotróficas en su modo de nutrición, aparentemente altera el uso de carbohidratos y la fijación de CO₂.

4. MICROPROPAGACIÓN DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

Se hace esfuerzos para propagar especies maderables tropicales de interés mundial como ***Swietenia macrophylla* King**. Conocida como la caoba (Mesén et al., 1992) de la que muy poco se conoce.

E. Biotecnología y su aplicación al manejo de especies forestales

a. LA CRIOCONSERVACIÓN Y EL ALMACENAMIENTO *IN VITRO*

Esta técnica podría tener alguna aplicación práctica como estrategia complementaria de conservación, pero solo en caso de poblaciones bien estudiadas recalcitrantes (Haines, 1994). La crioconservación es aplicable principalmente en los programas de mejoramiento que se estén implementando, sin embargo, requiere mucha más atención como un método para arrestar la fase juvenil y de esta forma poder tener ganancias genéticas que nos ofrece la

silvicultura clonal. Además, con el énfasis continuo en los programas cooperativos de mejoramiento de las especies forestales en los países tropicales, el intercambio internacional de materiales será cada vez mas importante, a medida que los programas de mejoramiento y de conservación de los programas de recursos fitogenéticos forestales avancen (Haines, 1994).

b. INGENIERÍA GENÉTICA

El éxito de la aplicación de la ingeniería genética involucra muchos elementos: la identificación y clonación de gen de interés; la adición de secuencias de este gen que promueve su expresión apropiada, la incorporación de un gen marcador o de selección; la transferencia a un tejido competente, para la transformación y regeneración (Haines y Martin, 1995). En la actualidad, se están desarrollando varios proyectos con especies de árboles forestales, y la transformación de una nueva especie con genes extraños actualmente disponibles que inducen la resistencia a insectos o herbicidas dependerá de la capacidad de regeneración de plantas completas, a partir de las células transformadas (Haines, 1995).

c. FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Los protoplastos son adecuados para diferentes manipulaciones genéticas que no serían posibles con plantas o células intactas debido a que son componentes vivos de las células vegetales que están rodeados solo por la ventana plasmática (Szabados, 1991) y los híbridos de especies forestales con incompatibilidad sexual podrían ser de gran importancia en las plantaciones de especies industriales (Haines y Martin, 1995). Estos trabajos de investigación permiten regenerar plantas a partir de protoplastos provenientes de suspensiones celulares.

d. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares tienen aplicaciones importantes en la investigación relacionada con los programas avanzados de mejoramiento de las especies industriales, para el mantenimiento de estructuras de poblaciones y donde

además puedan aplicarse las técnicas de silvicultura clonal (Haines, 1994). En Meliáceas, se están realizando algunos estudios en poblaciones naturales, con el objetivo de caracterizar la diversidad genética (Patiño, 1997).

III. MATERIALES Y METODOS

A. Localización del proyecto

La presente investigación se la realizó en el Laboratorio de Biotecnología, situado en los predios centrales del Campus Manuel Haz Alvares de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en la Av. Quito en el Km 1.5 en la vía Quevedo- Santo Domingo de los Tsáchilas.

B. Materiales

1. MATERIAL VEGETATIVO

Se utilizaron yemas terminales de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), extraídas de plantas de seis meses de edad, las cuales fueron recolectadas en la Estación Experimental Boliche del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuaria del Ecuador (INIAP), ubicado en la Provincia del Guayas.

2. EQUIPOS

Agitador calentador magnético

Autoclave

Balanza

Cámara de flujo laminar

Cámara fotográfica

Destilador de agua

Peachímetro

Potenciómetro

Refrigerador grande

3. MATERIALES DE LABORATORIO

Agua destilada
Bisturí
Cajas petri
Frasco de vidrio
Guantes
Mascarilla
Mechero
Pinza
Pipetas
Tijeras
Tubos de ensayo
Vasos de precipitación

4. REACTIVOS

Ácido Clorhídrico
Ácido Indolbutírico (AIB)
Acido Naftaleno Acético (ANA)
Alcohol
Agar
Bencilaminopurina (BAP)
Fuentes de Hierro
Fungicida (Agrimicin y benlate)
Hidróxido de Sodio
Hipoclorito de Calcio
L- cysteina
Macronutrientes
Micronutrientes
Tween 80
Vitaminas

C. Metodología

En la presente investigación se utilizó la metodología de micropropagación propuesta por Cruz (2001), basada en propagación *in vitro* con modificaciones, la cual consistió en utilizar yemas terminales jóvenes de tres semanas de edad, previamente seleccionados por sus características fenológicas.

La investigación se realizó en tres fases experimentales:

1. Fase de establecimiento
2. Fase de multiplicación
3. Fase de enraizamiento

1. FASE DE ESTABLECIMIENTO

Las plántulas mantenidas en invernadero fueron fumigadas dos veces por semana con una mezcla de Agrimicin y Benlate (estreptomicina y benomil, respectivamente) 1 g L^{-1} de cada uno, para asegurar una mayor sanidad de los materiales.

Se utilizaron cuatro frascos con 100 cc de agua cada uno, en el primero se colocó las yemas que fueron cortadas en el invernadero para evitar deshidratación, las mismas fueron pasadas al segundo frasco con 100 cc agua destilada más dos gotas de Tween 80, y luego fueron enjuagadas con agua destilada estéril y colocadas en el tercer frasco con el hipoclorito de calcio, a diferentes concentraciones, dependiendo del tratamiento correspondiente.

Se realizó tres enjuagues con agua esterilizada consecutivamente, en el cuarto frasco que contenía Gentamicina a una concentración de 20 mg, se colocaron los explantes durante 20 minutos, esta última desinfección se realizó dentro de la cámara de flujo laminar para que haya menor contaminación, posteriormente se colocaron las plántulas sobre una caja petri, en cuyo interior se colocó con anterioridad una papel absorbente, para eliminar el exceso de agua, luego se eliminó con el bisturí 0.1 cm las partes terminales y basales de las yemas, para

después ser colocadas dentro del tubo de ensayo con el medio de cultivo respectivo, durante 21 días.

Esta metodología utilizada en la investigación fue la que utilizó (Abdelnour *et al.*, 2004), pero modificada, la cual consistió en utilizar bajas concentraciones de hipoclorito de calcio.

2. FASE DE MULTIPLICACIÓN

Una vez transcurridos los 21 días se procedió al trasplante de aquellos explantes que no presentaron contaminación microbiana, lo cual se realizó dentro de la cámara de flujo laminar para lograr el desarrollo de brotes de caoba, los tubos de ensayo se colocaron en el cuarto de crecimiento, bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, con lámparas fluorescentes de 20 y 40 Watts.

