

**Universidad Nacional  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Escuela de Ciencias Biológicas  
Licenciatura en Biotecnología**

**Informe Escrito Final**

**Multiplicación masiva de genotipos seleccionados de *Tectona grandis* en medio semisólido y en Sistemas de Inmersión Temporal, como una herramienta para programas de mejoramiento genético**

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Biotecnología**

**Lucía Jiménez Corrales**

**Campus Omar Dengo,  
Heredia, 2021**

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.

**FRANK MARTIN SOLANO CAMPOS (FIRMA)** Firmado digitalmente por FRANK MARTIN SOLANO CAMPOS (FIRMA)  
Fecha: 2023.03.14 18:47:29 -06'00'

---

Dr. Frank Solano Campos

Representante del Decano, quién preside

**JOSE BERNAL AZOFEIFA BOLAÑOS (FIRMA)** Firmado digitalmente por JOSE BERNAL AZOFEIFA BOLAÑOS (FIRMA)  
Fecha: 2023.03.28 18:48:42 -06'00'

---

M.Sc. Bernal Azofeifa Bolaños

Representante del Director

**LAURA SANCHEZ CALVO (FIRMA)** Firmado digitalmente por LAURA SANCHEZ CALVO (FIRMA)  
Fecha: 2023.03.20 17:11:41 -06'00'

---

MSc. Ing. Laura Sánchez Calvo

Tutora

**ALEJANDRA ROJAS VARGAS (FIRMA)** Firmado digitalmente por ALEJANDRA ROJAS VARGAS (FIRMA)  
Fecha: 2023.03.21 16:36:19 +01'00'

---

MSc. Alejandra Rojas Vargas

Asesora

**ANA LIZETH HINE GOMEZ (FIRMA)** Firmado digitalmente por ANA LIZETH HINE GOMEZ (FIRMA)  
Fecha: 2023.03.28 14:22:19 -06'00'

---

Dra. Ana Hine Gómez

Asesora

Firmado por RAFAEL SANTIAGO OROZCO RODRIGUEZ (FIRMA)  
PERSONA FISICA, CPF-07-0085-0841.  
Fecha declarada: 17/03/2023 06:50 PM

---

Dr. Rafael Orozco Rodríguez

Invitado especial

## Agradecimiento

El agradecimiento de la presente investigación la extiendo al Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales, especialmente a Ana Hine y Alejandra Rojas por abrirme sus puertas, y haberme enseñado las bases del cultivo *in vitro*, la ayuda brindada y por el impulso hacia la realización de esta investigación.

Al Centro Nacional de Alta Tecnología por el otorgamiento de becas CENAT, que bajo esa modalidad y financiamiento esta tesis se llevó a cabo con las mejores condiciones en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas. Agradezco a los miembros del CENIBiot por toda la ayuda prestada durante la realización del proyecto, fue un periodo de gran crecimiento personal.

Agradezco especialmente a mi amiga y tutora Laura Sánchez por su apoyo incondicional desde el primer momento, por todo lo que me ha enseñado y ayudado para que esta tesis hoy sea una realidad, a ella mi eterno agradecimiento.

A mis amigas por el apoyo de siempre.

A mis profesores de la Escuela de Ciencias Biológicas, por todas las enseñanzas a lo largo de los años.

A mi alma mater, la Universidad Nacional.

A Dios y a la Virgencita.

## **Dedicatoria**

Le dedico esta tesis a mi esposo y a mis hijos, por tanto amor, por ser mi motor y mi motivación a salir adelante, por ser mi apoyo incondicional siempre, porque soy lo que soy gracias a ellos.

A mi mamá, por el ser tan grande que es mi vida.

A mi papá por creer en mí hasta su último aliento.

A mi hermanita.

A Avy, mi sombra, por su compañía.



# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>10</b>
1.1. Antecedentes.....	10
1.2. Justificación.....	16
1.3. Planteamiento del problema .....	19
1.4. Objetivos.....	19
1.4.1. Objetivo General .....	19
1.4.2. Objetivos específicos .....	19
<b>2. Marco Teórico .....</b>	<b>20</b>
2.1. Características de la Teca.....	20
2.2. Técnicas de propagación.....	21
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> .....	22
2.4. Aspectos determinantes en el rendimiento del cultivo <i>in vitro</i> .....	24
2.5. Sistemas de Inmersión Temporal .....	26
2.6. Ventajas y desventajas de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).....	27
<b>3. Marco Metodológico.....</b>	<b>29</b>
3.1. Protocolo de apertura e introducción de las semillas .....	30
3.2. Medio de multiplicación y desarrollo .....	31
3.3. Indexación para descartar contaminación de las plántulas .....	32
3.4. Diseño experimental.....	33
3.5. Evaluación de los explantes .....	37
3.6. Análisis estadístico.....	39
<b>4. Resultados .....</b>	<b>40</b>
4.1. Análisis de las variables cuantitativas del genotipo 618.....	40
4.2. Coeficiente de multiplicación para el genotipo 618. ....	43
4.3. Contenido de humedad del genotipo 618 en BIT.....	44
4.4. Análisis de las variables cualitativas genotipo 618. ....	45
4.5. Apreciación fenotípica de los explantes por tratamiento y sistema.....	48
4.6. Evaluación de la calidad de los explantes del genotipo 618 .....	50
4.7. Análisis de las variables cuantitativas genotipo 117.....	52
4.8. Coeficiente de multiplicación para el genotipo 117. ....	56
4.9. Contenido de humedad del genotipo 117 .....	57
4.10. Análisis de las variables cualitativas genotipo 117. ....	58
4.11. Apreciación fenotípica de los explantes por tratamiento y sistema.....	60
4.12. Evaluación de la calidad de los explantes del genotipo 117. ....	62
<b>5. Discusión.....</b>	<b>64</b>
5.1. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la brotación de explantes de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	64
5.2. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la elongación de brotes de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	66
5.3. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la producción de hojas de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	67
5.4. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la generación de callo en <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117. ....	68
5.5. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la rizogénesis de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	68

