

Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliaceae)

Fecha de recepción: 08/12/2008

Fecha de aceptación: 28/03/2009

José Bernal Azofeifa¹

Alejandra Rojas²

Ana Hine³

Palabras clave

Swietenia macrophylla, AIA, AIB, ANA, enraizamiento, aclimatización.

Key words

Swietenia macrophylla, IAA, IBA, NAA, rooting, acclimatization.

Resumen

Swietenia macrophylla es una especie de importancia económica en América Latina debido a la calidad de su madera, por lo cual las poblaciones se han disminuido en términos de cantidad y calidad genética. Por lo anterior, la técnica de cultivo de tejidos se utilizó para optimizar el proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas, empleando

diferentes reguladores de crecimiento y medios de cultivo. El mayor porcentaje de enraizamiento (53,33%) se obtuvo en un medio de cultivo MS (1962) complementado con 5,7µM de AIA, seguido de un 26,67% cultivado en un MS ½ (1962) complementado con 2,5 µM de AIB y 0,25 µM de ANA. En la etapa de aclimatización, el mejor resultado de sobrevivencia (70%) se obtuvo con el sustrato biodegradable Jiffys®.

Abstract

Swietenia macrophylla (Mahogany) is a tree species of economic importance in Latin America due to the quality of its wood, thus the populations had been reduced in terms of its genetic quantity and quality. Therefore, the technique of

1. Esta investigación fue parte del trabajo de graduación de Bachillerato en Biología con énfasis en Biotecnología del primer autor. Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional. Correo electrónico: jbl2azo@gmail.com .
2. Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional. Código Postal 86-3000, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: aroja@una.ac.cr
3. Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional. Código Postal 86-3000, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: ahine@una.ac.cr

tissue culture was used to optimize the process of rooting and acclimatization of vitroplants, using different growth regulators and culture mediums. The highest rooting percentage (53.33%) was achieved with 5.7 μ M AIA in an MS (1962) culture medium, followed by 26.67% in an MS $\frac{1}{2}$ (1962), complemented with 2.5 μ M AIB and 0.25 μ M ANA. In the acclimatization stage the best result (70%) of plants survival was achieved with the biodegradable substrate Jiffys[®].

Introducción

La caoba (*Swietenia macrophylla* King) es una de las especies maderables más valoradas a nivel mundial por su belleza, ductilidad y durabilidad, y es usada en la fabricación de muebles de alta calidad, ebanistería, carpintería, producción de chapas finas, construcción de botes, entre muchos otros usos. Presenta una distribución natural en América Tropical desde la Península de Yucatán en México hasta la región Amazónica de Brasil, Perú y Bolivia (Maruyama e Ishii, 1997; Schottz et al., 2007).

Debido a la continua explotación selectiva, esta especie se ha deteriorado en términos de cantidad y recursos genéticos (Maruyama e Ishii, 1997), y aunque en regiones tropicales de Centro y Sudamérica se ha usado en programas de reforestación, *S. Macrophylla* es atacada severamente por el barrenador de las Meliaceae, la larva de la mariposa *Hypsipyla grandella* Zeller (Schottz et al., 2007; Nunes, 2002), la plaga más perjudicial entre la familia Meliaceae (Maruyama e Ishii, 1997), pues se alimenta de la yema apical, lo cual causa deformación y bifurcación del fuste (Tacoronte et al., 2004; Flores, 2001; Orellana, 1997).

Debido a la importancia económica y ecológica que tiene esta especie, urge tomar medidas para su mejoramiento y conservación. De este modo, una posibilidad alterna a los métodos convencionales para

evitar la erosión genética es el cultivo de tejidos, como una técnica para la propagación y conservación de clones selectos. Sin embargo, a pesar de la importancia de esta especie, pocos trabajos han realizado ensayos de enraizamiento y aclimatización (Maruyama e Ishii, 1997; Orellana, 1997; Lopes et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Tacoronte et al., 2004).

El propósito de esta investigación es tratar de optimizar un método eficaz y reproducible de enraizamiento de plántulas de caoba producidas in vitro para transferirlas a un ambiente ex vitro autotrófico, para obtener una gran cantidad de ejemplares en planes de manejo sustentables que generen capital aprovechable y de esta forma evitar la erosión genética.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Los experimentos fueron llevados a cabo con vitroplantas de caoba en fase de multiplicación, provistas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (INISEFOR-UNA).

