

**INFORME FINAL
PROYECTO DE INVESTIGACION INTERINSTITUCIONAL
ITCR, UNA, CATIE**

***"Micropropagación de tres especies maderables
de importancia económica y ecológica para
Costa Rica"***

TECA - PILÓN - CAOBA

**Dra. Ana Abdelnour E.
Centro de Investigación en Biotecnología
ITCR**

**MSc. Lisette Valverde Cerdas
Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales
UNA**

**Dra. María Elena Aguilar
Laboratorio de Biotecnología
CATIE**

2004

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
MICROPROPAGACIÓN DE TECA	3
Introducción	3
Materiales y Métodos	5
Resultados y discusión	7
Literatura citada	16
MICROPROPAGACIÓN DE PILÓN	17
Introducción	17
Materiales y métodos	18
Resultados	19
Discusión	23
Literatura citada	25
MICROPROPAGACIÓN DE CAOBA	26
Introducción	26
Materiales y métodos	27
Resultados y discusión	28
Literatura citada	37
CRIOCONSERVACIÓN	38
Introducción	38
Materiales y Métodos	39
Resultados y discusión	40
Literatura citada	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
ANEXO	44

AGRADECIMIENTOS

Las investigadoras desean expresar su agradecimiento a las Instituciones, empresas y personas que colaboraron para que esta investigación se pudiera realizar.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología y al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas, que a través del Fondo de Incentivos colaboró para el financiamiento parcial de esta investigación.

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), la Universidad Nacional (UNA) y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), por su colaboración en la asignación del tiempo y el financiamiento parcial del proyecto.

A la empresa Precious Woods of Costa Rica (MACORI), que donó el material vegetal de teca y colaboró con el financiamiento y la experimentación en enraizamiento, aclimatación y siembra en el campo del material producido.

A la Escuela Agrícola Regional del Trópico Húmedo (EARTH), que donó el material vegetal de pilón.

A los asistentes y estudiantes involucrados en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f)

INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis*) pertenece a la familia Verbenaceae y es originaria del sureste asiático. Su madera es altamente valorada por sus características tecnológicas y belleza, considerándose de primera clase. Combina cualidades como dureza, durabilidad y resistencia al ataque de termitas. Se utiliza para la construcción de puentes, marinas, yates, muebles, carpintería en general, enchapados y contraenchapados, madera para parquet, postes y duela utilizados en la fabricación de barriles (Chavez y Fonseca, 1991; Mascareñas *et al.*, 1993).

Debido a que la demanda de teca a nivel mundial es mayor que los recursos disponibles, muchos países se inclinaron por introducir esta especie en los programas de reforestación; sin embargo, esta actividad requiere la producción de grandes cantidades de material de siembra de calidad, requisito que muchos productores no pueden cumplir. La propagación de teca se realiza tradicionalmente por semilla y la siembra a gran escala se mantiene por esta vía, muchas veces sin conocer las características o procedencia del material a plantar, lo que ha resultado en plantaciones de baja calidad.

En Costa Rica, la teca es una de las principales especies en los programas de reforestación y de la superficie dedicada a plantaciones forestales (165 962 ha), alrededor de 25 600 ha son dedicadas a teca (Estado de la Nación, 2000, Arce y Moya, 2001) . Sin embargo, la calidad de las plantaciones justifica el desarrollo de programas agresivos de mejoramiento. Se han establecido rodales semilleros para abastecer la demanda de semilla (Murillo *et al.*, 2001), pero la variabilidad encontrada entre los árboles propagados por esta vía, impulsó el desarrollo de programas de propagación clonal a partir de árboles seleccionados. La propagación vegetativa resulta en mayores retornos por ganancias en la calidad y la uniformidad de las plantaciones (Monteuuis, *rt al.*, 1998).

La propagación clonal utilizando estacas enraizadas en vivero permite a los productores solventar los problemas de variabilidad, pero el hecho de que una estaca produce únicamente una planta, y que es necesario obtener altos volúmenes de material de siembra, en el menor tiempo posible, parece indicar que esta técnica no sería la más eficiente para llenar las demandas de materiales de siembra. La inclusión de técnicas de micropropagación o cultivo *in vitro* en los programas de mejoramiento genético y establecimiento de plantaciones, permite la clonación masiva de los árboles superiores en tiempo y espacio reducido, conservando las características valiosas de los materiales. Además, permite la comercialización y transporte de las plantas así producidas a lugares y países lejanos con menores restricciones aduaneras y menores posibilidades de pérdida de materiales.

Otras experiencias en la micropropagación de teca han mostrado el potencial de esta técnica para la propagación masiva de esta especie,

El objetivo de esta investigación fue evaluar la técnica de micropropagación en materiales de teca seleccionados a partir de las plantaciones y árboles *plus* de Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación de laboratorio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica en Cartago, Costa Rica. Las pruebas de enraizamiento y aclimatación se realizaron en Cartago y en la finca de la empresa Precious Woods of Costa Rica (MACORI) en Playa Garza, Guanacaste.

Material experimental

El material experimental o explante a introducir al cultivo *in vitro* consistió de brotes y nudos tomados de estacas enraizadas, establecidas y mantenidas en condiciones de invernadero en el CIB y estacas tomadas de árboles creciendo en campo; todos los materiales provenientes de árboles superiores de la empresa Precious Woods of Costa Rica (MACORI).

Desinfección de explantes

Las estacas mantenidas en invernadero fueron asperjadas semanalmente con una mezcla de fungicida y bactericida (Agrimicin y Benlate, 1 g/l de cada uno) para asegurar mayor sanidad de los materiales.

Para la desinfección, los explantes fueron lavados con agua y detergente con ayuda de un cepillo suave, para luego enjuagarlos con abundante agua. Se evaluaron varias metodologías de desinfección y varios desinfectantes dependiendo del tipo de explante a introducir al cultivo aséptico.

Para los explantes provenientes de estacas mantenidas en invernadero se utilizó hipoclorito de calcio (CaOCl) (6% y 8% de producto comercial con 67% i.a.), hipoclorito de sodio (Na₂OCl) (60% de producto comercial con 4% i.a.), Agrimicin (1 a 1,5 g/l) y Benlate (1 a 1,5 g/l). Algunos tratamientos incluyeron la incubación en bomba de vacío y la agitación en un agitador orbital. Para la desinfección de los explantes provenientes de árboles de campo se utilizaron los desinfectantes antes mencionados, el alcohol de 70° y el cloruro de mercurio ((HgCl)₂) (0,5 a 1,5 g/l).

En general, los tiempo de incubación en los diferentes productos desinfectantes varió dependiendo del tipo de explante y producto (5 a 90 minutos). Para finalizar la desinfección, los explantes se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Para los explantes provenientes de campo, algunos

tratamientos incluyeron la adición de 100 m/l de ácido ascórbico y 80 mg/l de gentamicina al agua del último enjuague.

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado consistió de las sales minerales y vitaminas descritas por Murashige y Skoog (MS) (1962), con 30 g/l de sacarosa y 2,3 g/l de Phytigel. El pH se ajustó a 5,8 antes del autoclavado. Se dispensó un volumen de 20 ml en cada frasco de cultivo de 175 ml de capacidad.

Establecimiento *in vitro*

Durante la etapa de establecimiento *in vitro* los explantes (un nudo o brote apical) fueron cultivados en el medio de cultivo enriquecido con thidiazuron (TDZ, de 0 a 3 mg/l) o benciladenina (BA, de 0 a 15 mg/l), en la oscuridad durante una semana y luego transferidos a condiciones de luminosidad (2000 Lux).

Multiplicación

Durante la etapa de multiplicación los brotes obtenidos durante la etapa de establecimiento fueron cultivados en el medio básico al que se le adicionó de 0 a 2 mg/l de BA, sólo o en combinación con 0,02 y 0,2 mg/l ácido indolbutírico (AIA), ó 0,2 y 0,5 mg/l isopenteniladenina (2ip), ó 0,2 mg/l cinetina (K).

Enraizamiento

Para el enraizamiento *in vitro*, los brotes producidos durante la multiplicación fueron transferidos al medio de cultivo básico fresco, con la concentración de sales completa (MS) o reducida a la mitad (MS/2). Otros tratamientos consistieron en la incubación de los brotes por 48 horas en 10 ml de medio de cultivo líquido con la concentración de sales completa o reducida a la mitad, enriquecido con 0, 2,5 ó 25 mg/l de ácido indolbutírico (AIB), en presencia luz o en oscuridad. La incubación se llevó a cabo en tubos de ensayo. Pasado este periodo, los explantes fueron cultivados en el medio sólido con la concentración de sales reducida a la mitad por 4 a 6 semanas o fueron sembrados en tierra en condiciones de invernadero. Posteriormente se evaluó la inducción de enraizamiento en presencia y ausencia de soluciones enraizadoras en el sitio permanente de siembra de las plantas en condiciones de casa de mallas o propagadores (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados para el enraizamiento de brotes de teca (*Tectona grandis*) producidos en condiciones de cultivo *in vitro*.

Tratamientos*	
1	MS, presencia de luz, enraizamiento <i>in vitro</i>
2	MS/2, enraizamiento <i>in vitro</i>
3	MS/2 + 2,5 mg/l AIB por 48 horas, en presencia de luz, enraizamiento <i>in vitro</i> .
4	MS/2 + 2,5 mg/l AIB por 48 horas, en oscuridad, enraizamiento <i>in vitro</i> .
5	MS/2 + 2,5 mg/l AIB por 48 horas, en oscuridad, enraizamiento en invernadero.
6	MS/2 + 25 mg/l AIB por 3 minutos antes de la siembra en invernadero.
7	25 mg/l AIB en agua, por 3 minutos antes de la siembra en propagador en el sitio de siembra.
8	Siembra de brotes directamente en propagadores en el sitio de siembra.