Cabe señalar que, en esta fase de la investigación se utilizaron concentraciones de Citoquinina y auxina, (Gupta *et al.*, 1980 y Nadguada *et al.*, 1997), con modificaciones.

3. FASE DE ENRAIZAMIENTO

Para el enraizamiento *in vitro*, los brotes producidos durante la multiplicación (brote apical más dos nudos) fueron transferidos al medio de cultivo básico fresco, con la concentración de sales reducida a la mitad (MS/2), y complementada con Acido indolbutirico (AIB).

Los materiales del Laboratorio que se emplearon para la propagación *in vitro* de caoba fueron esterilizados en el autoclave All American a una temperatura de 121° C por 15 min y el agua destilada a 121° C por 20 min. La inoculación y las transferencias de las yemas terminales de caoba se lo realizaron en la cámara de flujo laminar, la misma que fue desinfectada con alcohol al 70% y con luz ultravioleta durante 20 min. El medio de cultivo usado fue un MS (Murashige y Skoog, 1962), el cuál fue esterilizado con vitrofural a 0.116 mg L⁻¹ dejando en la zona de almacenamiento en forma hermética durante 48 horas para luego ser

utilizado en sus distintas fases. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7, antes de ser esterilizado.

D. Tratamientos

La presente investigación está orientada a determinar las condiciones para la propagación *in vitro*. Para la cual se formularon los siguientes tratamientos:

1. FASE DE ESTABLECIMIENTO

Se examinaron diferentes tipos de concentraciones de Hipoclorito de Calcio a distintos tiempos para medir el nivel de eficacia en la desinfección de los explantes.

Se usaron 2 gotas de Tween en 100cc de agua destilada por 2 min y diferentes dosificaciones de hipoclorito de calcio (10 y 15 g) en 100 cc de agua destilada en inmersión a distintos tiempos (10, 15, 20 min), seguido de tres enjuagues del material vegetal con agua esterilizada. Inmediatamente fueron sumergidos en una concentración de Gentamicina durante 20 min, en la cámara de flujo laminar con el fin de reducir la contaminación para finalmente ser sembrados en tubos de ensayo en un medio de cultivo simple (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Factores y niveles utilizados en el experimento durante la fase de establecimiento.

Factor		Niveles
A	Hipoclorito de calcio	10 g de hipoclorito de calcio
		15 g hipoclorito de calcio
B	Tiempo de Exposición	10 minutos
		15 minutos
		20 minutos

Cuadro 1. Combinaciones y Tratamientos utilizados del experimento durante la fase de establecimiento.

Tratamientos	Combinación Factor (AxB)	Tratamientos
1	A ₁ B ₁	10 g hipoclorito de calcio por 10 min
2	A ₁ B ₂	10 g hipoclorito de calcio por 15 min
3	A ₁ B ₃	10 g hipoclorito de calcio por 20 min
4	A ₂ B ₁	15 g hipoclorito de calcio por 10 min
5	A ₂ B ₂	15 g hipoclorito de calcio por 15 min
6	A ₂ B ₃	15 g hipoclorito de calcio por 20 min

2. FASE DE MULTIPLICACIÓN

Esta fase consistió en determinar la capacidad de producción de brotes del explante, para lo cual se evaluó la mejor concentración de citoquininas (1, 2 y 3 mg) y auxinas (0.5 y 1 mg) a utilizar en el período de multiplicación. Para ello se tomaron vitroplantas de 1 a 2 cm de tamaño procedentes del período de establecimiento con una edad de tres a cuatro semanas, las cuales fueron transferidas a un medio de cultivo con diferentes concentraciones de hormona de crecimiento, Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolbutirico (AIB), en tubos de ensayo durante 21 días a una temperatura entre 23 - 25° C (Cuadro 3 y 4).

Para esta fase se utilizó el medio propuesto por Murashige & Skoog (1962), con los nitratos al 50 % de la concentración de las sales mas 20 g sacarosa, 3.5 g L⁻¹ agar, 1 ml de gentamicina, vitrofural 0.116 g L⁻¹ y el pH 5,7 antes de su solidificación.

Cuadro 3. Factores y niveles utilizados en el experimento durante la fase de multiplicación.

Factor		Niveles
A	Bencilaminopurina (BAP)	1 mg L ⁻¹ (BAP)
		2 mg L ⁻¹ (BAP)
		3 mg L ⁻¹ (BAP)
B	Ácido Indolbutirico (AIB)	0.5 mg L ⁻¹ (AIB)
		1 mg L ⁻¹ (AIB)

Cuadro 4. Combinaciones y Tratamientos utilizados del experimento durante la fase de multiplicación.

Tratamientos	Combinación Factor (AxB)	Tratamientos
1	A ₁ B ₁	1 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ AIB
2	A ₁ B ₂	1 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ AIB
3	A ₂ B ₁	2 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ AIB
4	A ₂ B ₂	2 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ AIB
5	A ₃ B ₁	3 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ AIB
6	A ₃ B ₂	3 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ AIB

3. FASE DE ENRAIZAMIENTO

El enraizamiento *in vitro* fue evaluados utilizando los brotes con una altura de 3 cm, después de haber permanecido 21 días los mejores explantes en la fase de multiplicación de brotes en un hábitat adecuado, las mejores vitroplantas fueron transferidos para su desarrollo de callos y posterior a su enraizamiento a un medio que contienen una hormona de enraizamiento, Ácido Indolbutirico (AIB) que se encuentran en tubos de ensayo cerrado herméticamente, para luego ser evaluado a los 21 días de su establecimiento (Cuadro 5).

Para esta fase se utilizó el medio propuesto por Murashige & Skoog (1962), con los nitratos al 50% de la concentración de las sales mas 10 g sacarosa, 3.5 g L⁻¹ agar, vitrofural 0.116 g L⁻¹ y el pH 5,7 antes de su solidificación.

Cuadro 5. Concentración hormonal de los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento.

Tratamientos	Concentración hormonal
1	1 mg L ⁻¹ AIB
2	1.5 mg L ⁻¹ AIB
3	2 mg L ⁻¹ AIB
4	2.5 mg L ⁻¹ AIB

E. Diseño experimental

1. FASE DE ESTABLECIMIENTO

En la fase de establecimiento se realizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x3 con 4 repeticiones y 5 observaciones por unidad experimental completando un total de 120 unidades experimentales. La obtención del análisis de varianza y separación de medias al 95% de probabilidad se realizó mediante el programa estadístico MSTAC.