Enraizamiento

Se evaluó el efecto de dos auxinas: ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB), para la inducción de raíces en brotes de caoba de aproximadamente 2.5 cm de longitud, en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962), complementado con 30 g de sacarosa (3% p/v) y 2.7gL⁻¹ de Phytigel. Las combinaciones de las concentraciones utilizadas para AIA y AIB fueron de 2.85, 5.7, 8.56, 11.42, 14.27, 17.12 μ M y 2.46, 4.92, 7.38, 9.84, 12.3, 14.76 μ M, respectivamente. Los cultivos fueron colocados en oscuridad durante una semana y luego fueron transferidos al cuarto de crecimiento a 25°C, 30 μ mol m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 16 horas, durante un mes y medio.

Además, se evaluó los efectos de tres medios de cultivo sobre la respuesta rizogenética de brotes de caoba. Los medios de cultivo fueron los siguientes: Murashige y Skoog (MS, 1962) a la mitad de la fuerza iónica, Lloyd y McCown (WPM, 1980) a la mitad de la fuerza iónica y Gamborg (B5, 1968), todos complementados con 30 g de sacarosa (3% p/v), 2.7gL^{-1} de Phytigel y una combinación de 2.5-0.25 μM AIB/ANA (ácido alfa-naftalen acético) propuesta por Maruyama e Ishii (1997), más un control (medio sin reguladores de crecimiento). Los cultivos fueron colocados en una cámara de crecimiento a 28 °C y $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica durante el fotoperiodo de 16 horas, y a 25 °C durante las 8 horas de oscuridad durante mes y medio.

El material fue evaluado una vez por semana según los parámetros de porcentaje de enraizamiento, contaminación, mortalidad y número de raíces por explante.

Acclimatización

Brotes de plántulas enraizadas in vitro en medio MS (1962) fueron utilizados para evaluar su crecimiento en dos sustratos diferentes (Jiffys® -turba de pantano variedad Sphagnum- y suelo). Ambos sustratos fueron autoclavados durante 30 minutos a 121 °C.

El sustrato de suelo estéril fue complementado con 3 g de hongo *Glomus fasciculatum* para formar una asociación simbiótica con la raíz del vegetal (micorriza).

Cada unidad experimental consistió de un tipo de sustrato (Jiffys® o bolsa con suelo) cultivado con una vitropianta enraizada. El total de unidades experimentales fue de 15 para cada sustrato.

Tanto los Jiffys® como el suelo permanecieron una semana cubiertos con plástico transparente en una atmósfera no controlada en el invernadero. Después de la primera semana, el plástico fue retirado completamente. La duración del ensayo hasta su análisis fue de un mes.

Los parámetros evaluados en este ensayo fueron el crecimiento y la sobrevivencia de los explantes.

Análisis estadístico

El análisis estadístico empleado para la etapa de enraizamiento fue un análisis de varianza de dos factores sin repeticiones, con datos transformados mediante el proceso RANK. El método empleado para la discriminación de las medias entre tratamientos fue el procedimiento LSD.

Para la etapa de aclimatización se realizó una Prueba t de Student usando el software Statgraphics Plus versión 5.1.

Resultados

Enraizamiento

El proceso de enraizamiento en el tratamiento 2.85 μM de AIA y en el testigo absoluto inhibieron la formación de raíces (Tabla 1). El porcentaje más alto de enraizamiento (53%) fue registrado con la concentración de 5.7 μM de la auxina AIA (Figura 1). Se observó un enraizamiento constante (13%) con las concentraciones de 8.56, 11.42 y 14.27 μM de AIA, mientras que la mayor concentración de esta misma hormona (17.2 μM), obtuvo un aumento del porcentaje de enraizamiento (26.67%), pero menor al observado con la concentración de 5.7 μM de AIA antes descrita.

Baja capacidad de enraizamiento se mostró con la auxina AIB, dado que fue inhibido completamente en las concentraciones de 2.46, 4.92, 7.38, 9.84 y 12.3 μM de AIB. Solamente la concentración de 14.76 μM reportó respuesta rizogenética (13.33 %) (Cuadro 1).