*Cada prueba se repitió dos veces con 25 brotes por tratamiento, excepto el tratamiento 8, en el que se evaluaron 50 brotes en cada ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección y establecimiento *in vitro*

Durante la experimentación en establecimiento *in vitro* de los explantes provenientes de estacas mantenidas en vivero se observó que tanto el hipoclorito de calcio como el hipoclorito de sodio, en las concentraciones evaluadas, fueron efectivos para obtener el establecimiento de los materiales bajo las condiciones del cultivo de tejidos (Cuadro 2). Los tratamientos que permitieron obtener los mayores porcentajes de explantes asépticos fueron la incubación durante 10 minutos en NaOCl al 60% de producto comercial (con 4% i.a.) y el tratamiento que incluyó la incubación en Ca(OCl) al 6% por 4 minutos utilizando la bomba de vacío, seguido por la incubación durante 4 minutos en agitación ((61% 52% de explantes asépticos respectivamente). Los tratamientos que incluyeron la incubación en Ca(OCl) al 6% por 8 minutos en agitación y la previa incubación en Agrimicin y Benlate por 90 minutos no permitieron obtener mayores porcentajes de materiales establecidos asépticamente comparados con los dos primeros tratamientos evaluados (34% y 44% de explantes asépticos).

El uso de la bomba de vacío durante el periodo de incubación permite romper la tensión superficial de los explantes, permitiendo un mayor contacto del material vegetal con el desinfectante.

Al evaluar el efecto del thidiazuron (TDZ) y la benziladenina (BA) sobre la brotación de las yemas de los explantes de teca establecidos en condiciones

de cultivo de tejidos, se observó que ambos reguladores del crecimiento fueron efectivos en las concentraciones evaluadas (Cuadro 3).

Cuadro 2: Efecto del método de desinfección sobre el establecimiento *in vitro* de brotes de teca (*Tetona grandis*) provenientes de estacas mantenidas en invernadero.

Desinfección	Explantes asépticos (%)
Hipoclorito de calcio al 6% por 4 min. al vacío y 4 min. en agitación.	52
Hipoclorito de sodio al 60% durante 10 min. en agitación.	61
Hipoclorito de calcio al 6% por 8 min. en agitación.	34
Benlate + Agrimicin (1g/l c/u) por 90 min. + Hipoclorito de calcio al 6% por 8 min. en agitación.	44

Cuadro 3: Efecto del regulador del crecimiento sobre la brotación *in vitro* de yemas de teca (*Tectona grandis*) provenientes de estacas mantenidas en invernadero.

Regulador del crecimiento (mg/l)	Brotación (%)
TDZ	
0	44
0.5	47
1	61
2	80
3	38
BA	
0	62
2,5	100
5	88
10	33

Para el establecimiento *in vitro* de los brotes provenientes de material de campo, ninguno de los tratamientos que incluyó una o dos desinfecciones con $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ o NaOCl en las diferentes concentraciones y tiempos de incubación evaluados, en agitación o vacío, en combinación con Agrimicin y Benlate o con gentamicina en el último enjuague, fue efectivo para lograr explantes asépticos y brotados (Datos no se muestran). Por otra parte, la utilización de cloruro de

mercurio (Cuadro 4) en concentraciones de 1,5% y 1,0% permitieron reducir la contaminación a niveles del 3% y 5% respectivamente, pero estos explantes no fueron capaces de brotar. Sin embargo, cuando se usó este desinfectante en concentraciones de 0,5% después de la incubación en Benlate y Agrimicin (1,5 g/l de cada uno) durante 90 minutos, se observó un mayor porcentaje de explantes contaminados (58%), pero el 40% del total de material sometido a desinfección logró el establecimiento aséptico y la brotación de las yemas.

Otros autores (Daquinta *et al.*; 2002), utilizando la vía de callogénesis a partir de ápices, colitlledones y botones floreales obtuvieron cerca de un 25% de regeneración de plantas; sin embargo, esta vía de regeneración no es la más recomendable para la propagación masiva por los problemas de variabilidad que puede generar en las plantas producidas.

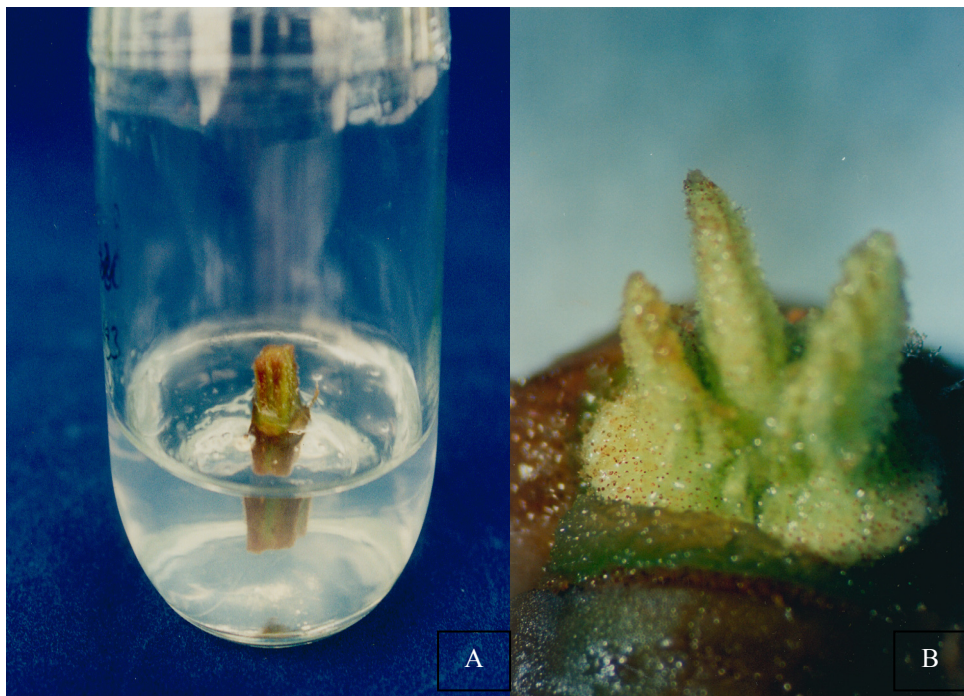


Figura 1: Teca (*Tectona grandis*). A) Estaca establecida asépticamente. B) Inicio de la brotación *in vitro* de estacas.

Cuadro 4: Efecto del método de desinfección sobre la contaminación y la brotación de las yemas de las estacas de teca (*Tectona grandis*) provenientes de plantas de campo*.

Desinfección	Contaminación (%)	Brotación %
Benlate + Agrimicin (2 g/l c/u) por 20 min al vacío + Cloruro de mercurio al 1,5% por 8 min. en agitación y 4 min. al vacío + 3 ^{er} enjuague con 100 mg/l Ácido Ascórbico + 80 mg/l gentamicina.	3	0
Igual al anterior + 1 g/l de Cloruro de mercurio	5	0
Benlate + Agrimicin (1,5 g/l c/u) por 90 min en agitación + Cloruro de mercurio al 0,5% por 10 min. en agitación.	58	40

*Cada tratamiento se evaluó con 30 explantes.

Cuadro 5: Efecto de la concentración de BA sobre la brotación de estacas de varios materiales genéticos de teca (*Tectona grandis*) provenientes de plantas de campo.

Material Vegetal	Brotación (%)*	
	Concentración de BA (mg/l) 10	15
CATIE-2	80	33
Desconocido	37	50
Pífoma-150	27	27

*El porcentaje de brotación se obtuvo con base en el número de explantes establecidos asépticamente, .

Multiplicación

Durante esta etapa de la micropropagación, los brotes obtenidos en la etapa de iniciación fueron seccionados en los entrenudos, de manera que se obtuvieron explantes constituidos por la yema apical o por un nudo (microestacas). Estos fueron sembrados en los diferentes medios de cultivo evaluados para inducir la multiplicación. Los ensayos se evaluaron después de 6 semanas. Todos los medios de cultivo evaluados fueron efectivos para inducir la multiplicación del material, aún el medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento (Cuadro 5). Sin embargo, se observó que la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo incrementó tanto el porcentaje de yemas brotadas, como el número de brotes por microestaca. El BA fue el regulador de crecimiento que indujo el mayor número de brotes por microestaca. Cuando se adicionó 2 mg/l de BA al medio básico, el 71% de los explantes regeneraron formando brotes, obteniéndose un promedio de 2 nuevas plantas por microestaca. Cuando este

regulador se adicionó en combinación con 0,02 mg/l de AIA, se obtuvo un 80% de regeneración del material en forma de brotes y un número promedio de 4,2 nuevas plantas por microestaca, resultando el mejor para esta variable evaluada. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Rathore y colaboradores (1993). Cuando a este tratamiento se le aumentó la concentración de AIB a 0,2 mg/l, el porcentaje de regeneración como brotes disminuyó al 55%, el número de nuevos brotes a 1,7 y la presencia de vitrificación y la formación de callo se vio incrementada en estos cultivos. En general, todos los brotes que crecieron en presencia de BA (con excepción del tratamiento con 1 mg/l) mostraron poca elongación y una coloración verde pálido. Por otra parte, cuando los explantes se colocaron en el medio de cultivo que contenía i^oAde, el porcentaje de regeneración en forma de brote se mantuvo alto, la regeneración como callo fue de 0% a 3% y el número de nuevas plantas por microestaca fue de 1,7 a 1,8. A pesar de que estos tratamientos indujeron un bajo número de brotes por yema, las plántulas se caracterizaron por su coloración verde, vigorosidad y buen desarrollo y no se observó vitrificación en los cultivos. Tanto la presencia de 0,2 mg/l de K, como la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo básico favorecieron la brotación de cerca del 50% de las microestacas cultivadas, siendo principalmente las yemas apicales las que brotaron y se desarrollaron. Estos resultados concuerdan con los observados en ensayos previos realizados por la autora (Abdelnour-Esquivel y Muñoz, 1996), durante la etapa de brotación de explantes introducidos a partir de material tierno del invernadero. A la vez, los resultados concuerdan con lo informado por Devi y colaboradores (1994), ya que estos autores obtuvieron los mayores porcentajes de multiplicación cuando combinaron 2 mg/l de BA con 0,02 mg/l de ANA. Otros autores (Monteuuis *et al.*; 1998) encontraron también altas tasas de multiplicación (3 por ciclo de multiplicación) pero no informaron sobre el regulador de crecimiento utilizado ni su concentración.