Cuadro 6. Esquema del análisis de varianza de la fase de establecimiento

Fuente de variación	Grados de libertad	
Factor a	a-1	1
Factor b	b-1	2
Ab	(a-1) (b-1)	2
Error	(ab) (r-1)	18
Total	rt – 1	23

Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($P \geq 0,05$). Los datos con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula:

$$\sqrt{x + 0,5}$$

2. FASE DE MULTIPLICACIÓN

En la fase de multiplicación se realizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2 con 4 repeticiones y 5 observaciones por unidad experimental completando un total de 120 unidades experimentales. La obtención del análisis de varianza y separación de medias al 95% de probabilidad se realizó con ayuda del programa estadístico MSTAC.

Cuadro 7. Esquema del análisis de varianza de la fase de multiplicación

Fuente de variación	Grados de libertad	
Factor a	a-1	2
Factor b	b-1	1
Ab	(a-1) (b-1)	2
Error	(ab) (r-1)	18
Total	rt – 1	23

Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($P \geq 0,05$). Los datos con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula:

$$\sqrt{x + 0,5}$$

4. FASE DE ENRAIZAMIENTO

En esta fase de enraizamiento se utilizó, un diseño completamente al azar (DCA) con 4 tratamientos y 4 repeticiones y 5 observaciones por unidad experimental. La obtención del análisis de varianza y separación de medias al 95% de probabilidad se realizó con el programa estadístico MSTAC.

Cuadro 8. Esquema del análisis de varianza de la fase de enraizamiento

Fuente de variación	Grados de libertad	
Tratamiento	t-1	3
Error	t(r-1)	12
Total	rt – 1	15

Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($P \geq 0,05$). Los datos con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula:

$$\sqrt{x + 0,5}$$

F. Mediciones experimentales

1. FASE DE ESTABLECIMIENTO

a. Explantes contaminados

La evaluación de los explantes contaminados se realizó mediante la observación directa a los 21 días, de haber establecido el experimento.

b. Explantes quemados

El número de explantes quemados se registró mediante la observación periódica de los explantes cada semana hasta los 21 días, de establecido el ensayo.

c. Explantes vivos

Los explantes vivos se evaluaron a los 21 días del establecimiento.

2. FASE DE MULTIPLICACIÓN

a. Explantes Contaminados

En esta variable se evaluó la contaminación por hongos y bacterias, a los 21 días de establecidos los explantes en el medio de multiplicación, mediante observación directa.

b. Explantes quemados

Se evaluaron los brotes que adquirieron una coloración café, a los 21 días de haber sido establecido el ensayo.

c. Explantes vivos

Se determinó a los 21 días después de haber sido transferido los brotes en el medio de multiplicación.

d. Números de brotes por explante

El registro del número de brotes por explante, se realizó a los 21 días, cuantificando la cantidad de brotes por cada vitroplanta.

e. Longitud de los brotes

Se utilizó una regla graduada en centímetros con aproximaciones al milímetro para medir la longitud de los brotes, este fue evaluado a los 21 días de establecido el ensayo.

3. FASE DE ENRAIZAMIENTO

a. Explantes contaminados

Después que permanecieron 21 días los mejores explantes en el medio de enraizamiento derivamos a evaluar visualmente tanto la contaminación por hongos y bacterias,

b. Explantes quemados

Esto se lo realizó a través de la observación visual de los explantes que presentan un café oscuro, posterior a los 21 días de estar en el medio de enraizamiento.

c. Número de raíces

Esto se lo realizó mediante la observación directa en cada uno de los explantes, considerando la existencia de cada una de ellas.

d. Longitud de raíces

Se utilizó una regla graduada en centímetros con aproximaciones al milímetro, tomando la longitud desde la base del explante hasta el término de la raíz apical.

e. Números de brotes por explante

El registro del número de brotes se lo realizó de forma visual a los 21 días después de haber permanecido en el medio de enraizamiento.

f. Longitud de brotes

Posteriormente que han permanecieron 21 días en el medio de enraizamiento se procedió a medir con una regla graduada en centímetros con aproximaciones al milímetro.

g. Explantes vivos

Los explantes vivos se evaluaron a los 21 días del establecimiento.

IV. RESULTADOS

En base al análisis realizado en los experimentos de la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados:

A. Fase de establecimiento

1. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE CONTAMINACIÓN POR BACTERIA EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

En el efecto simple del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ en la variable contaminación por bacteria, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, alcanzando el promedio más alto de contaminación cuando se utilizó la concentración de 10 g y el más bajo a 15 g de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (Cuadro 9).

b. Tiempo de exposición

Para el efecto simple del tiempo de exposición en la variable contaminación por bacteria, no existió diferencia significativa en ningún nivel evaluado, los promedios se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y tiempo de exposición en la variable contaminación por bacteria en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días de establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Contaminación por Bacteria
A1. Hipoclorito de calcio 10 g	0.317 a
A2. Hipoclorito de calcio 15 g	0.150 b
B1. Tiempo de exposición 10 min	0.325 a
B2. Tiempo de exposición 15 min	0.175 a
B3. Tiempo de exposición 20 min	0.200 a
CV. %	12.07

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

La interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición no mostraron diferencias significativa, a los 21 días establecido el experimento. El coeficiente de variación fue 12,07% (Anexo 1).

2. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE CONTAMINACIÓN POR HONGOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

En el efecto simple del hipoclorito de calcio para la variable contaminación por hongos, se hallaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos utilizados, obteniendo el promedio más alto de contaminación en la concentración de 10 g y el más bajo a 15 g $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. (Cuadro 10).

b. Tiempo de exposición

Para el efecto simple del tiempo de exposición en la variable contaminación por hongos, existió diferencias significativas para los niveles evaluados, siendo el promedio más alto a los 15 y 10 minutos de exposición respectivamente y el más bajo a los 20 minutos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y tiempo de exposición en la variable contaminación por hongos en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Contaminación por Hongos
A1. Hipoclorito de calcio 10 g	0.417 a
A2. Hipoclorito de calcio 15 g	0.083 b
B1. Tiempo de exposición 10 min	0.225 a
B2. Tiempo de exposición 15 min	0.400 a
B3. Tiempo de exposición 20 min	0.125 b
CV. %	10.07

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición se mostraron diferencias significativa, a los 21 días de establecido el experimento. El mejor promedio se lo observó en el Tratamiento T6 (10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ en un tiempo de 20 min). El coeficiente de variación fue 10,07% (Anexo 2).

3. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE QUEMADOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

Para el efecto simple del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ en la variable contaminación por quemados no hubo diferencias significativas para los niveles evaluados, (Cuadro11).

b. Tiempo de exposición

Para el efecto simple del tiempo de exposición en la variable contaminación por quemados no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y tiempo de exposición en la variable Quemados en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Contaminación por Quemados
A1. Hipoclorito de calcio 10g	0.050 a
A2. Hipoclorito de calcio 15g	0.083 a
B1. Tiempo de exposición 10min	0.050 a
B2. Tiempo de exposición 15min	0.100 a
B3. Tiempo de exposición 20min	0.050 a
CV. %	8.20

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición existió diferencia significativa, obteniendo en el tratamiento 5 el promedio más alto 0.2% (10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ en un tiempo de 15 min). En los niveles evaluados, a los 21 días establecido el experimento. El coeficiente de variación fue 8.20% (Anexo 3).

4. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE VIVOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

Para el efecto simple de esta variable, se hallaron diferencias altamente significativas entre los niveles utilizados, alcanzando el promedio más alto de sobrevivencia cuando se utilizó la concentración de 15 g y el más bajo a 10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (Cuadro 12).

b. Tiempo de exposición

Para el efecto simple del tiempo de exposición en la variable vivos no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y tiempo de exposición en la variable vivos en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Vivos
A1. Hipoclorito de calcio 10 g	0.217 a
A2. Hipoclorito de calcio 15 g	0.617 b
B1. Tiempo de exposición 10 min	0.350 a
B2. Tiempo de exposición 15 min	0.300 a
B3. Tiempo de exposición 20 min	0.600 a
CV. %	13.26

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición se mostraron diferencia significativa, a los 21 días establecido el experimento. El promedio más alto en esta variable fue el tratamiento T6 (15 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 20 min), donde se obtuvo la mayor cantidad de explantes vivos y el más bajo fue el tratamiento T2 (10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 15 min). El coeficiente de variación fue 13,26% (Anexo 4).

5. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE NÚMERO DE BROTES EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

Para el efecto simple del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ en la variable numero de brotes, se encontraron diferencias significativas entre los niveles evaluados, alcanzando el promedio más alto de inducción de brotes cuando se utilizó

la concentración de 15 g y la más baja cuando se utilizó 10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (Cuadro 13).

b. Tiempo de exposición

Para el efecto simple del tiempo de exposición en la variable número de brotes no hubo diferencia significativas para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y tiempo de exposición en la variable número de brotes en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Número de Brote
A1. Hipoclorito de calcio 10 g	0.300 b
A2. Hipoclorito de calcio 15 g	0.533 a
B1. Tiempo de exposición 10 min	0.500 a
B2. Tiempo de exposición 15 min	0.300 a
B3. Tiempo de exposición 20 min	0.450 a
CV. %	15.50

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición mostraron diferencia significativa, a los 21 días establecido el experimento. El mejor promedio se obtuvo en tratamiento T6 (15 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 20 min), donde obtuvo la mayor cantidad de explantes vivos y en menor promedio fue para el tratamiento T2 (10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 15 min). El coeficiente de variación fue 15.50% (Anexo 5).

6. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE LONGITUD DE BROTES EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

Para el efecto simple en la variable longitud de brotes, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, la concentración que logró el promedio más alto para el crecimiento de brotes fue de 15 g y la más baja se presentó a los 10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (Cuadro 14).

b. Tiempo de exposición

Para el efecto simple del tiempo de exposición en la variable longitud de brotes no hubo diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y tiempo de exposición en la variable longitud de brotes en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Longitud de Brotes
A1. Hipoclorito de calcio 10g	0.057 b
A2. Hipoclorito de calcio 15g	0.133 a
B1. Tiempo de exposición 10min	0.115 a
B2. Tiempo de exposición 15min	0.087 a
B3. Tiempo de exposición 20min	0.082 a
CV. %	7.22

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de los factores hipoclorito de calcio por tiempo de exposición no se mostraron diferencia significativa, a los 21 días establecido el experimento. Un alto efecto obtuvo el tratamiento T5 (15 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 15 min), y en menor resultado lo obtuvo el T2 (10 g de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 15 min). El coeficiente de variación fue 7,22% (Anexo 6).

B. Fase de multiplicación

1. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE CONTAMINACIÓN POR BACTERIA EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Bencilaminopurina (BAP)

En el efecto de la concentración BAP en la variable contaminación por bacteria, no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 15.

b. Ácido indolbutírico (AIB)

Para el efecto la hormona AIB en la variable contaminación por bacteria existió diferencia significativa para los niveles evaluados, alcanzando los promedios más altos de contaminación la concentración 0.5 mg L^{-1} de AIB y el más bajo fue para 1 mg L^{-1} (Cuadro15).

Cuadro 15. Promedios del efecto simple de los factores, BAP y AIB en la variable contaminación por bacteria en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Contaminación por bacteria
A1. Bencilaminopurina (BAP) 1 mg	0.225 a
A2. Bencilaminopurina (BAP) 2 mg	0.100 a
A3. Bencilaminopurina (BAP) 3 mg	0.250 a
B1. Ácido Indolbutírico (AIB) 0.5 mg	0.283 a
B2. Ácido Indolbutírico (AIB) 1.0 mg	0.100 b
CV. %	12.78

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores BAP y AIB en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de los factores BAP y AIB no mostraron diferencia significativa, a los 21 días establecido el experimento. El coeficiente de variación fue 12,78% (Anexo 7).

2. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE CONTAMINACIÓN POR HONGOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Bencilaminopurina (BAP)

El efecto simple la concentración de BAP, variable contaminación por hongos no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 16.

b. Ácido Indolbutírico (AIB)

Para el efecto simple de la solución AIB, en la variable contaminación por hongos no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Promedios del efecto simple de los factores, BAP y AIB en la variable contaminación por hongos en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Contaminación por hongos
A1. Bencilaminopurina (BAP) 1 mg	0.400 a
A2. Bencilaminopurina (BAP) 2 mg	0.150 a
A3. Bencilaminopurina (BAP) 3 mg	0.475 a
B1. Ácido Indolbutírico (AIB) 0.5 mg	0.300 a
B2. Ácido Indolbutírico (AIB) 1.0 mg	0.383 a
CV. %	18.92

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores BAP y AIB en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

La interacción de las concentraciones de los factores hormonales de BAP y AIB no mostraron diferencias significativa, a los 21 días establecido el ensayo. El coeficiente de variación fue 18.92% (Anexo 8).

3. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE QUEMADOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Bencilaminopurina (BAP)

Para el efecto simple de la solución de BAP variable quemados no hubo diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 17.

b. Ácido indolbutirico (AIB)

Para el efecto simple de la concentración AIB en la variable quemados no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Promedios del efecto simple de los factores, BAP y AIB en la variable Quemados, en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Contaminación por quemados
A1. Bencilaminopurina (BAP) 1 mg	0.050 a
A2. Bencilaminopurina (BAP) 2 mg	0.075 a
A3. Bencilaminopurina (BAP) 3 mg	0.000 a
B1. Ácido Indolbutirico (AIB) 0.5 mg	0.033 a
B2. Ácido Indolbutirico (AIB) 1.0 mg	0.050 a
CV. %	7.49

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores BAP y AIB en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de las soluciones hormonales de BAP y AIB no mostraron diferencia significativa, en los niveles evaluados, a los 21 días establecido el ensayo. El coeficiente de variación fue 7.49% (Anexo 9).

4. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE VIVOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Bencilaminopurina (BAP)

En el efecto simple la concentración de BAP en la variable vivos no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 18.

b. Ácido Indolbutírico (AIB)

Para el efecto simple de la solución AIB en la variable vivos no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Promedios del efecto simple de los factores, BAP y AIB en la variable vivos en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Vivos
A1. Bencilaminopurina (BAP) 1 mg	0.350 a
A2. Bencilaminopurina (BAP) 2 mg	0.675 a
A3. Bencilaminopurina (BAP) 3 mg	0.400 a
B1. Ácido Indolbutírico (AIB) 0.5 mg	0.433 a
B2. Ácido Indolbutírico (AIB) 1.0 mg	0.517 a
CV. %	14.86

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores BAP y AIB en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de las concentraciones de las hormonas BAP y AIB no mostraron diferencia significativa, a los 21 días establecido el ensayo. El coeficiente de variación fue 14,86% (Anexo 10.)

5. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE NÚMERO DE BROTES EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba).

a. Bencilaminopurina (BAP)

El efecto simple de la concentración de BAP en la variable número de brotes, no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 19.

b. Ácido indolbutírico (AIB)

Para el efecto simple de la solución AIB en la variable número de brotes no hubo diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Promedios del efecto simple de los factores BAP y AIB en la variable número de brotes en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Número de brotes
A1. Bencilaminopurina (BAP) 1 mg	0.375 a
A2. Bencilaminopurina (BAP) 2 mg	0.675 a
A3. Bencilaminopurina (BAP) 3 mg	0.425 a
B1. Ácido Indolbutírico (AIB) 0.5 mg	0.467 a
B2. Ácido Indolbutírico (AIB) 1.0 mg	0.517 a
CV. %	15.81

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores BAP y AIB en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de las concentraciones de las hormonas BAP y AIB no mostraron diferencia significativa, a los 21 días establecido el ensayo (Anexo 11).

6. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE LONGITUD DE BROTES EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

a. Bencilaminopurina (BAP)

Para el efecto simple de la acción de la hormona BAP en variable longitud de brotes no hubo diferencia significativa, para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 20.

b. Ácido Indolbutirico (AIB)

Para el efecto simple de la concentración de AIB en la variable longitud de brotes no existió diferencia significativa para los niveles evaluados, los promedios se muestran en el Cuadro 20.

Cuadro 20. Promedios del efecto simple de los factores, BAP y AIB en la variable longitud de brotes, en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba), a los 21 días establecido el ensayo (UTEQ 2011).

Efecto simple	Longitud de brotes
A1. Bencilaminopurina (BAP) 1 mg	0.082 a
A2. Bencilaminopurina (BAP) 2 mg	0.120 a
A3. Bencilaminopurina (BAP) 3 mg	0.094 a
B1. Ácido Indolbutirico (AIB) 0.5 mg	0.96 a
B2. Ácido Indolbutirico (AIB) 1.0 mg	0.102 a
CV. %	7.85

* Promedio con letras iguales no presenta diferencias significativas según Tukey al 0,05% de probabilidad.

c. Interacción de los factores BAP y AIB en la Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En la interacción de las concentraciones de BAP y AIB no mostraron diferencia significativa. El coeficiente de variación fue 7,85% (Anexo 12).

C. Fase de Enraizamiento

1. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE CONTAMINACIÓN POR BACTERIA EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

En los resultados obtenidos de la varianza, en la variable contaminación por bacterias observamos que no existe diferencias significativas, entre los diferentes tratamientos, el coeficiente de variación fue 11,68% (Anexo 13).

2. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE CONTAMINACIÓN POR HONGOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

El análisis de varianza en la variable contaminación por hongos mostró en los resultados, que no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos bajo estudio. El coeficiente de variación fue 7.99 % (Anexo 14).

3. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE QUEMADOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

El análisis de varianza para la variable quemados no existieron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos. El coeficiente de variación fue 12.02 % (Anexo 15).

4. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE VIVOS EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

Para esta variable se obtuvo mediante el análisis de varianza que en ninguno de los tratamientos no existieron diferencias estadísticas alguna. El coeficiente de variación fue 13.50 % (Anexo 16).

5. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE NÚMERO DE BROTES EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba).

Después de haber realizado los estudios respectivos de varianza se determinó que no existieron diferencias estadísticas en ninguno de los tratamientos bajo estudio, el coeficiente de variación fue 20.16 % (Anexo 17).

6. EFECTO SIMPLE DE LA VARIABLE LONGITUD DE BROTES EN LA PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (Caoba)

De los resultados obtenidos del análisis de la varianza en la variable longitud de brotes observamos que no existen diferencias entre las concentraciones. El coeficiente de variación fue 15.44 % (Anexo 18).

D. Análisis Económico

Se dedujo los costos de aplicación de cada tratamiento sumando los valores de los medios de cultivo, de las hormonas, insumos fitosanitarios, mano de obra, agua, explantes, suministros, materiales indirectos y gastos administrativos (Anexo 20).

V. DISCUSIÓN

La especie ***Swietenia macrophylla* King** (Caoba), es muy apreciada principalmente por su alto valor económico que posee ya que es una especie de madera dura, vetada y de buen acabado en la construcción, también su corteza y semillas se usan en el campo medicinal esto hace que sea una especie muy requerida por los madereros y su explotación masiva a hecho que se encuentre actualmente en peligro de extinción. Por tal motivo se procedió a establecer una metodología que permita aumentar el número de propágulos vegetativos.

La propagación *in vitro* es una técnica que permite obtener plantas a partir de un pequeño trozo de tejido que es cultivado *in vitro*, en condiciones estériles con la utilización de tubos de ensayo hasta la finalización del proceso (INTA, 2003). La mayor dificultad para el establecimiento de un protocolo de micropropagación radica en la edad del cultivo del cual se tomarán los explantes para el establecimiento *in vitro*, por ello es necesario realizar trabajos de rejuvenecimiento antes de su introducción. La caoba es una especie que ha sido muy poco trabajada mediante las técnicas de cultivo de tejidos, por ello no se encuentran muchas referencias sobre el tema (Collado *et al.*, 2004).

El éxito en la propagación de una especie dependerá de lograr la expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. Para lograrlo, debe inducirse primero la dediferenciación y luego la rediferenciación celular (Revista de biotecnología, 2011). La biotecnología es una herramienta bien justificada para la propagación y la conservación de especies e individuos elites seleccionada.