Letras diferentes representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por otra parte, los porcentajes más altos de contaminación se registraron en los tratamientos MS + AIA y el tratamiento control de $\frac{1}{2}$ WPM (54 y 53.3 respectivamente). Por otro lado, no se

Cuadro 1. Efecto de las auxinas sobre el enraizamiento de brotes apicales de *S. macrophylla* cultivados *in vitro* durante dos meses.

Reguladores de crecimiento	Concentración (μM)	Explantos probados	Explantos enraizados	Enraizamiento (%)
AIA	0.0	10	0 a ^a	0
	2.85	15	0 a ^a	0
	5.7	15	8 a ^a	53.33
	8.56	15	2 a ^a	13.33
	11.42	15	2 a ^a	13.33
	14.27	15	2 a ^a	13.33
	17.12	15	4 a ^a	26.67
AIB	0.0	10	0 a ^b	0
	2.46	15	0 a ^b	0
	4.92	15	0 a ^b	0
	7.38	15	0 a ^b	0
	9.84	15	0 a ^b	0
	12.3	15	0 a ^b	0
	14.76	15	2 a ^b	13.33

observó contaminación en el tratamiento control ni en la combinación de 2.5-0.25 μM AIB/ANA del medio $\frac{1}{2}$ MS, además del tratamiento control del medio B5.



Figura 1. Enraizamiento de brotes apicales de *S. macrophylla* King en medio MS complementado con la auxina AIA.

La mortalidad más alta se reportó en los tratamientos control del medio WPM y en el tratamiento MS + AIB (26.67 y 22, respectivamente). Mortalidad nula se presentó en los tratamientos control de los medios $\frac{1}{2}$ MS y B5.

Se reportó baja capacidad de enraizamiento *in vitro* de los brotes de caoba en tres medios de cultivo diferentes (MS y WPM a la mitad de la fuerza iónica, y B5), bajo condiciones atmosféricas controladas en una cámara de crecimiento. El cuadro 2 muestra el enraizamiento y el número de raíces promedio a partir de brotes evaluados en los medios anteriormente descritos, complementados con una combinación de auxinas y un control.

El mayor porcentaje de brotes enraizados se observó al utilizar el medio MS (1/2) complementado con 2.5 AIB - 0.25 ANA μM (Cuadro 2), pero no se observó diferencias significativas entre los medios

evaluados mediante el procedimiento LSD ($p > 0.05$) (Figura 2).

Aclimatización

Durante los 30 días del ensayo, el porcentaje de sobrevivencia de los brotes de caoba enraizados *in vitro* fue mayor cuando se cultivaron en sustratos inocuos biodegradables Jiffys® (70%), en comparación con el sustrato suelo (Figura 3), donde se obtuvo un porcentaje mínimo de

sobrevivencia (0%), datos que se confirman con el valor de probabilidad mostrado por la Prueba t-Student ($p < 0.05$).

Discusión

El enraizamiento *in vitro* varió entre los tipos de auxina. En este trabajo se reportó que el porcentaje de enraizamiento máximo (53%) fue registrado al utilizar el medio

Cuadro 2. Efecto de tres medios de cultivo diferentes complementados con 2.5 AIB - 0.25 ANA μM sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de *S. macrophylla*.

Medio basal	Concentraciones 2.5 AIB - 0.25 ANA μM	Brotos probados	Explantos enraizados	Enraizamiento (%)	Número de raíces
MS (1/2)	0.0 – 0.0	15	3	20	4
	2.5 – 0.25	15	4	26.67	6*
WPM (1/2)	0.0 – 0.0	15	0	0.0	0
	2.5 – 0.25	15	1	6.67	1
B5	0.0 – 0.0	15	2	13.33	3
	2.5 – 0.25	15	1	6.67	1