Es importante señalar que los resultados obtenidos durante este estudio fueron similares para los materiales de las diferentes procedencias (invernadero o campo), ya que una vez obtenida la brotación de los explantes iniciales, su comportamiento *in vitro* fue semejante durante la etapa de multiplicación.



Figura X: Desarrollo inicial del brote de teca en condiciones de cultivo de tejidos.

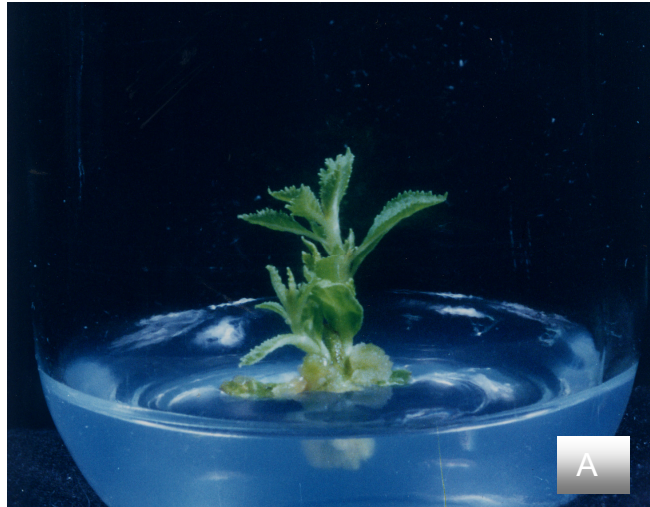


Figura 2: Teca (*Tectona grandis*) en etapa de multiplicación.
A) Brote en fase de multiplicación. B) Desarrollo de los brotes

Cuadro 5: Efecto de los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo MS en la multiplicación *in vitro* de teca (*Tectona grandis*).

Tratamiento (Regulador del crecimiento, mg/l)	Tipo de regeneración		# Ejes por estaca ± e.e.
	Brote	Callo	
MS simple	50	0	1 ± 0,2
1 - BA	64	0	2 ± 0,3
2 - BA	71	29	3 ± 0,4
2 - BA + 0,02 - AIA	80	20	4,6 ± 0,4
2 - BA + 0,2 - AIA	55	45	2 ± 0,7
0,2 - K	56	0	1 ± 0,3
0,2 - 2ip	73	3	2 ± 0,3



Figura 3: Brote de teca (*Tectona grandis*) desarrollado, y en condiciones para pasar a la fase de enraizamiento y aclimatación

Enraizamiento y aclimatación

Para la inducción del enraizamiento (Figura 5), los brotes producidos durante la etapa de multiplicación (con 2 a 3 nudos) fueron transferidos al medio en ausencia de reguladores de crecimiento, tanto con la concentración de sales completa (Tratamiento 1) como reducida a la mitad (Tratamiento 2) y se observó que únicamente el 8% y el 18% respectivamente, 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, los porcentajes de enraizamiento incrementaron considerablemente, observándose que el 46% enraizó en presencia de luz (Tratamiento 3) y 83% cuando el periodo de incubación se realizó en la oscuridad (Tratamiento 4). Este último tratamiento se evaluó sembrando los brotes directamente en un sustrato de tierra-granza de arroz (2:1) en condiciones de invernadero (Tratamiento 5) y se observó un porcentaje de enraizamiento similar (80%) al obtenido en condiciones *in vitro*.

Posteriormente, se evaluó el efecto de una concentración mayor de la solución enraizadora (25 mg/l AIB) y un periodo de incubación menor (3 min.) y se observó que los brotes enraizados en condiciones de invernadero (Tratamiento 6) respondieron positivamente al desarrolló de raíces en un 68% y aquellos sembrados en propagadores en el sitio de siembra (Playa Garza, Guanacaste) (Tratamiento 7) en un 92%. Al sembrar directamente los brotes en propagadores en el sitio de siembra permanente, sin reguladores de crecimiento (Tratamiento 8), el porcentaje de enraizamiento fue del 96%.



Figura 4: Plántulas de teca (*Tectona grandis*) en la fase de enraizamiento y aclimatación en propagadores en el sitio de siembra.

A pesar de algunos autores apuntan la necesidad de utilizar sustancias promotoras del enraizamiento en concentraciones hasta de 1000 mg/l de ANA y AIB (Daquinta y colaboradores, SF; Umboh, 1988), los resultados obtenidos en este trabajo de investigación mostraron que para el enraizamiento de los materiales evaluados, el uso de reguladores de crecimiento no fue necesario, resultados que coinciden con los de Monteuuis y colaboradores (1998) y que

las condiciones ambientales del sitio de aclimatación fue el factor más importante en esta etapa.

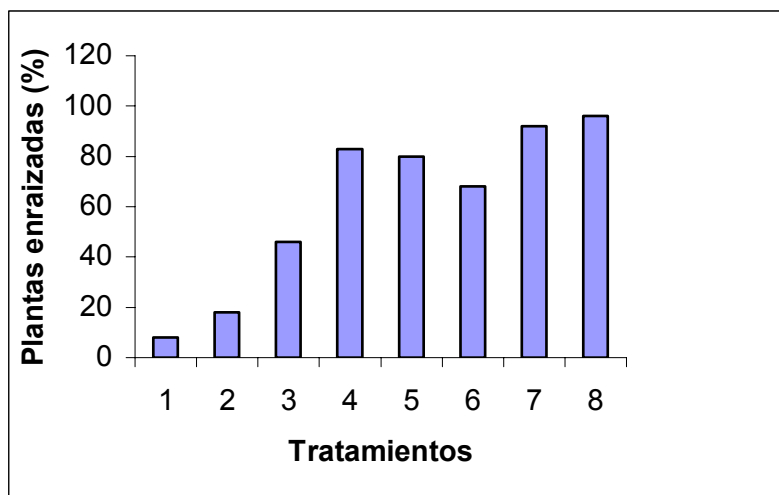


Figura 5. Respuesta de los brotes de teca (*Tectona grandis*) a los tratamientos de enraizamiento.

Literatura citada

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D.; ESCALONA, M. S.F. Revista Forestal Centroamericana. Pp. 25-28.

ESTADO DE LA NACIÓN EN DESARROLLO HUMANO SOSTENIBLE. 2000. Estado de la Nación en desarrollo humano sostenible. San José, Costa Rica. 414p.

ARCE, V.; MOYA, R. 2001. Efecto del espaciamiento de plantación sobre el porcentaje de duramen en la madera de teca (*Tectona grandis*). Boletín Kurú. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 31: 3-6.

ASHMORE, S. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 67p.

CHAVEZ, E. ; FONSECA, W. 1991. Teca (*Tectona grandis* L.F.) árbol de uso múltiple en América Central. Serie Técnica. Informe Técnico N° 179. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

DEVI, Y.S; MUKHERJEE, B.B.; GUPTA, S. 1994. Rapid cloning of elite teak (*Tectona grandis* Linn) by *in vitro* multiple shoot production. Indian Journal of Experimental Biology. 32: 668-671.

MASCARENHAS, A.F., KENDURKAR, S. V.; KHUSPE, S.S. 1993. Micropropagation of Teak . *In*: Micropropagation of Woody Plant. Arauja, M.R. (ed.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 247-262.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

MURILLO, O. 1993. Manejo de plantaciones forestales en Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Sin publicar.

MONTEUUIS, O.; BON, M.; GOH, D. 1995. Teak propagación by *in vitro* culture. *Bois et Forêts des Tropiques.* 269: 1-11.

UMBOH, M. I. J. 1998. The application of tissue culture techniques in economically important trees. *Biotrop Special Publication (Bogor, Indonesia).* 35:81-82.

MICROPROPAGACIÓN DE PILÓN (*Hieronima alchorneoides*)

INTRODUCCIÓN

Pilón (*Hieronima alchorneoides*), también conocido como zapatero, palo curtidor, palo rosa, tinto y otros, pertenece a la familia Euphorbiaceae. Su zona de distribución natural alcanza desde México hasta la cuenca del Amazonas brasileño y las islas de las Indias Occidentales. En Costa Rica se encuentra en los bosques lluviosos de las zonas bajas del Norte y del Atlántico, en alturas desde el nivel del mar hasta los 800 m. Se presenta tanto en bosques primarios como secundarios y a lo largo de ríos y quebradas (González, 1995).

En condiciones naturales presenta poblaciones pequeñas, por lo que al aprovecharla se corre el riesgo de amenazar su permanencia en el ecosistema. El pilón es una especie dioica, es decir, presenta árboles macho y árboles hembra, los cuales no presentan características evidentes, fáciles de identificar, a no ser por su floración. No se conoce la relación entre la frecuencia de los árboles macho y hembra. No todos los árboles florecen cada año y existen árboles que nunca han presentado una floración, lo que dificulta la identificación de árboles semilleros. La producción de frutos es muy variable en el tiempo y entre árboles. Aunque los árboles producen gran cantidad de frutos, estos son fuertemente depredados por diferentes aves y en los últimos años el porcentaje de frutos dañados se ha incrementado a niveles considerables debido a avispas de la familia Eurytomidae. Presenta problemas para el almacenamiento a largo plazo, ya que los frutos, aún desecados entre el 5 y 11% de humedad y almacenados a baja temperatura (5°C) pierden más del 80% de su capacidad de germinación después de unos meses (COSEFORMA, 1998).