El diseño de un protocolo de micropropagación efectivo, pasa por la optimización de cada una de las fases de la propagación *in vitro*, desde el cultivo de las plantas madre en el invernadero hasta la producción de plantas adaptadas al entorno ambiental.

A. Fase de establecimiento.

Uno de los primordiales problemas del establecimiento *in vitro* de especies leñosas, es la contaminación microbiana de los explantes provenientes del invernadero, en la ***Swietenia macrophylla* King**, se observó que el hipoclorito de calcio, en las concentraciones evaluadas, fue efectivo para obtener el establecimiento de los materiales bajo las condiciones del cultivo de tejidos. Esto concuerda con lo expresado por Flores *et al.*, citado por García (1995), quien menciona que el hipoclorito de calcio se utiliza en el establecimiento *in vitro* por la acción germicida del cloro, ya que forma ácido hipocloroso cuando se mezcla con el agua, el oxígeno liberado en esta reacción es un agente oxidante muy fuerte y los microorganismos son destruidos por su acción sobre los componentes celulares. Además, el cloro puede combinarse con enzimas y otras proteínas de la membrana celular inactivándolas.

Los resultados más altos en caoba se obtuvieron con el tratamiento 6 (15 g de hipoclorito de calcio durante 20 min) donde se logró obtener un promedio sobrevivencia del 95 %. Siendo superiores a los obtenidos por Flores (2009), que para la desinfección de explantes de higo utilizó hipoclorito de calcio al 4% durante 10 minutos de producto comercial con un promedio de 31.67 % de explantes vivos.

Esto demuestra que el uso de hipoclorito de calcio a mayor concentración y mayor tiempo, puede controlar este tipo de microorganismos, al menos durante los 21 días que permanecieron en el medio de cultivo inicial. Esto concuerda con lo hallado por Abdelnour y Muñoz (2005), quienes en su investigación realizada en ***Tectona grandis*** (teca) manifiestan que el Hipoclorito de calcio es efectivo para obtener el establecimiento de los materiales bajo las condiciones del cultivo de tejidos *in vitro*.

El hipoclorito de calcio es una de las sustancia comúnmente recomendadas para la desinfección superficial de materiales a introducir al cultivo *in vitro*. Es de fácil adquisición, bajo costo en el mercado y muy eficiente para este propósito, además tal como lo mencionan Abdelnour y Muñoz (2005), el uso de este

componente y la agitación durante el periodo de esterilización rompe la tensión superficial del agua, permitiendo un mayor contacto del material vegetal con el desinfectante y por ende, mayor eficiencia del producto durante el proceso de desinfección.

B. Fase de multiplicación

En la etapa de multiplicación *in vitro*, se constató la presencia de hongos patógenos, luego de ser transferidos a los respectivos medios de cultivo vegetales, los nuevos medios enriquecidos con hormonas son una excelente fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos, tal como sucede con los hongos cuya presencia trae como resultado, generalmente, un incremento en la mortalidad de los tejidos, reducción del coeficiente de multiplicación y del enraizamiento de la planta *in vitro* (M. Acosta *et al.*, 2009).

Diversos investigadores confirman que desde la fase inicial o preparatoria de la micropropagación hay que tomar las medidas necesarias para prevenir o eliminar la contaminación en el establecimiento *in vitro*. El empleo del Vitrofurul resultó efectivo para el control de contaminantes microbianos. Una vez obtenido los explantes libres de contaminantes, éstos fueron subcultivados en un Medio Simple (MS), suplementado con reguladores de crecimiento de acuerdo a cada tratamiento, para evaluar la respuesta a la proliferación de brotes de Caoba.

La aplicación de los reguladores del crecimiento al medio de cultivo va a depender del tipo de diferenciación que se desea obtener, Hurtado y Merino citado por Flores *et al.*, (2009) mencionan que para la estimulación de las yemas terminales en la etapa de micropropagación se emplea la Bencilaminopurina (BAP). Esta citoquinina, aplicada en bajas concentraciones, promueve no solo la división celular sino la brotación de yemas.

Este estudio mostró que al agregar al medio de cultivo 2 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP) y 1mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), se obtuvo una cantidad de brotes del 70 %. Siendo inferior a los datos obtenidos por Jiménez *et al.*, (2006) que estudió la influencia de combinaciones de BAP con AIB, y

demostró que al aplicar 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 1.0 mg L⁻¹ de AIB se alcanzó un 85% de brotación de los explantes. Con relación a esto Sanchez, (2004), comenta que el efecto inhibitorio de la elongación caulinar por un aumento en la concentración exógena de hormonas es diferencial para cada tipo de hormonas, con lo cual una reducción de los niveles, ya sea de auxina o citoquinina, tiene efectos distintos.

C. Fase de enraizamiento

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfirieron a un medio de cultivo con biorreguladores de crecimiento del tipo auxina.

Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2004). En esta investigación la auxina a emplear fue el ácido indolbutírico (AIB), ya que según (Salisbury y Ross citado por Flores *et al.*, 2009), es la más utilizada en la inducción radical. El AIB es activo pese a que se metaboliza con rapidez y al menos otro compuesto conjugado con un péptido. Se sugiere que la formación de un conjugado almacena al AIB y que su liberación gradual mantiene la concentración de este regulador en un nivel adecuado, especialmente en los estadios finales de la formación de la raíz.

Los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento a diferentes concentraciones (1, 1.5, 2 y 2.5 mg L⁻¹ AIB) inhibieron la formación de raíces, lo que concuerda con lo expresado por Bernal *et al.*, (2009) quienes trabajaron sobre la optimización del proceso de enraizamiento y a climatización de vitroplantas de ***Swietenia macrophylla* King** (caoba). Entre sus resultados puntuales menciona que la baja capacidad de enraizamiento se mostró con la auxina AIB, dado que fue inhibido completamente en las diferentes concentraciones utilizadas, sin embargo al utilizar a 3 mg L⁻¹ reportó respuesta rizogenética (13.33 %).

La respuesta *in vitro* en otras especies forestales como la teca, en la fase de enraizamiento se observó que el 18% de los explantes desarrollaron raíces. Al

incubar los brotes por 48 horas en el medio con la concentración de sales reducida a la mitad, pero con 2,5 mg/l de AIB (Abdelnour y Muñoz 2005).

D. Identificación de agentes patógenos

A pesar de que se han desarrollado protocolos para propagar un gran número de especies forestales por cultivo *in vitro*, la contaminación fúngica de los explantes constituye uno de los problemas fundamentales que limita su aplicación. El uso de fungicidas en el tratamiento de plantas donadoras durante la fase preparativa de la micropropagación es muy importante para prevenir o eliminar los hongos filamentosos saprofitos o parásitos causantes de contaminaciones durante la fase de establecimiento (Acosta *et al.*, 2009).