5.6.	Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la hiperhidricidad de explantes de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	70
5.7.	Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la biomasa de explantes de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	72
5.8.	Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en el porcentaje de multiplicación de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	73
5.9.	Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en el contenido de humedad en <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	74
5.10.	Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la calidad de explantes de <i>Tectona grandis</i> , para los genotipos 618 y 117.....	75
5.11.	Características operativas de los sistemas de inmersión temporal y de los medios semisólidos. 76	
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y Recomendaciones.....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>86</b>

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Diseño experimental. ....	35
Cuadro 2. Escala de calidad generada a partir de las observaciones, para evaluar cualitativamente los brotes obtenidos en cada tratamiento. ....	38
Cuadro 3. Efecto de los factores y su interacción sobre las variables cuantitativas de <i>T. grandis</i> perteneciente genotipo 618, mediante Modelo Lineal General. ....	40
Cuadro 4. Efecto de la concentración de BAP y sistema de cultivo en el desarrollo de explantes de <i>T. grandis</i> del genotipo 618. ....	41
Cuadro 5. Efecto de los factores y su interacción sobre las variables cuantitativas de <i>Tectona grandis</i> perteneciente genotipo seleccionado 117, mediante Modelo Linear General. ....	53
Cuadro 6. Efecto de la concentración de BAP y sistema de cultivo en el desarrollo de explantes de <i>T. grandis</i> del genotipo 117. ....	54

## Índice de figuras

Figura 1. Extracción de semillas de teca. A. Fruto con exocarpo; B. Frutos con endocarpo y lijados; C. Semillas de teca dentro del fruto. Barra de escala: 1cm. ....	30
Figura 2. Proceso de germinación de las semillas de teca in vitro. A. 1 día; B. 7 días; C. 14 días; D. 22 días. Barra: 1cm. ....	31
Figura 3. Plantas de teca con características idóneas para el ensayo. Barra de escala: 1cm. ....	32
Figura 4. Pruebas de fragmentos de hoja de teca para evidenciar presencia de microorganismos. Barra de escala: 1cm. ....	33
Figura 5. Frascos utilizados tanto para los BIT como para los MSS. Barra de escala: 1cm. ....	34
Figura 6. Segmentos nodales de teca utilizados para sembrarlos en los diferentes tratamientos. Barra de escala: 1cm. ....	36
Figura 7. BIT y MSS en cuarto de crecimiento. Barra de escala: 1cm. ....	36
Figura 8. Escala de calidad para la clasificación de plantas de <i>Tectona grandis</i> : A. Puntuación 5; B. Puntuación 4; C. Puntuación 3; D. Puntuación 2; E. Puntuación 1. ....	38
Figura 10. Efecto de la concentración de BAP sobre el coeficiente de multiplicación en explantes de <i>T. grandis</i> , genotipo 618 cultivados en biorreactores de inmersión temporal (BIT) y medio semisólido (MSS). (T1: 0,0 mg/l; T2: 0,5 mg/L; T3: 1,0 mg/L; T4: 1,5 mg/L). ....	44
Figura 11. Efecto del sistema de cultivo en el contenido de agua de plantas de <i>T. grandis</i> , genotipo 618, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L). Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0,05$ ). ....	45
Figura 12. Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de raíz en explantes de <i>Tectona grandis</i> , genotipo 618 cultivados en Biorreactores de Inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0 mg/l; T2: 0,5 mg/L; T3: 1,0 mg/L; T4: 1,5 mg/L).....	46
Figura 13. Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de callo en explantes de <i>Tectona grandis</i> , genotipo 618 cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L). ....	46
Figura 14. Diferencias morfológicas del callo formado en los explantes de <i>T. grandis</i> . A: MSS (A1. Corte longitudinal de un callo, A2. Callo entero). B: BIT (B1. Callo friable en la base (en contacto con el medio de cultivo semisólido), B2. Callo en los nudos y no en el segmento basal. Barra de escala: 1cm. ....	47
.....	48
Figura 15. Efecto de la concentración de BAP sobre la hiperhidricidad en explantes de <i>Tectona grandis</i> , genotipo 618 cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1: 0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L). ....	48