Es una de las especies nativas que mejor se ha adaptado a condiciones abiertas de plantación, mostrando poca exigencia con respecto a la calidad del sitio, buena forma de fuste y rápido crecimiento durante los primeros años. Además, su madera es muy apreciada en el mercado por su amplio rango de usos. Se utiliza en construcciones, tanto en interiores como exteriores, para puentes, pisos, carrocería de camiones, soportes, postes, barriles para sólidos, durmientes de ferrocarril, barcos y construcciones marinas (Carpio, 1992). El conocimiento de estas características ha incrementado la demanda de pilón por parte de los reforestadores (COSEFORMA, 1998), por lo tanto, se espera contar en un futuro cercano, con materiales de siembra de calidad para cubrir esta demanda. En Costa Rica se ha experimentado en micropropagación de pilón (Valverde Cerdas y colaboradores, 1998; Gamboa, 1998); sin embargo, la metodología propuesta debió ser validada y mejorada para poder utilizarse a gran escala.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales de la Universidad Nacional y en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Las semillas de pilón provenían de un árbol de padres seleccionados y fueron suministradas por la Organización de Estudios Tropicales (OET). Las semillas en estado maduro e inmaduro, se lavaron en agua con jabón y se enjuagaron en alcohol de 95° por 5 minutos. Posteriormente se dejaron en cloro comercial (5.5% i.a.) en agitación durante 30 minutos. En la campana de flujo laminar se les extrajo el embrión y se distribuyeron en viales conteniendo un medio Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con 3% de sacarosa y 1.8 g/L de gelrite. Los medios se ajustaron a un pH 5.7 antes de la esterilización y fueron distribuidos en viales de 11 cm de largo x 8 cm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento, con una temperatura de 27 °C, una humedad relativa de 87%, un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 2000 lux.

El material vegetal para la introducción de brotes vegetativos fue donado por el Proyecto Especies Nativas de la Zona Norte del Instituto Tecnológico de Costa Rica y por el vivero de la Escuela de Agricultura de la Región del Trópico Húmedo (EARTH). Las estacas se mantuvieron en el invernadero, donde se les dio los cuidados respectivos (similar a lo descrito para las estacas de teca).

Para las pruebas de desinfección y establecimiento *in vitro* de estacas para la brotación, se tomaron brotes tiernos y se les eliminaron las hojas, dejando solo una pequeña parte del peciolo. El tamaño del explante fue de aproximadamente 4 cm. Se procedió a hacer un lavado con agua y detergente para eliminar los residuos que pudiesen estar adheridos a los explantes. Se procedió a incubar el material en los diferentes tratamientos de desinfección y medios de cultivo para la inducción de la brotación.

Efecto de las citocininas. Para completar los ensayos de tres citocininas (cinetina, benciladenina y zeatina) y su efecto sobre la inducción de yemas en explantes de segmentos de nudo de pilón, segmentos de nudo de aproximadamente 0.5 a 1.0 cm obtenidos de plántulas micropropagadas *in vitro*, fueron distribuidos en un diseño irrestricto al azar que consistía de un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 g/l de sacarosa, 2 g/l de gelrite y cuatro concentraciones de la citocinina zeatina (0, 0.5, 1.0, 1.5 mg.l⁻¹). Se utilizó un total de 20 explantes por tratamiento y la unidad experimental estaba compuesta por un tubo de ensayo. Los cultivos se colocaron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 27 °C y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Efecto de las auxinas. Tallos de 1.5 cm de longitud de las yemas producidas, fueron colocados en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) completo y a la mitad de su concentración que contenía cuatro concentraciones (0,1, 0,2,

0,3, 0,4 mg.l⁻¹) de dos auxinas: ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA), en ensayos independientes. Cada tratamiento consistía de 20 repeticiones y cada unidad experimental estaba representada por un tubo de ensayo. Los ensayos se colocaron en las mismas condiciones que el ensayo anterior.

Aclimatación de las plantas en el invernadero. Para la aclimatación de las plantas en el invernadero se establecieron dos ensayos preliminares utilizando micorrizas. Para ello, 100 kg de suelo de bosque fue dividido a la mitad y esterilizada una de las partes en una autoclave a 121 °C y 15 libras de presión. Después de seis de secado del suelo, ambos se distribuyeron en bolsas plásticas de polietileno de 15 cm x 25 cm para trasplante de plantas y en un primer ensayo se establecieron cuatro tratamientos en un ensayo irrestricto al azar: suelo sin esterilizar y sin inóculo, suelo sin esterilizar con inóculo, suelo esterilizado sin inóculo y suelo esterilizado con inóculo. La fuente de inóculo fue el hongo *Glomus manihotis*. En un segundo ensayo, los tratamientos fueron: suelo esterilizado con inóculo del hongo H3, suelo no esterilizado con el hongo, suelo no esterilizado con inóculo del hongo PN, suelo esterilizado con inóculo del hongo PN.

Aquellos tratamientos que debían contener inóculo se les agregó 24 g de tierra conteniendo el inóculo según el tratamiento. Por falta de suficiente inóculo, un total de 100 plantas enraizadas *in vitro* con un tamaño entre 3 y 5 cm se les lavó las raíces, se cultivaron en las bolsas y se mantuvieron en una cámara con una temperatura de 30 °C y fueron regadas a mano cada 2 ó 3 días. Cada 10 días las plantas fueron evaluadas y después de un período de 60 días en vivero las plantas fueron sustraídas y analizada la colonización de las micorrizas.

RESULTADOS

El mayor problema encontrado para el establecimiento *in vitro* de pilón se presentó durante la etapa de desinfección. Como se observa en el Cuadro 1, el uso de cloruro de mercurio (HgCl₂) resultó importante para lograr la desinfección de los explantes, no así el uso de Agrimicin + Benlate. Al parecer, estos dos químicos no fueron suficientemente fuertes para realizar la primera desinfección. Cuando se utilizó el hipoclorito de sodio (NaOCl) seguido por el HgCl₂, se observó un menor porcentaje de contaminación y una menor mortalidad, debido probablemente a que no fue necesario utilizar una concentración muy alta de cloruro de mercurio.

Por otra parte, la adición de reguladores de crecimiento no parece ser importante para inducir la brotación de pilón ya que cuando se utilizó el medio de cultivo MS al 50% de su concentración y en ausencia de BA se observó el mayor porcentaje (31%). El medio de cultivo MS se caracteriza por ser rico en nutrientes, principalmente en nitrógeno y la favorable respuesta obtenida, aún sin la presencia de suplementos adicionales, nos indica la gran respuesta *in vitro* que posee esta especie.

Cuadro 1: Efecto del tratamiento de desinfección y del medio de cultivo sobre el establecimiento *in vitro* de estacas de pilón (*Hyeronima alchorneoides*).

Medio de cultivo	Desinfectantes	Contaminación (%)	Mortalidad (%)	Brotación (%)
MS ₅₀	Agrimicin+Benlate (1 g/l), 30 min HgCl ₂ (0,095%) 5 min	100	0	0
MS ₅₀ + 5 mg/l BA	Agrimicin+Benlate (1 g/l), 30 min HgCl ₂ (0,095%) 5 min	100	0	0
MS ₅₀ + 10 mg/l BA	Agrimicin+Benlate (1 g/l), 30 min HgCl ₂ (0,095%) 5 min	100	0	0
MS ₅₀	HgCl ₂ (0,2%) 7 min	0	100	0
MS ₅₀ + 0,5 mg/l BA	HgCl ₂ (0,2%) 7 min	0	100	0
MS ₅₀	NaOCl (6%) 5 min HgCl ₂ (0,2%) 5min	69	0	31
MS ₅₀ + 0,5 mg/l BA	NaOCl (6%) 5 min HgCl ₂ (0,2%) 5min	75	0	25

Efecto de las citocininas. En el ensayo de inducción de brotes utilizando zeatina, tanto el tratamiento testigo como el resto de los tratamientos mostraron una respuesta muy similar no observándose diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2=$, $p=0.01$)(Cuadro 2). Esto nos indica que la presencia de zeatina en el medio de cultivo no causó un efecto significativo en la inducción de yemas en segmentos de nudo de pilón y por tanto, se puede prescindir de ella. Se observó una gran cantidad de yemas vitrificadas con concentraciones superiores a 0.5 mg.l⁻¹ de zeatina y ya a una concentración de 1.5 mg.l⁻¹ las yemas presentaban algunas deformidades. Este resultado nos sugiere que podemos prescindir de la presencia de esta citocinina en la inducción de yemas en segmentos de nudo de pilón.

Cuadro 2. Efecto de la zeatina sobre la inducción de yemas a partir de segmentos de nudo de pílón (*Hyeronima alchorneoides*)

Concentración de (zeatina (mg.l ⁻¹))	Número total de yemas	Número promedio de yemas por explante
0	48	2.5
0.5	48	2.4
1.0	40	2.6
1.5	41	2.6

Efecto de las auxinas

En el ensayo de enraizamiento nueve días después de iniciado el cultivo, no había indicios de formación de raíces hasta los 18 días de cultivo, en la segunda evaluación. En esta evaluación, solo los ensayos con un medio de cultivo M&S(1962) al 50% suplementado con AIB y un M&S(1962) al 100% suplementado con ANA si presentaron formación de raíces. En la tercera evaluación, a los 27 días, se observó la formación de raíces en los medios de cultivo M&S(1962) al 50% suplementado con ANA y M&S(1962) al 100% suplementado con IBA. En muchas especies leñosas del trópico se ha observado que sus requerimientos nutricionales en la etapa de enraizamiento son inferiores y que disminuyendo la concentración del medio de cultivo en esta etapa, se favorece el porcentaje de enraizamiento. Estos resultados se comprueban una vez más al observar los datos mostrados en el cuadro 2 donde los mayores porcentajes de enraizamiento se tuvieron en el medio de cultivo a la mitad de su concentración con ambas auxinas. El AIB resultó un mejor enraizador que el ANA, no solo en cuanto al número promedio de raíces por planta y el porcentaje de enraizamiento sino que además en la forma de la raíz ya que en algunos tratamientos en presencia de ANA las raíces formadas eran muy gruesas. También se observó algunas deformidades con concentraciones más elevadas de ANA.