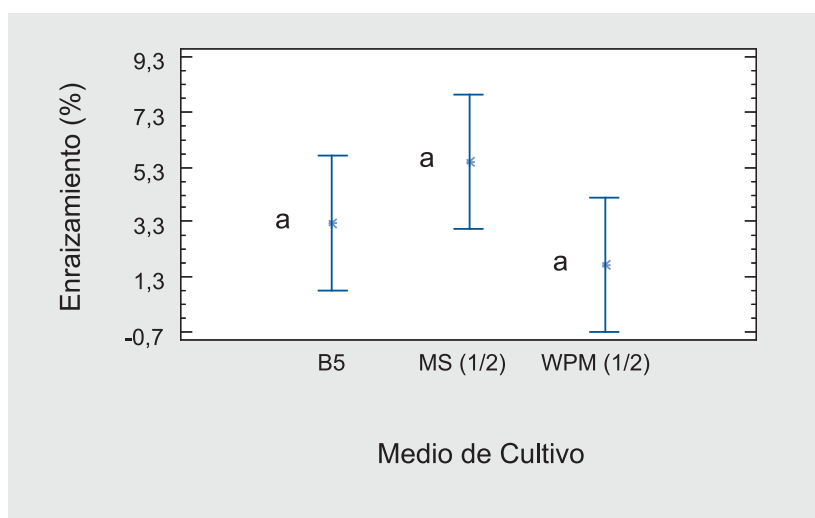


Figura 2. Efecto de tres medios de cultivo diferentes en el enraizamiento de brotes apicales de *S. macrophylla* cultivados *in vitro* durante mes y medio. La significancia estadística está representada por las letras pequeñas al 5%.

MS complementado con 5.7 μM de AIA durante 6 semanas (Figura 1). El pobre enraizamiento presentado con la auxina AIB en medio MS (Cuadro 1), no descarta la utilización de esta auxina con las mismas concentraciones en futuras investigaciones, pero se aconseja la complementación del medio de cultivo MS con concentraciones mayores a 14.76 μM .

El empleo de AIA mostró mayor respuesta de enraizamiento en comparación con AIB, por lo que existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, lo cual se corrobora con las diferencias significativas entre este tipo de auxinas ($p < 0.05$) (Cuadro 1).

Otros autores han evaluado la auxina AIB en *S. macrophylla* bajo condiciones diferentes de cultivo *in vitro* y han obtenido



Figura 3. Supervivencia de brotes apicales de *S. macrophylla* enraizados *in vitro*, cultivados en dos sustratos diferentes durante 1 mes. A= Jiffys® B= Suelo.

otros resultados. Lopes et al. (2001) obtuvo 40% de enraizamiento en medio MS complementado con las vitaminas de WPM y $0.5 \mu\text{M}$ de AIB. Además, se obtuvo un 10% de enraizamiento con $14.76 \mu\text{M}$ del mismo regulador de crecimiento. Este autor recomienda el uso de este medio de cultivo con la auxina ANA en las concentraciones de 10.74 y $26.85 \mu\text{M}$ para obtener porcentajes de enraizamiento entre 70% y 90%. Debido a que los resultados de la presente investigación no fueron los esperados, se podría implementar en futuros ensayos la metodología planteada por estos autores (Lopes et al., 2001).

La interacción del medio de cultivo, en términos de nutrientes, fuerza iónica, tipo y concentración de reguladores de crecimiento, con el estado fisiológico del explante podría explicar los resultados mostrados en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas. Además, la discordancia entre los resultados de este estudio y la literatura consultada podría estar influenciada por las variaciones en el genotipo entre individuos de la misma especie (Perik, 1990). Además, Gomborg et al. (1976) señalaron que las soluciones stock de AIA deben ser utilizadas antes de dos semanas, pero durante la ejecución del ensayo, las soluciones tenían mucho más de dos semanas.

Dado el bajo porcentaje de enraizamiento mostrado en este estudio, se podría mejorar empleando una metodología que incluya una etapa de inducción y expresión de raíces en un mismo medio de cultivo con diferentes concentraciones de auxina. Orellana (1997) recomienda pasar los brotes por un periodo de inducción corto en concentraciones altas de auxina ($422 \mu\text{M}$ de AIA, $123 \mu\text{M}$ de ANA y $23.23 \mu\text{M}$ de Cinetina), y luego por un medio de expresión con una reducción de auxina casi del 10% ($2.46 \mu\text{M}$ de AIB y $1.34 \mu\text{M}$ de ANA) para finalizar en un medio ausente de reguladores de crecimiento, con sales reducidas a la mitad y presencia de carbón activado, para obtener porcentajes de enraizamiento mayores al 70% y vitroplantas de caoba con características adecuadas para la aclimatización.