Figura 16. Efecto del sistema BIT sobre el fenotipo algunas de las plantas de <i>T. grandis</i> , del genotipo 618, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A: Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante y buen vigor. B: Plantas con algún grado de hiperhidricidad y callogénesis, su vigor y color depende del grado de hiperhidricidad. C y D: Plantas con hiperhidricidad y generación de callogénesis, lo que compromete su color y su vigor. Barra de escala: 1cm. ....	49
Figura 17. Efecto del sistema MSS sobre el fenotipo de algunas plantas de <i>T. grandis</i> del genotipo 618, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A: Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante y buen vigor. B: Plantas con nula hiperhidricidad y algún grado de callogénesis en su base, hojas color verde brillante y buen vigor. C: Plantas con generación de callo en su base, presencia de algún grado de hiperhidricidad. D: Plantas con hiperhidricidad y generación de callogénesis, lo que compromete su color y su vigor y por lo tanto su calidad. Barra de escala: 1cm. ....	50
Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de <i>T. grandis</i> cultivadas en sistemas de inmersión temporal. La escala de calidad muestra el estado de las plantas obtenidas, en donde 1 es la menor calidad y 5 es la mejor calidad.....	51
Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de <i>T. grandis</i> cultivadas en medio semisólido. La escala de calidad muestra el estado de las plantas obtenidas, en donde 1 es la menor calidad y 5 es la mejor calidad.....	52
Figura 20. Correlación lineal de Pearson entre número de hojas y brotes totales de <i>T. grandis</i> genotipo 117.....	56
Figura 21. Efecto de la concentración de BAP sobre el coeficiente de multiplicación en explantes de <i>T. grandis</i> cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1: 0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L). ....	56
Figura 22. Efecto del sistema de cultivo en contenido de agua en plantas de <i>T. grandis</i> , del genotipo 117, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L). No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P \leq 0,05$ ).....	57
Figura 23. Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de raíz en explantes de <i>T. grandis</i> cultivados en Biorreactores de Inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L). ....	58
Figura 24. Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de callo en explantes de <i>T. grandis</i> cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).....	59
Figura 25. Efecto de la concentración de BAP sobre la hiperhidricidad en explantes de <i>T. grandis</i> cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1: 0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L). ....	60
Figura 26. Efecto del sistema BIT sobre el fenotipo de las plantas de <i>T. grandis</i> cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A:	

Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante y buen vigor. B: Plantas con algún grado de hiperhidricidad y callogénesis, su vigor y color depende del grado de hiperhidricidad. C y D: Plantas con diferentes grados de hiperhidricidad y generación de callogénesis, lo que compromete su color, su vigor y su calidad. Barra de escala: 1cm.... 61

Figura 27. Efecto del sistema MSS sobre el fenotipo de las plantas de *T. grandis* cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A: Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante. B: Plantas con nula hiperhidricidad y algún grado de callogénesis en su base, hojas color verde brillante. C: Plantas con generación de callo en su base, presencia de algún grado de hiperhidricidad. D: Plantas con hiperhidricidad y generación de callogénesis, lo que compromete su color y su vigor y por lo tanto su calidad. Barra de escala: 1cm..... 62

Figura 28. Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de *T. grandis* cultivadas en sistemas de inmersión temporal..... 63

Figura 29. Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de *T. grandis* cultivadas en medio semisólido..... 64

## Abreviaturas o acrónimos

UNA	Universidad Nacional
INISEFOR	Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales
CENIBiot	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas
CENAT	Centro Nacional de Alta Tecnología
SIT	Sistemas de Inmersión Temporal
BIT	Biorreactores de Inmersión Temporal
MSS	Medio semisólido
n	Subconjunto de la población que se mide
BAP	6 – Bencilaninopurina
TDZ	Thidiazurón
CA	Contenido de agua
CM	Coefficiente de multiplicación
G1	Genotipo 618
G2	Genotipo 117
N	Población
v.e	Valor del estadístico

## Resumen

La teca (*Tectona grandis* Linn) es una especie forestal reconocida como madera preciosa, de alto valor económico. Se propaga exitosamente por propagación vegetativa y por semilla, no obstante, estos procesos son lentos, por lo que se requiere optimizar técnicas de micropropagación que minimicen el tiempo de producción. Tanto los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) como los medios semisólidos (MSS), con la adición de reguladores de crecimiento como el 6-Bencilaninopurina (BAP) producen multiplicación de teca. En la presente investigación se evaluaron SIT y MSS, así como concentraciones de 0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L de BAP para la multiplicación de dos genotipos de plantas seleccionadas de teca como parte de un programa de mejoramiento genético. Los resultados obtenidos mostraron que ambos sistemas son eficientes para multiplicar teca, con superioridad en los MSS, sin embargo, es importante determinar un adecuado balance de los sistemas y las citoquinas para evitar la hiperhidricidad de las plantas. Los coeficientes de multiplicación obtenidos para el genotipo 618 fueron de 6,55 y 5,35, para MSS y SIT respectivamente, mientras que para el genotipo 117 se obtuvieron coeficientes de multiplicación de 12,20 y 9,35, para MSS y SIT respectivamente.