Con un medio de cultivo al 50% suplementado con AIB y con ANA y al 100% suplementado con AIB hay una tendencia a disminuir el porcentaje de tallos enraizados con incrementos en la concentración de estas auxinas ya que se promueve la formación de masas de callo en la base del tallo que desfavorece la formación de raíces. Excepto en el medio de cultivo al 100% suplementado con ANA en cuyos datos se observa que el porcentaje de enraizamiento incrementa en la concentración de 0.2 mg.l⁻¹ pero se mantiene constante a concentraciones mayores. De la información obtenida se desprende que el mejor porcentaje de enraizamiento se obtiene con un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50% suplementado con una concentración de 0.1 mg.l⁻¹ de AIB (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y de dos auxinas en el porcentaje de enraizamiento de tallos de pilón.

Concentración M&S (1962)	Porcentaje de enraizamiento (%)							
	AIB (mg.l ⁻¹)				ANA (mg.l ⁻¹)			
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4
100%	73	53	66	33	26	40	40	40
50%	80*	80*	60	53	80*	66	26	33

*Diferencia altamente significativa a p=0.05

Similar comportamiento se muestra en el número promedio de raíces por planta ya que el medio de cultivo al 50% suplementado con AIB muestra los mejores resultados y con una tendencia a disminuir con incrementos en las cantidades de la auxina. Según las observaciones presentadas en el cuadro 4, los tallos de pilón muestran una mejor respuesta de formación de raíces con ácido indolbutírico que con ácido naftalenacético.

Cuadro 4. Efecto de la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y de dos auxinas sobre la formación de raíces en tallos de pilón.

Concentración M&S (1962)	Promedio de raíces por planta							
	AIB (mg.l ⁻¹)				ANA (mg.l ⁻¹)			
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4
100%	5.0*	3.6	3.6	1.7	1.9	2.5	2.8	2.2
50%	5.0*	5.0*	4.6*	4.7*	1.7	2.5	1.6	1.2

*Diferencia altamente significativa a p=0.05

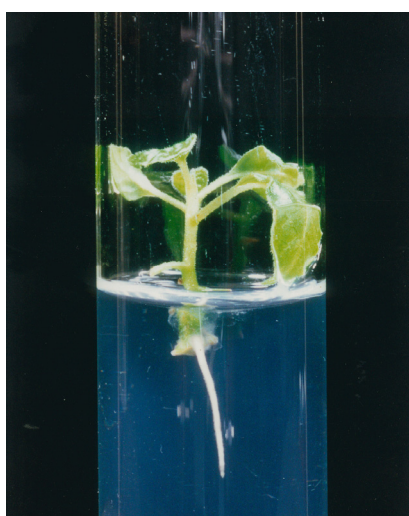


Figura 1: Inicio del enraizamiento *in vitro* en brotes

de pilón (*Hieronyma alchorneoides*).

Aclimatación de las plantas

Las microestacas de pilón enraizadas *in vitro* mostraron un 20% de sobrevivencia en un suelo sin esterilizar y un 60% en un suelo esterilizado. La presencia de micorrizas en el sustrato sin esterilizar ayudó a incrementar el porcentaje de sobrevivencia de las plantas con los hongos H3 y *Glomus* excepto con el hongo PN con el cual se observó un mayor porcentaje de sobrevivencia en el suelo esterilizado (Cuadro 5).

El desarrollo de las plantas que crecieron en un suelo no estéril y estéril sin inóculo fue bastante inferior comparado con aquellas que crecían en suelos inoculados con micorrizas.

Cuadro 5. Efecto de la micorrización con tres diferentes hongos en plantas de pilón enraizadas *in vitro* y aclimatadas en invernadero

Tipo de inóculo	Tipo de suelo	
	Estéril % sobrevivencia	No estéril %
sobrevivencia		
Sin inóculo	60	
Con inóculo <i>Glomus m.</i>	50	
Sin inóculo		20
Con inóculo <i>Glomus m.</i>		70
Con inóculo H3		60
Con inóculo H3	20	
Con inóculo PN		20
Con inóculo PN	70	

Los estudios preliminares indicaron que se daba la colonización de las raíces por estos hongos pero no se contó con los recursos ni el tiempo para estos estudios.

DISCUSIÓN

Comparando los resultados obtenidos utilizando zeatina y los obtenidos en los estudios anteriores a éste, es evidente que la citocinina más efectiva para la inducción de yemas nuevas en pilón es la benciladenina. La zeatina ha mostrado ser una citocinina débil en la inducción de yemas nuevas en algunas especies (Fratini y Ruiz 2002, Chengalpayan y Gallo-Meagher 2001) pero ha sido más fuerte que otras citocininas en el alargamiento de estas yemas (Boggetti, Jasik y Mantell 1999). También queda demostrado con este estudio que el enraizamiento de microestacas de *Hyeronyma alchorneoides* responde mejor a un medio de cultivo M&S (1962) a la mitad de su concentración y que una concentración de 0.1 mg.l⁻¹ de IBA es suficiente para obtener un 80% de enraizamiento de microestacas y un número promedio de 5.0 raíces por planta.

Un valor máximo de 80% de enraizamiento de los tallos demuestra que se logra el enraizamiento de esta especie, pero a la vez que presenta alguna dificultad para su enraizamiento ya que hay un 20% de plantas que no enraizan. Al transferir estas plantas enraizadas al invernadero, puede obtenerse hasta un 0% de sobrevivencia si estas plantas son cultivadas en un suelo no estéril y tan solo un 60% de sobrevivencia en suelo esterilizado. Razón por la cual fue necesario mejorar el sistema de enraizamiento de las plantas para incrementar el porcentaje de enraizamiento, el cual incrementó un 10% , lográndose además mejorar el desarrollo de las plantas y su apariencia. Se logró mejorar el desarrollo de las plantas y su apariencia.

Pierik 1988 menciona que en algunos casos, en la transferencia de plantas desarrolladas *in vitro* a suelo se obtiene muy poco éxito porque pueden formarse raíces débiles que no responden bien a las condiciones de campo y las micorrizas ayudan a que el sistema radical sea más fuerte. Herrera et al 1993 citado por Pierik 1988, anota que la asociación de micorrizas con raíces es benéfica para las plantas aún en suelos donde los recursos son limitantes.

Este estudio preliminar utilizando micorrizas con esta especie forestal, nos da un indicio favorable de que pilón puede ser colonizada por micorrizas y un estudio sobre esto nos permitiría mayores herramientas para mejorar los sistemas de producción de esta especie por cultivo de tejidos. El uso de micorrizas en la aclimatación de las plantas de pilón incrementan el porcentaje de sobrevivencia en invernadero y contribuyen con su desarrollo.

Por tanto, es necesario de más estudios para determinar la colonización de las micorrizas en las plantas y el tipo de micorriza apropiado para la especie.



Figura 2: Plántula de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) enraizada en condiciones *in vitro*.

Literatura citada

BOGGETTI R., JASIK J., MANTELL S. 1999. In vitro multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. *Plant Cell Reports*. 18:456-461.

CHENGALPAYAN K., GALLO-MEAGHER M. 2001. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant*. 434-439.

COSEFORMA. 1998. Pílon, en la Zona Norte de Costa Rica. MINAE/GTZ/ITCR/CCF. San José, Costa Rica.

FRATINI R., RUIZ M.L. 2002. Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 46-51.

GAMBOA, K. 1998. Propagación *in vitro* de *Hyeronima alchorneoides*, especie maderable nativa de Costa Rica. Practica de Especialidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

PUTHUR J.T., PRASAD K., SHARMILA P., SARADHI P. 1998. Vesicular arbuscular mycorrhizal improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 41-47.

VALVERDE CERDAS, L. 1998. Embriogénesis somática en pílón (*Hyeronima alchorneoides*). In: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO/FAO, La Habana, Cuba. Junio 1-5.

MICROPROPAGACIÓN DE CAOBA (*Swietenia macrophylla*)

INTRODUCCION

Los bosques tropicales son biológicamente los ecosistemas más ricos sobre la tierra. Desafortunadamente, también están siendo destruidos más rápidamente que cualquier otro. Los bosques en Latinoamérica merecen atención especial, tanto porque la región contiene más de la mitad - 57% - de los bosques tropicales remanentes en el mundo, como por las tasas alarmantes a las que están siendo eliminados. En la actualidad se reconoce ampliamente que los efectos devastadores de ciertos eventos climáticos, se ven incrementados por la eliminación masiva de bosques a lo largo de grandes áreas. La eliminación de los bosques tropicales tiene repercusiones más allá de los trópicos: los bosques juegan un papel vital en el ciclo del carbono, al captar y fijar eficientemente el CO₂ y otros gases atmosféricos. De esta manera contribuyen a reducir el llamado "efecto invernadero", mantener el balance climático y posiblemente, permitir la vida sobre la tierra.

En América Central y el Caribe hay un número importante de especies de árboles forestales en inminente peligro de erosión genética e incluso de extinción local ó global. La deficiente legislación en la mayoría de estos países, donde se permite la tala de especies endémicas, raras o amenazadas, ha ocasionando una sobreexplotación del bosque, a tal grado que muchas especies hoy día sólo presenten poblaciones reducidas y fragmentadas, que manifiestan como consecuencia una alta erosión genética.

Por su parte, los esfuerzos de reforestación en América Central y el Caribe se ha realizado hasta ahora con un número reducido de especies, mayormente exóticas. Sin embargo, cada vez con mayor frecuencia, los finqueros expresan interés de plantar especies nativas raras o preciosas, de las cuales existe poca información para su cultivo y la ausencia de fuentes semilleras confiables que garanticen plantaciones de buena calidad y alta productividad.

Todas estas razones nos han llevado a realizar esfuerzos conjuntos en el campo de la propagación vegetativa, en primer lugar para evitar su desaparición, y posteriormente para permitir la ejecución de programas de desarrollo forestal como una forma de mitigar los efectos de futuros eventos climáticos catastróficos, aumentar la biodiversidad, facilitar la recuperación económica de estos países, la creación de empleos para los habitantes de las zonas rurales y contribuir a mejorar el nivel de vida la población en general.