Por otro lado, durante las seis semanas que duró el ensayo, la contaminación estuvo presente por hongos y bacterias (datos no mostrados). Varias son las fuentes que pudieron haber provocado este fenómeno: contaminación del operario, cuarto de transferencia con microorganismos y pinzas entre pasajes no esterilizadas. Sin embargo, Maruyama e Ishii (1997) sugieren que la obtención de cultivos libres de patógenos en *S. macrophylla* es

difícil, debido a las bacterias endógenas presentes en las plantas donadoras, las cuales se pueden expresar después de varios pasajes.

Se observó un máximo de contaminación en los cultivos con la auxina AIB (54%), pero la mayoría de los brotes permanecieron verdes y vigorosos aún en presencia de microorganismos. Por lo tanto, no se pudo determinar si la contaminación tuvo efectos en el bajo porcentaje de enraizamiento. Lo observado sugiere que *S. macrophylla* puede sobrevivir tolerando la presencia de cierta contaminación.

Además, no se pudo inferir si la mortalidad con AIB se debía a la contaminación, ya que con AIA fue igual, pero en AIA la contaminación fue menor a la observada en AIB (figura 4). La mortalidad de especies forestales cultivadas in vitro es muy común debido a compuestos fenólicos intrínsecos que pueden oxidar los medios de cultivo y causar la muerte (George, 1996). En este ensayo, una fuente de mortalidad pudo deberse a la oxidación de algunos medios de cultivo (datos no mostrados).

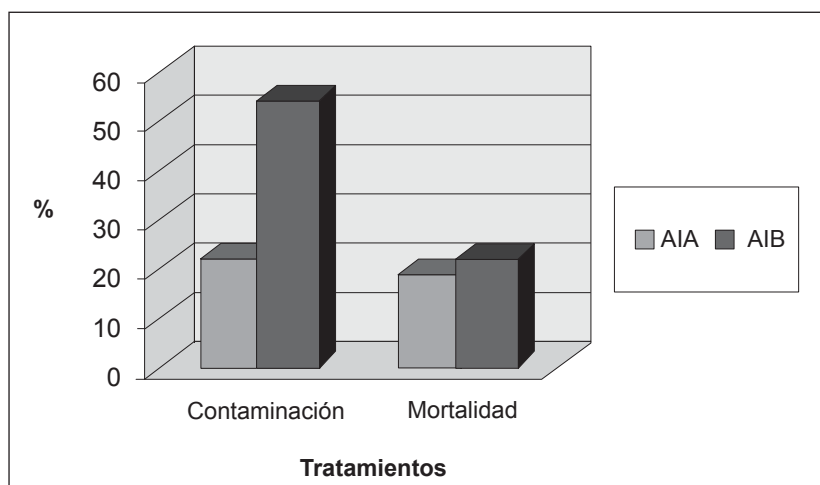


Figura 4. Porcentajes de contaminación y muerte de los brotes apicales de *S. macrophylla* durante la etapa de enraizamiento.

En el ensayo donde se evaluaron las sales de tres medios de cultivo diferentes, se observó un enraizamiento máximo (26%) al utilizar el medio MS $\frac{1}{2}$ complementado con AIB/ANA (2.5 μM

-0.25 μM) durante 6 semanas de cultivo (Cuadro 2). Los demás medios (WPM $\frac{1}{2}$, B5) complementados con la misma combinación de auxinas, mostraron bajos resultados de enraizamiento (6.67%). Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores. Enraizamiento mayor al 50% fue registrado en medio WPM $\frac{1}{2}$ con 2.5 μM de AIB, solo o en combinación con 0.25 μM de ANA, o en medio libre de reguladores de crecimiento (Maruyama e Ishii, 1997).

El medio B5 para inducir raíces en *S. macrophylla* sólo ha sido utilizado por Nakamura et al. (2002). Estos autores reportaron un porcentaje de enraizamiento del 18.5% durante dos meses de cultivo con 12.3 μM de AIB. Sin embargo, encontraron porcentajes de enraizamiento del 70% cuando cultivaron los brotes durante un mes en medio MS, el segundo mes, en B5 y el tercer mes, en MS complementado con 12.3 μM de AIB, respectivamente.

La variabilidad en el porcentaje de enraizamiento de los diferentes medios evaluados podría deberse a la variación en la concentración de amonio:nitrato y a la fuerza iónica total de cada medio (Nunes et al., 2002).