## 1. Introducción

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, es una técnica que permite la producción masiva de plantas con características morfológicas elegidas, libres de virus y patógenos; también brinda la posibilidad de obtener clones idénticos a la planta madre. Esta técnica presenta otras ventajas como minimizar el tiempo de propagación de los cultivos en comparación con las técnicas convencionales, facilita el transporte de las plantas de un país a otro, y permite la experimentación en menos tiempo y espacio. La investigación hacia la optimización de las metodologías ya utilizadas, y la implementación de técnicas novedosas de automatización como los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), son de importancia científica, económica y comercial.

### 1.1. Antecedentes

La teca (*Tectona grandis* Linn) es una especie forestal mundialmente reconocida por su preciada madera de excelente calidad y de alto valor económico. Taxonómicamente, este árbol pertenece a la familia Verbenaceae; su origen se reporta en Birmania, Tailandia y el centro y sur de la India (Vyas, Kumar Yadav y Khandelwal, 2018).

Esta especie se ha plantado masiva y extensamente en regiones fuera de su natural distribución, entre ellas América Latina, África y Asia, (Murillo *et al.*, 2013) debido a que es utilizada con gran variedad de fines, tales como la ebanistería fina, elaboración de cubiertas y rieles, así como construcción de estructuras que estarán en contacto con el agua, dada la resistencia que tiene la madera a este líquido (Gómez y Moya-Roque, 2012).

La dureza de la madera de teca es de gran importancia para la industria y se encuentra dentro de las cinco especies que más plantaciones tiene en el mundo (Quiala *et al.*, 2012), además, representa un 4% de toda la madera que se comercializa mundialmente (Kussumoto de Alcântara, Marcos Ortega, y Castro Souza, 2016).

Desde el punto de vista comercial, para la producción maderera, los árboles deben cumplir una serie de requisitos de calidad, basados en su expresión fenotípica, como son la longitud, rectitud, grosor del fuste, la forma de la copa, entre otros que permitan aumentar la cuantía de la madera. Otro factor de producción importante que se considera en los programas de mejoramiento genético, es la edad de madurez fisiológica que requieren los árboles para alcanzar el tamaño y características necesarias, por lo cual han surgido diversas investigaciones para optimizar las características del cultivo y acelerar el proceso de crecimiento y desarrollo de las especies de interés (Sudarwoko Adi, Gopar, Darmawan, Amin, y Dwianto, 2015). En el caso de la teca, numerosas instituciones han buscado la optimización de su cultivo mediante el uso de herramientas de mejoramiento genético convencional, así como estrategias biotecnológicas (Mendiola *et al.*, 2016).

Debido a la importancia globalmente reconocida de la teca, instituciones como la Organización Internacional de las Maderas Tropicales (OIMT), la Unión Internacional de Organizaciones de Investigación Forestal (IUFRO) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se han abocado desde el año 2016, a la investigación y el desarrollo de plantaciones de esta especie. Estas organizaciones brindan un acompañamiento en la utilización de la especie, y contribuyen al conocimiento científico referente al manejo forestal del material élite reproductivo, su mercadeo, los modelos de predicción en las técnicas de silvicultura, el mejoramiento y la selección genética. A partir de la década de los noventa, se han empleado herramientas para la producción maderera, el cultivo de tejidos, la conservación genética, la utilización de las semillas, y la interacción con regiones como África, Asia, Oceanía y América Latina, con el fin de mantener una sostenibilidad de las plantaciones (Kollert y Kleine, 2017).

La sobreexplotación de las plantaciones naturales, la deforestación masiva, y el uso inadecuado de los ciclos de siembra, motivaron a la OIMT en el 2016, a realizar un análisis de la situación global de la especie, con la finalidad de establecer las mejores prácticas para el manejo y gestión sostenible de los bosques, las plantaciones y los recursos genéticos de

teca. De esta manera, nació el proyecto "Conservación *ex situ* e *in situ* de teca (*Tectona grandis* Lf) para apoyar la ordenación forestal sostenible" en Myanmar, el cual generó un informe que incluyó recomendaciones acerca de la conservación y gestión genética, el manejo de la silvicultura y los bosques, la economía, producción, mercado y comercio de la teca (Kollert y Kleine, 2017). Otras organizaciones en varias regiones del mundo están llevando a cabo investigaciones para elaborar madera con características similares a los árboles naturales, pero los resultados son limitados (Sudarwoko *et al.*, 2015).

Según Gómez y Moya-Roque (2012), la teca se introdujo en la década de los cuarenta en Costa Rica, sin embargo, no fue hasta 1980 cuando el gobierno costarricense motivó su plantación, dando como resultado la reforestación de 40,000 hectáreas en el año 1999 (D. Pérez y Kanninen, 2005). En el año 2013, Costa Rica se posicionó en la región latinoamericana, como el país con las mejores fuentes semilleras, tecnología de plantaciones y procesos de mejoramiento genético forestal de esta especie (Murillo Gamboa, Badilla Valverde, Villalobos, y Rojas Parajeles, 2013).