En particular la Caoba (*Swietenia macrophylla*), Melliaceae, especie nativa de los bosques húmedos desde el sur de México hasta la cuenca del Amazonas. La madera es durable, de fácil secado y moderadamente resistente al contacto con el suelo, pero no es resistente al ataque de termitas. La madera de caoba es considerada como una de las mejores y más cotizadas del mundo. Es una especie amenazada y en la actualidad es escasa. La experiencia en micropropagación de caoba es limitada, sin embargo, los resultados obtenidos

a la fecha indican la necesidad de continuar esfuerzos para lograr el desarrollo de un eficiente sistema de multiplicación vegetativa de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La investigación en micropropagación de caoba se realizó en los Laboratorios de Biotecnología del CATIE. Como explantes se utilizó ápices del vástago y microestacas derivadas del enraizamiento de estacas no lignificadas de árboles adultos y establecidas en el invernadero desde hace 5 años. Estas plantas son mantenidas en maceteros en el invernadero y tratadas sistemáticamente para su control fitosanitario. Para este fin se realizan aplicaciones de Benlate y Agrimicin en dosis de 3 g/l cada 15 días y aplicaciones de fertilizante 10-30-10 o Nutrán y Abono foliar (Nitrofosca) con una regularidad de 2 meses.

Las podas son realizadas sistemáticamente mediante la toma de los explantes para cada introducción *in vitro* o mediante podas de mayor profundidad, para la obtención de brotes más juveniles.

CULTIVO DE MICROESTACAS

Desinfección de los explantes

Después de evaluar diferentes tratamientos de desinfección se seleccionó para los ensayos posteriores el tratamiento que consiste del lavado de las ramas con agua y jabón, seguido de la inmersión en hipoclorito de calcio al 10% durante 20 minutos, para finalizar con tres enjuagues en agua destilada estéril.

Establecimiento del explante primario

El establecimiento de cultivos *in vitro* se inició utilizando microestacas de un sólo nudo las cuales fueron cultivadas bajo las condiciones de cultivo establecidas por Orellana (1997). No obstante, también se evaluó el efecto del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 0.5 mg/l de 2-ip y BAP utilizadas conjuntamente y por separado; 3 % de sacarosa; 7 g de agar y el pH fue ajustado a 5,7. En las introducciones siguientes se ha utilizado como testigo el MS suplementado con 0.5 mg/l de BAP.

Fase de multiplicación

En la fase de multiplicación se utilizó el medio semisólido de Shenk y Hildebrandt (SH) completo en su formulación de sales minerales, suplementado con 15 g/l de sacarosa y agar-agar (7g) como gelificante. Con el fin de asegurar la existencia de brotes de buen desarrollo para ser utilizados durante esta fase, se realizaron dos ensayos independientes. El primero consistió en evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa (10 – 15 – 20 – 30 - 40 y 50 g/l) sobre el desarrollo del brote primario. Asimismo, se evaluó el efecto

individual de reguladores del crecimiento (AIB / 2, ip) en concentraciones de 0 - 0.5 - 1.0 - 1.5 - 2.0 mg/l.

También se evaluó el efecto de reciclaje o recultivo del explante primario después de aislado su brote inicial. El reciclaje consiste en aislar el brote primario y volver a cultivar el explante inicial para originar una segunda generación de brotes aprovechando las yemas axilares de la base del brote adherida la explante primario. En este caso se utilizó el mismo medio de cultivo (SH) de la fase de multiplicación, suplementado con 3% de sacarosa y con diferentes concentraciones de 2 ip, BAP y Kinetina , para evaluar el efecto individual de estos reguladores sobre la emisión de brotes en segunda generación. Se evaluó concentraciones de 0.5 - 1.0 - 2.0 y 4.0 mg/l de cada una de estas sustancias.

Asimismo, se analizó el efecto de diferentes medios de cultivo utilizados en otras especies (Anexo 1) con el fin de favorecer la brotación y el desarrollo de los brotes. Como tratamiento testigo se utilizó el medio de cultivo MS, suplementado con 0.5 mg/l de BAP y 15 g/l de sacarosa.

CULTIVO DE ÁPICES DEL VASTAGO

Además se evaluó la respuesta a la brotación del cultivo de ápices tomados de plantas de invernadero. En este ensayo la desinfección consistió en una inmersión en Benlate, Agrimicyn y Ferbán a una concentración de 5g/l durante 30 minutos, seguido de un lavado con agua destilada estéril y de una doble desinfección con hipoclorito de calcio al 10% durante 20 minutos e hipoclorito de calcio al 8% durante 15 minutos con 3 enjuagues en agua destilada estéril después de la desinfección con hipoclorito.

Estos explantes se cultivaron en el medio de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 15 g/l de sacarosa, diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento, según se muestra en los resultados de los Cuadros 6 y 7. En el Cuadro 6 también se evalúa el efecto del tamaño del ápice sobre la respuesta a la brotación y desarrollo de los brotes. En este ensayo sólo utilizó 0.5 mg/l de BAP, tratamiento utilizado en los otros ensayos como testigo. En todos los casos los medios fueron solidificados con agar-agar (7g) como gelificante. El cultivo fue realizado durante dos meses con cambios a medio fresco sin reguladores del crecimiento cada mes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CULTIVO DE MICROESTACAS

El principal problema de la limpieza de explantes que vienen del invernadero es que depende de los periodos de lluvias y de la alta humedad relativa en el ambiente. Sin embargo, la aplicación de fungicidas y antibióticos durante la desinfección y por largos periodos de tiempo durante el cultivo es tóxica para los explantes y una vez que estos son eliminados del medio, aparece

nuevamente la infección. Dados estos problemas se procede a realizar la desinfección menos estresante para los explantes y que a la vez nos garantice la recuperación de algún material sano que nos permita continuar con las etapas posteriores del proceso.

Durante el cultivo primario de las microestacas utilizando la concentración de reguladores recomendada por Orellana (1997) no hubo respuesta para explantes de material adulto. Al utilizar las concentraciones por separado se obtuvieron porcentajes de brotación de hasta el 80% y un desarrollo posterior de los brotes hasta en un 76 % de los explantes tratados con 0.5 mg/l de 2-ip. Cuando se utilizó la BAP en la misma concentración (0.5mg/l) se obtuvieron valores similares de brotación, sin embargo, el porcentaje de brotes desarrollados fue inferior, sólo del 43% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Brotación y desarrollo de brotes en cultivo primario (medio de iniciación)

Tratamientos	Brotación (%)	Alargamiento del Brote (%)
Primera repetición		
2-ip (0.5 g/l)	78	76
BAP (0.5 g/l)	58	42
Segunda repetición		
2-ip (0.5 g/l)	80	50
BAP (0.5 g/l)	80	43

Bajo estas condiciones de cultivo la brotación se produce en la mayoría de los casos, aunque el brote permanece en buen estado por corto tiempo (15 días en promedio), después de este periodo es necesario separar el brote del explante primario e iniciar un nuevo ciclo de cultivo.

Algunos de los problemas observados durante el desarrollo de brotes es la defoliación, la presencia de entrenudos cortos agrupados en el extremo distal del brote, o bien, el desarrollo de una sola hoja con un largo peciolo (Figura 1a).

Cuando se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa (Cuadro 2), éste no fue significativo con relación a las variables evaluadas (longitud de brotes, número de brotes). No obstante el mejor promedio para longitud de brotes fue obtenido en presencia de 15g de sacarosa y el mayor número de brotes se observó en tres de las concentraciones utilizadas(15, 40 y 50 g).

Cuadro 2: Número y longitud de brotes axilares primarios de caoba obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa. Significancia según la Prueba de Tukey al 5%.

Concentración de sacarosa (g/l)	Nº Promedio de brotes	Longitud promedio de brotes (cm)
10	2.2 a	0.6680 a
15	2.8 a	1.1780 a
20	2.4 a	1.1100 a
30	2.4 a	0.7280 a
40	2.8 a	0.8760 a
50	2.8 a	1.0240 a

El efecto de diferentes concentraciones de 2-ip y AIB sobre el número y longitud del brote primario sólo mostró diferencias significativas con respecto al número de brotes obtenido en presencia de 0.5 mg/l de AIB (Cuadro 3). No obstante que esta concentración también resultó superior para la variable longitud del brote, aún cuando no hay diferencias significativas con relación a los otros tratamientos. Se observó que concentraciones superiores de este regulador significaron una drástica reducción del número de brotes y también de una longitud menor de los mismos.

Cuadro 3: Número y longitud de brotes axilares primarios de caoba obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de 2-ip y AIB (mg/l). Significancia según la Prueba de Duncan al 5%.

Concentración de 2, ip (mg/l)	Nº Promedio de brotes	Longitud promedio de brotes (cm)
0.0	3.41 a	1.0450 a
0.5	3.41 a	1.0958 a
1.0	3.50 a	1.0800 a
2.0	3.41 a	1.1500 a

Concentración de AIB (mg/l)	Nº Promedio de brotes	Longitud promedio de brotes (cm)
0.0.	3.5000 ab	1.1250 a
0.5	3.8333 a	1.1500 a
1.0	3.3333 ab	1.0583 a
2.0	3.0833 b	1.0417 a

En la fase de multiplicación el efecto individual de diferentes concentraciones de 2-ip, BAP y Kinetina mostró la superioridad para todos los tratamientos con BAP sobre la emisión y desarrollo de brotes secundarios de los explantes reciclados (Cuadro 4). La concentración de 0.5 mg/l de BAP produjo el mayor número de brotes por explante.



Figura 1: Formación y desarrollo de brotes primarios y secundarios. a. Brote primario obtenido en el medio de cultivo básico sin reguladores del crecimiento. b. Brotes secundarios formados en presencia de 0.5 mg/l de BAP.

Cuadro 4: Número promedio de brotes axilares de caoba obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de 2ip y AIB (mg/l). Significancia según la Prueba de Tukey al 5%.