Debido al pobre enraizamiento encontrado durante la presente investigación, se aconseja realizar estudios en paralelo usando diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, variar las condiciones físicas del cultivo, así como aumentar los tamaños de las muestras.

Además, se demostró que el cultivo de brotes de caoba enraizados in vitro y el uso de un sustrato homogéneo de alta calidad como Jiffys[®], mejoró la sobrevivencia en comparación con el sustrato suelo. Se reportó un porcentaje de sobrevivencia del 70% en brotes enraizados in vitro cultivados en Jiffys[®], versus un 0% de sobrevivencia de los brotes cultivados en suelo (Figura 3).

Precisamente, los sustratos Jiffys® presentan consideraciones prácticas sobre otros sustratos que lo hacen favorable para el cultivo de casi todas las especies vegetales, por ejemplo, ayudan en la prevención de malezas y enfermedades en las raíces, estimulan el desarrollo radicular en la etapa de vivero, debido a que presentan largas estructuras celulares que les permiten absorber agua y aire como una esponja, su descomposición es lenta y no se infectan por virus ni hongos.

Estos resultados fueron muy promisorios en este trabajo, porque predijeron que la principal preocupación para la optimización del proceso de enraizamiento debe enfocarse en la búsqueda de un medio de cultivo, tipos y concentraciones de auxinas adecuadas que induzcan raíces en explantes de *S. macrophylla* y una vez enraizados los brotes *in vitro*, cultivarlos en sustratos biodegradables de turba de pantano (Jiffys®). De esta forma, se podría obtener un alto porcentaje de sobrevivencia y un crecimiento natural de la raíz.

Por otra parte, un buen sustrato en condiciones de alta humedad puede propiciar el enraizamiento de manera más eficiente en comparación con otros sustratos como el suelo. Esto se debe a que la transición de un ambiente *in vitro* (alta humedad relativa) a un ambiente *ex vitro* (con un porcentaje de humedad inferior), se minimiza en los sustratos de turba de pantano (Jiffys®), los cuales por su estructura retienen grandes cantidades de agua y aire, y poseen nutrientes que pueden ser asimilados por las raíces de las plantas para iniciar la fase autótrofa.

Bibliografía

E&E Promotora. (S.f). Jiffys: Sistema de propagación forestal: la solución natural. San José, CR. 16 p.

Flores, A. 2001. Establecimiento de las etapas iniciales de la micropropagación de caoba (*Swietenia macrophylla* King.) a partir

de microestacas tomadas de plantas de invernadero. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE.

Gamborg, O., Miller, R; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50:151-158. 1968.

Gamborg, O., Murashige, T; Thorpe, T; Vasil, I. Plant Tissue Culture Media. *In Vitro*. 12: 473-8. 1976.

George, E. Plant propagation by tissue culture. (Chapter 1: Plant tissue culture techniques). 2nd ed. UK. Editorial Exegetics. 1993. 574 p.

Lloyd, G. & McCown, B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.* 30: 421-427. 1980.

Lopes, S., Lameira, O., Fortes, G., Nogueira, R. & Pinto J. Enraizamiento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). *Cerne, Lavras*. 7: 124-128. 2001.

Maruyama, E. & Ishii, K. Tissue culture studies on Big-leaf Mahogany *Swietenia macrophylla*. In: *Proceedings International Workshop BIO-REFOR*. Brisbane. p.116-118. 1997.

Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473–497. 1962.

Nakamura, K. & Soda, Ryo. Method of large-scale propagation of trees of genus *Swietenia*. United States Patent. US 6,481,154 B1. 2002.

Nunes, E., Volkmer de Castilho, C., Netto, M. & Viana, A. *In vitro* culture of *Cedrella fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70: 259-268. 2002.

Orellana, M. A., 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King). Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE.

Perik, R. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid. Ediciones Mundi Prensa. 1990.326 pp.

Schottz, E., Nascim, A., Tracz, A., Koehler, H., Ribas, L. & Quoirin, M. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) from juvenile shoots. *Ciência Florestal, Santa Maria*, 17(2): 109-117. 2007.

Tacoronte, M., Vielma, M., Mora, A. & Valecillos, C. Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia Macrophylla* King) a partir de yemas axilares. *Acta Científica Venezolana*. 55: 7-12. 2004.