Las técnicas de reproducción empleadas en teca son diversas. Se ha utilizado comúnmente la propagación sexual por medio de semillas, así como la propagación vegetativa, la cual se ha utilizado a través del tiempo mediante esquejes. Esta última también puede realizarse en condiciones *in vitro* a partir de segmentos de hoja, rama, tallo, brotes o raíces que, colocados sobre un medio adecuado, permite la generación de una nueva planta, la cual mantiene las características de la planta madre (Gatti, 2012). Se ha logrado la formación de callos para la generación de brotes en teca mediante embriogénesis indirecta con diferentes concentraciones de Thidiazuron (TDZ) (Daquinta *et al.*, 2002). Según estudios realizados por Meza, Rodríguez, Gatti, y Espinoza (2015), la propagación masiva por miniestacas en teca, permite la obtención exitosa de brotes para la generación de nuevas plántulas, que posteriormente podrán ser utilizadas en programas de reforestación y clonación de árboles seleccionados, dado que mantendrán las características del árbol del cual provienen.

Estas técnicas de micropropagación son de importancia para capturar y perpetuar características cuantitativas y cualitativas transmitidas genéticamente, para ser conservadas dentro de los programas de mejoramiento genético (Meza *et al.*, 2015), quienes podrían requerir la multiplicación de sus materiales, ya sea a partir de material vegetal de genotipos seleccionados o a partir de semilla mejorada y colectada en jardines rodales (Valverde-Cerdas, Alvarado, y Hine, 2004). Ramírez Aguilar *et al.* (2003), mencionan que las semillas son de vital importancia para conservar una base genética vasta de las especies.

De acuerdo con lo mencionado, la micropropagación *in vitro* es una técnica que contribuye en la multiplicación más rápida del material vegetal, propiciando la obtención de grandes cantidades de plántulas, en condiciones controladas. La micropropagación permite garantizar la estabilidad genotípica, con la utilización de menos espacio y con independencia climática, optimizando los recursos, generando clones libres de patógenos, permitiendo la movilidad del material vegetal entre países y asegurando su calidad (Kollert y Kleine, 2017).

Shirin, Rana, y Mandal (2005) mencionan que la propagación clonal *in vitro* a partir de yemas adventicias o axilares, es una herramienta biotecnológica que puede implementarse cuando hay especies difíciles de propagar de manera clásica, ya sea sexual o asexualmente y también, propicia un entorno para la modificación genética. Además, presenta ventajas en la multiplicación de material seleccionado frente a los métodos convencionales anteriormente citados. Entre estas ventajas, se encuentra la rápida generación de plantas para establecer nuevas plantaciones, la posibilidad de mantener un genotipo estable a través de las multiplicaciones sucesivas, en especies con baja capacidad de germinación natural, los métodos *in vitro* permiten aumentar la germinación en ocasiones, hasta un 100% (Peña, Rocano, Salazar, y Torres, 2014; Quiala, 2014).

Específicamente para especies forestales, la micropropagación permite mantener y clonar características como la altura, la copa, la rectitud del fuste y el rendimiento maderero, mantener la sanidad y estabilidad genética y elevar coeficientes de multiplicación (Polo Santos *et al.*, 2013).

Aun cuando la propagación *in vitro* posee muchas ventajas, es una técnica costosa, principalmente por el alto precio del agente gelificante, así como por el requerimiento de mano de obra calificada en la técnica aséptica, corte y siembra de explantes y la limpieza de los recipientes. Adicionalmente, el proceso de subcultivo de los explantes a medio fresco por agotamiento de los nutrientes es laborioso y el crecimiento y desarrollo del material está limitado al tamaño del envase que los contiene (Etienne y Berthouly, 2002; Mehrotra, Goel, Kukreja, y Mishra, 2007).

Debido a lo anterior, se han buscado otras estrategias para la propagación *in vitro* de las plantas. Por ejemplo, el cultivo en medio líquido permite disminuir los costos al eliminar el uso del agente gelificante, las operaciones manuales son más rápidas en cuanto al proceso de siembra y recambio de medio, permite la automatización de los procesos, así mismo los tejidos tienen una mejor disponibilidad de los nutrientes y pueden mantenerse en agitación lo que promueve un mejor desarrollo y crecimiento del material en comparación con el cultivo en medios semisólidos (Berthouly y Etienne, 2005; Hvoslef-Eide y Preil, 2005).

Buscando una optimización en el proceso, surgen los sistemas de inmersión temporal (SIT), descritos por primera vez por Steward, Caplin, y Millar (1952), los cuales consisten en una inmersión del material vegetal en medio de cultivo a intervalos establecidos. En ciertas plantas, ha contribuido en la proliferación de brotes y microcortes, así como en la microtuberización y en la embriogénesis somática (Hvoslef-Eide y Preil, 2005). Aunque existe una gran diversidad de SIT, el diseño está planeado para reducir la asfixia e hiperhidricidad de las plantas, así como para potenciar ventajas, como la reducción de espacio en los cuartos de crecimiento, mejorar los rendimientos biológicos y de producción, reducción de costos y operaciones manuales. Asimismo, las plantas presentan mayor adaptación a la aclimatación que las provenientes de medio semisólido y líquido (Berthouly y Etienne, 2005).