Concentración de 2, ip (mg/l)	Nº Promedio de brotes
0.5	1.1000 ab
1.0	0.8667 ab
2.0	1.2667 ab
4.0	0.4833 b

Concentración de BAP (mg/l)	Nº Promedio de brotes
0.5	2.4500 a
1.0	1.8667 ab
2.0	1.6667 ab
4.0	1.9333 ab

Concentración de KINETINA (mg/l)	Nº Promedio de brotes
0.5	1.1000 ab
1.0	0.6500 b
2.0	1.0000 ab
4.0	0.9000 ab

En la Figura 1 se muestra la formación y desarrollo de brotes primarios (Fig.1a) y secundarios (Fig.1b). Puede observarse la superioridad en el desarrollo de los brotes secundarios formados durante el reciclaje del explante primario (Fig.1b) con relación al pobre desarrollo de los brotes individuales desarrollados en el explante primario (Fig.1a). Las diferencias entre el efecto de la BAP y la 2-ip a concentración de 0.5 mg/l no son muy claras, no obstante, los resultados muestran que la BAP parece favorecer el número de brotes formados y el desarrollo de los mismos, principalmente en la segunda generación, durante el reciclaje del explante primario.

Independiente de la citocinina utilizada, debe destacarse la importancia de la práctica de reciclaje, la cual permitió en algunos casos la obtención de más de dos brotes por explante, así como el desarrollo de brotes más vigorosos con entrenudos alargados. Brotes con este desarrollo permiten continuar con el estudio de la fase de multiplicación, así como iniciar con la fase de enraizamiento.

Cuando se evaluó diferentes medios de cultivo utilizados en otras especies (Anexo 1), el porcentaje de brotación y el número de brotes producidos durante dos ciclos de recultivo de microestacas no mostró grandes diferencias entre los tratamientos utilizados (Cuadro 5), principalmente para el

testigo y el medio de cultivo identificado como RD utilizado para el cultivo de microestacas de cacao (Lardet *et al.*, 1998).

Cuadro 5. Porcentaje de brotación y rebrotación obtenidos después del cultivo primario y recultivo de explantes nodales de caoba.

a. Ensayo 1.

Tratamiento	Nº Explantos	Explante Primario			Explante Secundario		Nº Total Brotos
		% Brotación	Nº Brotos	Nº Rebrotos	Nº Brotos	Nº Rebrotos	
Testigo	22	82	18	29	19	30	96
Medios RD	21	76	16	19	25	31	91
Medios MB/MA	22	73	16	19	29	36	100

b. Ensayo 2.

Tratamiento	Nº Explantos	% Brotación	Explante Primario		Explante Secundario		Nº Total Brotos
			Nº Brotos	Nº Rebrotos	Nº Brotos	Nº Rebrotos	
Testigo	22	73	16	30	25	33	104
Medios RD	21	86	18	22	24	27	91
Medios MB/MA	22	59	13	17	24	30	84

Asimismo se observa que aunque el tratamiento MB/MA presenta en general el menor porcentaje de brotación y el menor número de brotes primarios, el número de brotes después del recultivo es casi igual o en algunos casos superior al observado en los otros tratamientos. Estos medios de cultivo han sido utilizados con mucho éxito en el cultivo de microestacas de *Hevea brasiliensis* (Perrin *et al.*, 1994).

Además, tal como se esperaba, el número de rebrotos siempre es mayor al número de brotes formados, principalmente en el recultivo del explante secundario (Figura 2). Este fenómeno ha sido observado en otras especies como *Hevea brasiliensis* (Perrin *et al.*, 1994). Esto se debe principalmente a que durante el recultivo o reciclaje del explante primario o secundario, en la base del brote inicial existen varios nudos con sus yemas los cuales debido a la falta de alargamiento de los entrenudos se agrupan en la base y hasta en cultivos posteriores estas yemas son desarrolladas. Además, es muy posible que durante las etapas previas de cultivo y recultivo del explante primario suceda algún mecanismo de rejuvenilización, lo cual facilite y estimule el desarrollo de yemas en cultivos posteriores.



Figura 2: Brotes de caoba en diferentes estadios de desarrollo. A) Explante inicial con brotes múltiples. B) Desarrollo de brotes de caoba después del recultivo. C) Conjunto de brotes de caoba.

CULTIVO DE ÁPICES

El cultivo de ápices representa una opción interesante de micropropagación ya que permite la clonación conforme de la planta que se quiere propagar, favorece la rejuvenilización de explantes maduros y representa una

metodología interesante para la conservación de germoplasma, principalmente por medios criogénicos, a través de la técnica de encapsulación - deshidratación.

En el Cuadro 6 se observa que el porcentaje de brotación de los ápices está directamente determinado por el tamaño de los mismos, es decir que a mayor tamaño del explante, existen mayores posibilidades de brotación. Proporcionalmente al número de explantes introducidos, aquellos de mayor tamaño desarrollaron mayor número de brotes, lo cual también influyó en la calidad de los mismos tanto en su capacidad de crecimiento longitudinal (% de brotes con alargamiento) como en el número de hojas desarrolladas en cada brote.

Cuadro 6. Cultivo *in vitro* de ápices del vástago de diferente tamaño (mm) provenientes de plantas madre de caoba creciendo en condiciones de invernadero.

Nº Explantes	Tamaño ápice (mm)	% Brotación	Nº Brotes	% Alargamiento	% Brotes con Hojas
19	2	74	14	21	14
14	3	86	12	58	67
11	4	100	11	73	73

El Cuadro 7 muestra la evaluación de diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y AIB. No se observan resultados que permitan reflejar una relación gradual entre el incremento o reducción en las concentraciones de BAP y AIB y el porcentaje de brotación y el número de brotes desarrollados. No obstante, es evidente el efecto positivo de la combinación de ambos reguladores, el cual se refleja en porcentajes de brotación de hasta el 50 % cuando se utilizó la mezcla de 2 mg/l de BAP con 0.5 mg/l de AIB, o bien la combinación de 0.5 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB lo cual permitió un 45 % de brotación. Estos tratamientos permitieron el desarrollo de 10 y 9 brotes respectivamente.

Cuadro 7. Cultivo *in vitro* de ápices del vástago provenientes de plantas madre de caoba creciendo en condiciones de invernadero. Se utilizó 20 explantes por cada tratamiento.

TRATAMIENTO mg / l	% Brotación	Nº Brotos
BAP 0.5 (Testigo)	25	5
BAP 1	10	2
BAP 1.5	25	5
BAP 2	20	4
AIB 0.1	10	2
AIB 0.25	5	1
AIB 0.5	5	1
BAP 0.5 + AIB 0.1	30	6
BAP 0.5 + AIB 0.25	5	1
BAP 0.5 + AIB 0.5	45	9
BAP 1 + AIB 0.1	40	8
BAP 1 + AIB 0.25	15	3
BAP 1 + AIB 0.5	0	0
BAP 1.5 + AIB 0.1	10	2
BAP 1.5 + AIB 0.25	0	0
BAP 1.5 + AIB 0.5	25	5
BAP 2 + AIB 0.1	10	2
BAP 2 + AIB 0.25	25	5
BAP 2 + AIB 0.5	50	10

Además se observa que en el tratamiento testigo (0.5 mg/l de BAP) la respuesta es intermedia comparativamente con estos tratamientos más exitosos.

Literatura citada

LARDET, L., AGUILAR, M.E., MICHAUX-FERRIERE, N., BERTHOULY, M. 1998. Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 34:34 – 40.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:53-58.

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

PERRIN, Y.; LARDET, L.; CARRON, M.P. 1994. Rajeunissement de clones matures d'*Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) par microgreffage *in vitro*. *Can. J. Plant Sci.* 74: 623-630.

CRIOCONSERVACIÓN

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, el almacenamiento de semillas de especies ortodoxas (semillas que pueden ser deshidratadas hasta bajos contenidos de humedad, 5%, y resisten el almacenamiento a bajas temperaturas, entre 5°C y -20°C) se realiza corrientemente bajo estas condiciones, en los llamados bancos de semillas y el material puede permanecer almacenado por largos periodos sin que sufra grandes pérdidas de viabilidad (Villalobos y Engelmann, 1995).

Para las especies problemáticas para el almacenamiento, denominadas recalcitrantes, este tipo de conservación es imposible, ya que no resisten una alta desecación ni el almacenamiento a bajas temperaturas. Este es el caso de muchas especies tropicales. Las mayoría de las semillas de especies recalcitrantes se caracterizan por ser relativamente grandes y ser letalmente dañadas por la deshidratación, formando los cotiledones o el endospermo, la mayor parte de la semilla. Otra de las características más comunes es la ausencia de un periodo de latencia (Engelmann y Takagi, 2000).

La crioconservación, una opción de almacenamiento originada del cultivo *in vitro*, se reconoce como la única opción disponible para el almacenamiento, a largo plazo, del germoplasma de especies propagadas vegetativamente y especies con semillas clasificadas como recalcitrantes e intermedias en cuanto al almacenamiento. Se considera análoga a los bancos de semillas para especies ortodoxas (Engelmann, 2000).

Desde hace más de cincuenta años, cuando se demostró por primera vez la posibilidad de crioconservar eficientemente esperma animal, la técnica se ha experimentado en campos diversos para almacenar células vivas por largos periodos y aún indefinidamente. La crioconservación se emplea para el almacenamiento de esperma y embriones de animales y humanos, que se utilizan para inseminaciones artificiales y fertilizaciones *in vitro*. También se utiliza para el almacenamiento de eritrocitos y ha sido aceptado como el método óptimo para la conservación de la diversidad microbiana. En plantas, la posibilidad de crioconservar desde células hasta órganos ha sido demostrada ampliamente, al igual que su utilidad para la conservación de germoplasma y de material generado en condiciones de laboratorio (McLellen y Day 1995, Abdelnour, 1996).