En tanto el avance de la propagación *in vitro* de Caoba se presencio el desarrollo de diversos hongos filamentosos en los diferentes tratamientos, los mismos que fueron identificados con la ayuda de claves taxonómicas (Barnett *et al.*, 1972) en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ. Uno de los hongos encontrados como contaminantes en el cultivo *in vitro* de caoba a nivel de género están: ***Curvularia***. Donde ***Curvularia*** se ha identificado con más frecuencia en el ensayo (Anexo 19).

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se logró el establecimiento *in vitro* de explantes de caoba vía organogénesis a partir de plantas seleccionadas del invernadero de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, mediante los siguientes pasos:

En la fase de establecimiento el mejor resultado se lo obtuvo en el tratamiento 6 (15g de Hipoclorito de Calcio por un tiempo de 20min), donde se obtuvo una sobrevivencia del 95 % de explantes vivos, observando poca contaminación por agentes patógenos. Por lo que se acepta la hipótesis planteada en esta investigación.

La mejor concentración para la fase de multiplicación se obtuvo en el tratamiento 3 (2mg de BAP y 1mg de AIB), siendo esta solución hormonal la que mostró un mayor número de brotes. Por lo que se acepta la hipótesis planteada en este estudio.

En los explantes semileñosos de caoba las dosis de AIB evaluadas no causaron efecto significativo sobre las variables analizadas. Por lo que no se acepta la hipótesis planteada en esta investigación,

B. Recomendaciones

Se recomienda utilizar en futuros trabajos la fase de establecimiento y multiplicación de Caoba.

Se recomienda probar nuevos protocolos para la fase de enraizamiento y de esta manera lograr la proliferación de raíces en esta especie.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A; Muñoz, A. 2005. Micropropagación de teca (***Tectona grandis* L.f**), Kurú, Revista Forestal C Rica, vol.2, p. 5.
- Acosta, M; Alvarado, Y; Cruz, M; Leiva, M; Sánchez, C; Roque, B; Quiala, E; Chávez, M; Jiménez, F; Barbón, R; Collado, R; Rodríguez, M; Fera, M; Borroto, I; Pérez, M. 2009. Micobiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales. Biotecnología Vegetal, Cu, vol, 9, no. 2, p. 99 – 103.
- Ahuja, M. 1993. Mricropropagation of wood plant. Nethelands. Kluwer Academic Publ. p. 1-4.
- Alvarenga, S; Flores, E. 1988. Morfología y germinación de la semilla de caoba ***Swietenia macrophylla* King** (Meliaceae). Rev. Biol. Trop. vol.36, no. 2ª, p. 261.
- Araujo, V. 1971. Sôbre a germinação do mogno (aguano) ***Swietenia macrophylla* King**. Acta Amazónica. vol. 1, no. 1, p. 59-69.
- ArgenBio. 2004. Cultivo *in vitro* de plantas y su relación con la Biotecnología. El Cuaderno de Por qué Biotecnología. vol. 35, Consultados el 2 Jul 2011. (En línea)
http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_35.asp?cuaderno=35.
- Bernal, J; Rojas, A; Hine, A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de ***Swietenia macrophylla* King** (Orden:Meliacea), Tecnología en Marcha, vol. 22, no. 3, p. 34-41.
- Bonga, M; Aderkas, P. 1992. *In vitro* culture of trees. Netherland, Kluwer Academic Publishers. Forestry Sciences, vol. 38, p. 236.
- Brainerd, K; Fuchigami, L. 1981. Aseptically cultured apple plants to low relative humidity. Amer, J. Universidad de Costa Rica. C Rica. Soc. Hort. Sci. vol, 104, no.4. p. 515-518.

- Burley, J. 1987. Applications of biotechnology in silviculture and development rural. Common. Merida Ve. For. Rev. vol. 66, no. 4, p. 357-367.
- Cheliak, W; Rogers, D. 1990. Integrating bio-technology into tree improvement programs. Michigan Technological University, Houghton, MI. USA. Can.J. For. Rev. vol. 20, p. 452-463.
- 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**, Universidad Central "Marta Abreu", Biotecnología Vegetal, Cu. vol. 4, no. 3, p. 16.
- Conger, B. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Florida, C Rica PRESS. p. 267.
- Cruz , N. 2001. Micropropagación clonal *in vitro* de ***Tectona grandis* L.** (Teca). Tesis Ingeniería Forestal. Quevedo, Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. p. 15-16.
- Dirr, M; Heurser, C. 1987. The reference manual of woody plant propagation. From seed to tissue culture, Georgia Varsity Press. P 63-78
- Durand-Cresswell, R; Boulay, M; Franclet, A. 1982. Vegetative propagation of Eucalyptus. In Bonga, J; Duzan, D. Tissue culture in forestry. Netherland Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. Serie For Science. p. 36-71.
- FAO 1997. (Food and Agriculture Organization). State of the World's Forests FAO, Roma, It. vol. 96, p. 149.
- Flores, M; Jiménez, V; Chacón, R. 2009. Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas, Rev For. Agronomía Mesoamericana vol, 20, no,2, p. 319-325.
- Franclet, A, 1979. Rajeunissement des ar-bres adultes en vue de leur propagation vegetative. Eludes et Recherches, vol. 12, p. 3-18.
- Galetti, M. 2003. Mejoramiento y Genética Forestal. (En línea). Disponible en: http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/forest/forest_genetica.htm. Consultado Jul 2011.

- Geilfus, F. 1994. El árbol al servicio del agricultor manual de agroforestería para el desarrollo rural. Turrialba, San José. C Rica. ENDA-CARIBE, CATIE. vol. 1, Principios y Técnicas. p. 414, 415.
- Greenwood, M. 1987. Plant Growth Regulation. Rejuvenation of forest trees. Netherland, Kluwer Academic Publishers. vol. 6, p. 1-9.
- Grogan, J; Ashton, M; Galvao, J. 2003. Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedling survival and growth across a topographic gradient in southeast. Pará, Br. Forest Ecology and Management. p. 186, 311, 326.
- Guevara, R. 1996. Estrategias integradas de abastecimiento de semillas forestales. Boletín Mejoramiento Genético y Semillas Forestales (PROSEFOR) C R vol. 14, p. 2.
- Haines, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvemet. With special reference to developing countries. FAO Foretry Paper N°118. p. 230.
- ; Martin, B. 1995. Biotechnology and the sustainable production of tropical timber. International tropical. Timber Organization (ITTO). p. 168.
- Hammatt, N; Ridout, M. 1992. Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. vol. 13, p. 67-74.
- Hartney, V. 1980. Vegetative propagation of the Eucalyptus. Aust. For. Res. vol 10, p. 191, 221.
- Hernandez, A. 1960. Condiciones ecológicas de la caoba (*Swietenia macrophylla*), en las selvas de la península de Yucatán. Revista de Chapingo. México Df. vol. 82, p. 169.
- Jimenez, H; Alpizar, E; Ledezma, J; Tosi, J; Bolanos, R; Solórzano, R; Echeverría, J; Onorio, P; Castillo, M; Macilla, R. 1996. Estudio sobre el estado de regeneración natural de ***Swietenia macrophylla* King** "Mara" en Santa Cruz, Bol. World Wildlife Fund. p. 102.
- Krikorian, A. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: Roca, W; Mroginski, L. (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura Fundamentos y aplicaciones. Cali, Col, CIAT. p. 95-125.