Los SIT han sido utilizados ampliamente en la propagación de diversas especies, como lo son *Musa sp* (Basail Pérez *et al.*, 2012; Colmenares y Giménez, 2003; Florio y Mogoñol,

2011; Posada Pérez, Gómez Kosky, Reyes, y Díaz Alvares, 2003), *Ananas* (Escalona *et al.*, 1999; R, Shahnadz H, y Radziah M Z, 2011; Scherer *et al.*, 2013), *Psidium guajava* (Pérez, Nápoles, Concepción, y Trujillo, 2002), y en *Gmelina arborea* (Hernández Aguilar, Rojas Vargas, Hine, y Daquinta, 2013). En teca, estos sistemas han dado resultados positivos en la multiplicación y calidad de los explantes obtenidos, mejorando la tasa de supervivencia en etapas de enraizamiento y aclimatación (Quijala-Mendoza y Barbon-Rodríguez, 2012; Quijala, 2014).

Otro aspecto de importancia en el cultivo *in vitro*, son los reguladores de crecimiento, los cuales son sustancias orgánicas que estimulan respuestas fisiológicas (Jones-Castro, 2006). Entre los diversos tipos de reguladores de crecimiento utilizados se encuentran las citoquininas, las cuales promueven la división y diferenciación celular (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

Entre las principales citoquininas conocidas están la zeatina, la kinetina y la 6-bencilaminopurina (BAP), producidas naturalmente en regiones de continuo crecimiento. Su intervención se da posterior a la replicación del ADN, pero antes de que ocurra la mitosis, lo que les permite dar el estímulo en la división celular y el aumento en la síntesis de proteínas (Gil Rivero, López Medina, y López Zavaleta, 2016).

Algunas de las investigaciones que se han realizado con la utilización de los reguladores de crecimiento, con fines de mejorar los índices de multiplicación en especies forestales, han concluido que el 6-bencilaminopurina genera mejores resultados. Abdelnour y Muñoz (2005), evaluaron el efecto del BAP sobre la multiplicación y el enraizamiento de teca en medio semisólido, siendo este un inductor efectivo en la brotación de estacas tiernas y semileñosas. Además, la adición en conjunto con otro regulador, el ácido indolbutírico (AIA) en una baja concentración, aumentó la eficiencia en la multiplicación.

En otras investigaciones realizadas por Quiala y colaboradores (2014), se evaluó el efecto del BAP y del agente gelificante en la multiplicación de teca y en la aparición de trastornos fisiológicos del material. Dichos ensayos concluyeron que con una concentración de BAP de 8.88, se obtuvo una mayor brotación, pero también mayor hiperhidricidad, condición que perjudica la calidad de los brotes.

Por su parte, Quiala y colaboradores (2012), mostraron que todas las concentraciones de BAP evaluadas en SIT, aumentaron significativamente el número de brotes en teca, en comparación con el tratamiento control. Además, en esta investigación, se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 10,3 a una concentración de BAP de 6.66  $\mu\text{M}$ , el mayor reportado hasta ese momento.

## **1.2. Justificación**

Según las proyecciones de la FAO (2015) para el año 2030, se espera un incremento en los índices de población mundial, por lo tanto la demanda en la conversión de más terrenos forestales en terrenos agrícolas continúa. Se prevé que disminuya el bosque per cápita y a su vez, aumente la extracción maderera para suplir las necesidades de infraestructura, papel, y otros. Entre las posibles alternativas para evitar el constante cambio en el uso del suelo, está el aumento de los rendimientos agrícolas y forestales por unidad de área.

Para ello, se debe optimizar los métodos de siembra y aumentar la producción de los cultivos con variedades mejoradas. Para esto, diversos programas de mejoramiento genético forestal de eucalipto, pino, teca, entre otras, dirigen su investigación hacia el establecimiento de plantaciones intensivas a partir de jardines clonales de árboles genéticamente superiores (Acosta, 2011).

Las plantaciones forestales establecidas de manera convencional, sin el uso de herramientas biotecnológicas, tienen más probabilidades de disminuir las tasas de brotación, los coeficientes de multiplicación, y la germinación de las semillas. Además, presentan variaciones fenotípicas marcadas y su desarrollo y crecimiento es heterogéneo (Jiménez-Terry y Agramonte, 2013). Específicamente para la teca, la germinación, debido a la latencia tegumentaria se lleva a cabo en porcentajes muy bajos de entre el 20 y 25%.

Para fines comerciales, la micropropagación puede ser más rentable económicamente que otros tipos de propagación convencional, dependiendo del nivel de producción requerido y de la capacidad de la especie de micropropagarse mediante protocolos sencillos y de bajo costo. En el caso de la teca, los costos de producción y de obtención de madera de excelente calidad, se ven reducidos mediante la micropropagación, generando material de alto valor en el mercado (Park, Bonga, y Moon, 2016).