La crioconservación es también conocida como sistema criogénico de conservación, se define como un grupo de técnicas que permiten el almacenamiento de organismos vivos en un estado de suspensión animada por periodos extensos. El almacenamiento se realiza a ultra bajas temperaturas, lo que resulta eficiente para detener el reloj biológico de los organismos. Consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológicamente normal, hasta ultra bajas temperaturas (generalmente en nitrógeno líquido, -196°C). A esta temperatura la división celular y los procesos metabólicos

cesan, por lo que el material puede permanecer almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones o alteraciones. Sin embargo, el éxito del proceso dependerá del acondicionamiento que se dé al material para que resista tanto el congelamiento como el descongelamiento. El acondicionamiento consiste en provocar una deshidratación protectora en las células y tejidos de manera que se evite o disminuya la formación de cristales de hielo que provoca grandes daños en las membranas de la gran mayoría de las células (Villalobos y Engelmann 1995, Abdelnour, 1999).

La utilización de nitrógeno líquido asegura las ultra bajas temperaturas (entre -196°C y -150°C dependiendo de que el material permanezca en la fase líquida o gaseosa del nitrógeno) y la no dependencia de la electricidad. Además, el nitrógeno líquido puede adquirirse fácilmente y no es inflamable. Como el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección en el laboratorio es pequeño ($0,5\text{ m}^2$ para un tanque de almacenamiento con capacidad para 100 L de nitrógeno líquido y miles de muestras), el costo por labor y mantenimiento es mínimo, siendo la única labor rutinaria el llenado del tanque cada semana o semana de por medio, para que el nitrógeno líquido permanezca a un nivel mínimo de seguridad, lo que no toma más de 15 minutos del tiempo del asistente o técnico del laboratorio. Además, una vez almacenados los materiales, no se manipulan, se encuentran protegidos de posibles agentes contaminantes y en caso de necesitarse una muestra específica, ésta puede ser descongelada y las plantas recuperadas y multiplicadas en corto tiempo (Abdelnour, 1999; Engelmann 2000).

Experimentando con la técnica de crioconservación en semillas de varias especies recalcitrantes, la autora encontró que estas sobrevivían el congelamiento en nitrógeno líquido y eran capaces de germinar y formar una nueva planta bajo condiciones *in vitro*. El objetivo de esta investigación fue evaluar la técnica de crioconservación conocida como desecación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido en varias especies forestales que presentan problemas de almacenamiento a largo plazo en bancos de semillas convencionales y lograr su recuperación como plantas en condiciones de *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los ensayos de crioconservación de semillas se utilizaron semillas donadas por el Banco de Semillas Forestales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y la investigación fue realizada en el Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR. Estas semillas fueron deshidratadas utilizando una cámara de desecación que contenía sílica gel y ventilación, hasta que alcanzaron porcentajes de humedad entre el 6% y el 12%.

Aquellas semillas que presentan cubierta seminal dura, como la teca y el pilón, se efectuó un lijado de la misma y todas fueron tratadas con 10 mg/l de ácido giberélico (GA_3). El congelamiento se efectuó por inmersión directa de las semillas en el nitrógeno líquido (NL). La descongelación se llevo a cabo manteniendo las semillas a temperatura ambiente por 20 min. Para evaluar la

sobrevivencia, las semillas fueron sembradas en un sustrato esterilizado compuesto por tierra:granza de arroz (2:1). La sobrevivencia se evaluó con base en el porcentaje de semillas germinadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 1: Sobrevivencia de las semillas de teca (*Tectona grandis*), pilón (*Hyeronima alchorneoides*) y cedro (*Cedrela odorata*) después del congelamiento en nitrógeno líquido.

Tratamientos	%Germinación	
	-NL	+NL
Deshidratación		
Teca	40	50
Pilón	0	0
Cedro	40	23
Deshidratación + incubación en GA ₃ 1 hora antes de la siembra		
Teca	20	47
Pilón	3,3	0
Cedro	23	33
Semillas lijadas y sumergidas en GA ₃ 1 hora antes de la siembra		
Teca	53	60
Pilón	0	0
Caoba	-	-

Cuadro 2: Sobrevivencia de las semillas de cenízaro y madero negro después de la deshidratación al 8% de humedad y del congelamiento en nitrógeno líquido.

Tratamientos	%Germinación	
	-NL	+NL
Deshidratación		
Cenízaro	40	3
Madero negro	91	53

Todas las semillas de las especies estudiadas fueron capaces de sobrevivir el congelamiento en nitrógeno líquido. Debido a que todas estas semillas fueron obtenidas de un banco convencional de semillas (almacenadas bajo condiciones que no serían las más adecuadas para este tipo de semillas), no es de extrañar que los porcentajes de germinación fueran bajos, aún sin los tratamientos de congelación. La única especie que no mostró sobrevivencia fue el pilón, sin embargo, por estudios previos se conoce que esta especie es verdaderamente recalcitrante y pierde su capacidad de germinación de 3 a 4 días después de la cosecha si no se trata apropiadamente. Además, los resultados obtenidos nos impulsaron a estudiar el estado de las semillas y

decidir si utilizar solamente el embrión para los procesos de almacenamiento. Después de evaluar el interior de dos lotes de semillas se encontró que el 90% de las mismas se encontraban dañadas por avispas de la familia Eurytomidae, importante plaga de esta especie forestal.

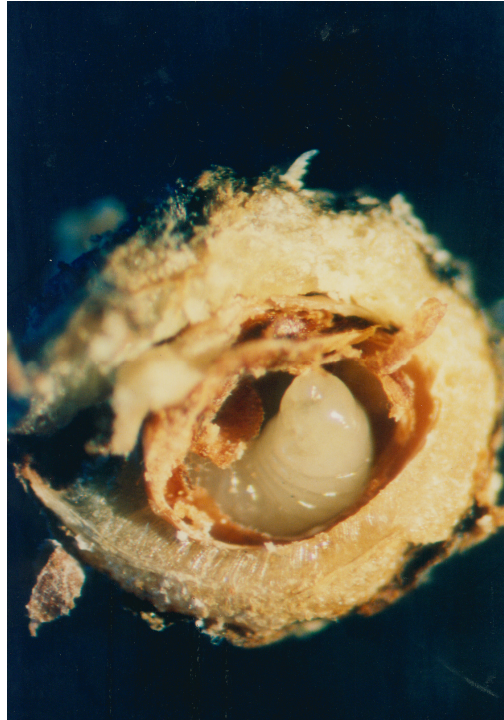


Figura 1: Semilla de pilón dañada por larva de una avispa de la familia Eurytomidae.

En general, estos resultados indican el potencial de la técnica de crioconservación para el almacenamiento de las semillas de especies forestales.

A la vez, los resultados señalan la importancia de dirigir esta investigación a establecer las condiciones óptimas en que deben estar las semillas, tanto a la hora de la colecta, como a la hora de realizar el congelamiento, ya que estas dos etapas del proceso son críticas, de manera que se puedan obtener resultados confiables y metodologías eficientes y sencillas de conservación para estas especies problemáticas para el almacenamiento a largo plazo.

Literatura citada

ABDELNOUR, A. 1999. Situación actual y perspectivas de las aplicaciones biotecnológicas en la conservación y uso de los recursos fitogenéticos. XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Memoria: Manejo de Cultivos. UNED, Colegio de Ingenieros Agrónomos. San José, Costa Rica. Pp. 299-306.

Engelmann, F. y Tagaki, H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Jircas, Japón / IPGRI, Roma. Pp. 140-155.

VILLALOBOS, V.M.; ENGELMANN, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. World Journal of Microbiology & Biotechnology 11: 375-382.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con el establecimiento de plantaciones forestales de alta calidad y productividad se asegurará la producción de madera a largo plazo, la sostenibilidad de las tierras y la industria forestal, generadora de productos para el consumo nacional y la exportación. Esta actividad deberá apostar a la investigación que se realiza en el país con las especies más promisorias y entre las investigaciones más urgentes están aquellas dirigidas al mejoramiento genético. Es aquí donde los trabajos que se realicen en la selección y multiplicación clonal de los árboles más sobresalientes les dará los frutos que esperan en relativamente corto tiempo, comparado con el tiempo que se invertiría en el mejoramiento convencional. Los productores forestales no están familiarizados con estas técnicas y están evaluando los resultados de sembrar material vegetativo obtenido a través del enraizamiento de brotes o estacas. Una vez comprendido el proceso buscarán técnicas que aceleren los procesos de reproducción y el cultivo de tejidos será la alternativa a adoptar. Es por esta razón que las investigaciones dirigidas a desarrollar los protocolos de micropropagación masiva deberán estar disponibles.

Durante la presente investigación se demostró que la micropropagación de teca, pilón y caoba es posible. Se obtuvo la multiplicación y aclimatación de los explantes establecidos en condiciones *in vitro*. Con las plantas de teca producidas *in vitro* se logró establecer una parcela experimental en campo.

Se recomienda:

- Establecer una cantidad grande de plantas madre en invernadero, bajo un control fitosanitario permanente, para tener una fuente constante de material experimental, de manera que se puedan validar los resultados obtenidos.
- Repetir los ensayos que presentaron los mejores resultados para validar la metodología desarrollada en este proyecto, de manera que se pueda recomendar sin dudas, un protocolo de propagación masiva de estas especies para su producción comercial..
- También se recomienda continuar la investigación en producción masiva de estas especies y determinar los tiempos y costos de producción.

ANEXO 1

- **Medio de cultivo RI/RD (Root Development and Maintenance Medium) utilizado en cacao.**

DKW macro A (IOX)	50.0 ml
DKW macro B (I OX)	50.0 ml
DKW micro (10OX)	5.0 ml
DKW vitamins (IOOOX)	0.5 ml

KN03	0.3 g
Glucose	10.0 g
Sucrose	5.0 g
Adjust pH to 5.8	
Phytigel	1.75 g

- **Medio DKW:** MAXIMOVA S., ALEMANNI L., YOUNG A., TRAORE A., MICHAUX -FERRIÈRE N., GUILTINAN M.J. 2000 Efficiency, origin and quality of cacao somatic embryogenesis. , Proceedings of 13th International Cocoa Research Conference, Kota Kinabalu, Sabah, Oct. 2000.

- **Medio de cultivo MB/MA (Utilizado en Hule)**

Este medio corresponde al MS suplementado con 0.25 mg/l de AIB y 0.99 mg/l de BAP y 60 g/l de sacarosa.