- Lakshmi, G. 1993. Micropropagation of Eucalyptus. In Ahuja, M. (ed) Micropropagation of woody Netherlands, Kluwer Academic Publisher. p. 263-280
- Lamb, F. 1966. Mahogany of Tropical America: It's Ecology and Management, University of Michigan Press. Ann Arbor, Michigan. USA. p. 219.
- Leakey, R. 1987. Clonal forestry in the tropics – a review of developments, strategies and opportunities. Common. For Rev. vol. 66, no. 1, p. 61-75
- Lee, S; Rao, A. 1988. Plantlet production of ***Swietenia macrophylla* King** through tissue culture. Gard Bull. vol. 4, no.1, p. 11-18.
- Little, E. 1967. Arboles comunes de Puerto Rico y las Islas Virgenes. Universidad de Puerto Rico, San Juan, P Rico. p. 359, 364.
- Litz, R; Jarret, R. 1991. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, W; Mroginski, L (eds). Cultivos de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali, Col, p. 970.
- Maruyama, E; Ishii, K; Saito, A; Migita, K. 1989. Screening of suitable of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Perú- Amazon forest Journal of Agricultural Science Japon. vol. 33, no. 4, p. 252-260.
- Mascarenhas, A; Kendukar, S; Khuspe, S. 1992. Micropropagation of teak. In Ahuja, M. Micropropagation of woody plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 247-258.
- Meier-Dinkel, A. 1992. Micropropagation of Berches (*Betula* spp.). in Bajai, Y. P. S. Biotechnology in agriculture and Forestry 18. High-tech and Micropropagation II Springer- Veriag. p. 41-81
- Mesen, F; Leakey, B; Newton, C; 1992. Hacia el desarrollo de técnicas de silvicultura clonal para el pequeño finquero. El Chasqui. C Rica. CATIE. vol.9, no. 28, p.6-8.
- Mohammed, G; Patel, K. 1989. Tissue culture micropropagation of Douglas-fir New Forests. vol. 3, p. 125-238.

- Mondal, M; Gupta, S; Mukherjee, B. 1990. *In vitro* propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (Caricaceae) var Honey Dew. Plant Cell Reports. vol, 8. p. 809-612.
- Mott, R. 1981. Árboles In Conger, B. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. C Rica. Press. Boca Raton, Florida, USA. p. 217- 254.
- Neill, D; Revelo, N. 1998. Silvicultural trials of Mahogany (*Swietenia macrophylla*) interplanted with two Inga species in Amazonian Ecuador. In the genus Inga: utilization. Terence D. Pennigton y Erick C. Fernades. Kew, En. The Royal Botanical Gardens. p. 141-150.
- Patiño, F. 1997. Recursos genéticos de ***Swietenia macrophylla*** y cedrela en los neotropicos: propuesta para acciones coordinadas, Roma. It. p. 58.
- Quevedo, L. 1986. Evaluación del efecto de la tala selectiva sobre la renovación de un bosque húmedo subtropical en Santa Cruz, Bolivia. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. p. 220.
- Rawat, M; Emmanuel, C; Uniyal, D. 1994. Macropropagation in forestry species. Indian Forests. p. 124 -137
- Salazar, R. 1996. Importancia de las fuentes semilleras En Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y semillas forestales. Curso para profesores. Mayo 27 al 17 de junio de 1996. Turrialba, C Rica. CATIE. p. 11.
- 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, Rev For, Bosque vol, 25, no, 1 p. 123-128.
- Samaniego, J. 1995. Estandarización de técnicas para el manejo de semillas de ***Swietenia macrophylla*** y ***Cordia alliodora***. Tesis. Mag. Sc. Turrialba, C Rica, CATIE. p. 54.
- Scott, E; Rao, A; Loh, C.1995. Preliminary studies of micropropagation of *Hopea odorata*, a dipterocarp tree. Plant Cell, Tiss. Org Cult. vol. 41, no. 1, p. 193-196.

- Segovia, R; Laing, D. 1991. Casa de malla de tipo II para la adaptación de las plantas. In Roca, W; Mroginski, L (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Col, CIAT. p. 970.
- Sharma, S; Knox, M; Ellis, T. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. Valdivia, Ch. vol. 93, p. 751- 758.
- Sutton, B; Grossnickle, S; Roberts, D; Russell, J; Kiss, G. 1993. Somatic embryogenesis and tree improvement in the interior spruce. Journal of Forestry. Octubre. p. 34-39
- Szabados, L. 1991. Protoplastos, aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. In: Roca, W; Mroginski, L. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Cali. Col, CIAT. p. 239-270.
- Valverde, L. 1992. Organogénesis *in vitro* en especies forestales promisoras del trópico. Tesis Mag. Sc. Turrialba, San Juan. C Rica, CATIE. p. 109.
- Villalobos, V; Thorpe. T. 1991. Micropropagación, conceptos, metodología y resultados. In Roca, W; Mroginski, L (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. p. 970.
- Williams, E; Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. (En línea). Disponible en:http://books.google.com.ec/books?id=pm4L7lbKbn8C&pg=PA49&dq=Williams,+E%3B+Maheswaran,+G.+1986.+Somatic+embryogenesis:+Factors+influencing+coordinated+behavior+of+cell+as+an+embryogenic+group.+Annals+of+Botany+vol+57+p+443-462.&hl=es&ei=-ObYTMWIEoS0IQefhs21CQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false. Consultado Agosto 2010.
- Winograd, M. 1995. Indicadores ambientales para Latinoamérica y el Caribe: hacia la sostenibilidad en el uso de tierras. San José, C R. GASE, Proyecto IICA/GTZ, OEA, WRI, p. 85.
- Zobel, B. 1992. Vegetative propagation in production forestry. Journal of Forestry. vol. 90, p. 29-33.

-----; Talbert, J 1992. Tecnicas de Mejoramiento Genetico en árboles forestales.
Trad. Guzman, M. Limusa. Mexico. Df. p. 545.