Aunque la teca se reproduce de manera vegetativa, los coeficientes de multiplicación son bajos y el tiempo requerido para obtener una gran cantidad de plantas es elevado, aún más cuando se trata de propagación de genotipos seleccionados provenientes de semilla mejorada (Quiala *et al.*, 2012). Por lo tanto las técnicas que permitan una rápida propagación del material vegetal tienen una importancia relevante, especialmente en programas de mejoramiento genético, con el fin de producir más cantidad de plantas de calidad, en menos tiempo (Abdelnour y Muñoz, 2005).

La clonación *in vitro* permite mantener el genotipo estable en la generación de gran cantidad de plántulas, por lo que la calidad y homogeneidad de la plantación es garantizada. Las plantaciones clonales establecidas en campo no necesitan raleos intensivos para eliminar árboles que no cumplen con las condiciones del lote, por lo cual, los costes superiores de las vitroplantas, pueden ser compensados en parte, al poder también, disminuir el tiempo de reproducción (Kollert y Kleine, 2017).



Por otra parte, las ventajas que ofrece el mejoramiento genético para la industria maderera son indiscutibles, entre ellas las plantaciones con menores desperdicios y más homogeneidad que aumentan la eficacia y los rendimientos, lo cual, complementado con una propagación *in vitro*, representa valor añadido al proceso (Espitia, Murillo, y Castillo, 2011).

La empresa Novel Teak, cuenta con genotipos de teca, obtenidos a partir de semilla seleccionada y provenientes de cruces controlados, con progenitores conocidos, producto de un programa de mejoramiento genético. Actualmente, la propagación se realiza vegetativamente de manera convencional (*ex vitro*) sin embargo, los resultados obtenidos no son satisfactorios, debido a la lentitud del proceso para la obtención de plantas. Por lo anterior, se considera la utilización de los SIT, como una alternativa para mejorar la multiplicación de estos materiales y minimizar los costos de producción de la especie.

Por lo tanto, el propósito de esta investigación es evaluar la eficiencia del medio semisólido y de los sistemas de inmersión temporal, como herramienta para la multiplicación de plantas seleccionadas de *Tectona grandis* en programas de mejoramiento genético de esta especie, contribuyendo con la producción maderera de calidad y valorando las ventajas de utilizar sistemas automatizados como aporte tecnológico a la producción de especies forestales de importancia económica.

### **1.3. Planteamiento del problema**

¿En qué medida el sistema de inmersión temporal puede considerarse una herramienta eficiente para la micropropagación de plantas de teca provenientes de programas de mejoramiento genético?

### **1.4. Objetivos**

#### **1.4.1. Objetivo General**

Evaluar la capacidad de multiplicación *in vitro* de materiales seleccionados de *Tectona grandis* (teca) en sistemas de inmersión temporal como una alternativa de propagación masiva para los programas de mejoramiento genético.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Determinar el coeficiente de multiplicación *in vitro* de materiales seleccionados de *Tectona grandis* (teca) en sistemas de inmersión temporal en comparación con los sistemas tradicionales de multiplicación en medio semisólido.

2. Comparar el crecimiento y desarrollo de los explantes de teca cultivados en medio semisólido y líquido en SIT complementado con diferentes concentraciones de BAP para las variables número de brotes, número de hojas, número de raíces, longitud de brote y biomasa producida.

3. Determinar cualitativamente el mejor tratamiento para la multiplicación *in vitro* de genotipos seleccionados de teca de acuerdo con el vigor, la coloración, la presencia de hiperhidricidad y callo, de las plantas producidas en medio semisólido y en SIT.

## 2. Marco Teórico

### 2.1. Características de la Teca

El árbol de teca tiene hojas caducas elípticas u ovaladas de una longitud de treinta a 60 centímetros, su copa es redondeada, puede tener más de 50 metros de altura en su fuste recto y limpio, con dominancia apical (Pandey y Brown, 2000). En Costa Rica los árboles de esta especie alcanzan alturas superiores a los 35 metros (Espitia, Murillo, y Castillo, 2011; Fonseca, 2004).

Las primeras semillas fértiles de estos árboles son producidas con frecuencia alrededor de los quince a veinte años de plantada y posterior a diez años luego del corte y rebrote, continuando con la producción de semillas en buena cantidad en los años posteriores. Debido a su duro exocarpo, puede darse una imposibilidad para la germinación, lo cual hace que algunas de las semillas permanezcan en un periodo de latencia durante el primer año, pero viables por muchos años más. Por esta cualidad en la producción de semillas, es posible producir grandes cantidades de plantas (Fonseca, 2004).

La teca es la madera tropical con mayor demanda y es una de las mejor valoradas económicamente por su belleza y calidad, contando con una mención que la destaca por su durabilidad y estética (FAO, 2009; Fonseca, 2004). Las plantaciones de teca en el mundo se han extendido por el interés de inversión privada en sembradíos industriales que puedan satisfacer la demanda maderera, debido a la disminución de los rodales naturales (Kollert y Kleine, 2017).

Esta especie es reconocida por su madera resistente a termitas y al daño por hongos, debido a su contenido de compuestos como la tectoquinona, el lapachol y el deoxylapachol (Vyas *et al.*, 2018). Se le conocen además, metabolitos como las naftoquinonas, las

antraquinonas y las quinonas, así como otros compuestos fitoquímicos como los triterpenoides, esteroides lignanos, ésteres grasos y compuestos fenólicos (Vyas *et al.*, 2018).

La especie fue introducida en Panamá en 1926, con semilla enviada de Sri Lanka y las primeras plantaciones se establecieron en Costa Rica entre 1926 y 1929. En Costa Rica, los suelos más apropiados para el cultivo de teca son aquellos con una textura liviana, con buen drenaje, con requisito de alto contenido de metales como calcio, fósforo y magnesio, además neutros y fértiles, con una estación seca definida de cuatro a seis meses, y una precipitación de entre 1300 y 2500 mm/año. Entre las limitaciones para el buen crecimiento y desarrollo se encuentran los suelos pocos profundos, arenosos y con poca precipitación (Fonseca, 2004). Se ha documentado que las plantaciones brindan una mejora en la calidad del suelo en cuanto a factores biológicos, físicos y químicos (Fonseca, 2004).

En la industria farmacológica y médica, la teca ha sido ampliamente estudiada y se ha reportado que prácticamente todas las partes de esta planta presentan al menos una propiedad útil, como antioxidantes, antiinflamatorios, antipiréticos, citotóxicos, antihelmínticos, hipoglucemiantes, cicatrizantes, antiplasmodiales, analgésicos, antidiuréticos, actividad antibacteriana, antiviral y gastroprotectora, antitumorales, antimetastásicos y fitotóxicos, entre otros (Giri y Varma, 2013; Vyas *et al.*, 2018).

La importancia agroforestal de la teca es ampliamente conocida; es utilizada en programas de reforestación (Hernández Aguilar *et al.*, 2013) y se han sembrado árboles juveniles de teca con otros cultivos, por ejemplo, maíz y frijol dando cosechas productivas y manteniendo el terreno limpio, libre de plantas competidoras (Vyas *et al.*, 2018).

## **2.2. Técnicas de propagación**

La propagación de teca puede realizarse de forma sexual, por medio de semillas o por reproducción asexual o vegetativa por esquejes enraizados, tocones, injertos o cultivo de

tejidos. El proceso de siembra más antiguo es el de sembrar directamente en suelo la semilla, sin embargo, se ha determinado mayor rendimiento al utilizar bolsas o envases que permitan un desarrollo radical conveniente (Fonseca, 2004).

La propagación por medio de semillas es una técnica de fácil obtención de plantas de forma natural y eficiente, que garantiza una diversidad genética satisfactoria. Para esta propagación, se presentan riesgos tales como obtener una correlación negativa entre la fructificación y la generación de semillas, la obtención de las mismas podría en ocasiones ser limitada y variable de acuerdo al árbol, año y sitio; la germinación puede ser baja o impredecible (Kollert y Kleine, 2017).

Complementariamente, muchos programas de mejoramiento genético requieren la rápida germinación de semilla mejorada y, por ende, la propagación de las plántulas provenientes de semilla, lo cual debe hacerse a través de la propagación vegetativa. Por su lado, la propagación de genotipos por clonación, o multiplicación vegetativa, permite obtener plántulas inclusive cuando la planta madre no alcance la madurez para producir semillas fértiles, o en presencia de condiciones adversas que limiten su reproducción (Kollert y Kleine, 2017).

### **2.3. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* vegetal constituye una indudable estrategia de recuperación de especies valiosas, ya sea que se encuentren en peligro de extinción, o que sean afectadas por enfermedades causadas por microorganismos o virus. Además, esta técnica permite el abastecimiento de altas demandas en determinados productos vegetales, disminuyendo la presión sobre los ejemplares naturales, así como también, permite obtener plantas con mejores características requeridas por el mercado (Bonilla Morales, Mancipe Murillo, y Aguirre Morales, 2015; Castro R, Díaz G, y Linero, 2002).

Sumado a esto, mediante la utilización de diversas técnicas, es posible retrasar el crecimiento de especies en situaciones que lo ameriten, aumentar la longevidad y conservar ejemplares a largo plazo. Adicionalmente, el cultivo *in vitro* permite superar las barreras climáticas, eliminando la dependencia de los cultivos a determinadas condiciones y características regionales, al ser éstas controladas (Bonilla Morales *et al.*, 2015; Castro R *et al.*, 2002).

Además, el trabajo en laboratorio facilita el mejoramiento de la calidad de las plantas, al utilizar herramientas de biotecnología para brindar resistencia contra patógenos, conservación del germoplasma, producción de metabolitos secundarios, suministro constante de ejemplares, fidelidad genética, entre otros (Marulanda y Isaza V, 2004).

Existen diferentes tipos o métodos de propagación *in vitro*, entre los cuales se encuentra el medio de cultivo semisólido, el cual es un sistema estático, que consta de un recipiente de proporciones variables, al cual se le adiciona un medio de cultivo con un agente gelificante, que le brinda al medio la constitución semisólida, sobre la cual se coloca el material vegetal, sin estar sumergido completamente. Este sistema es cerrado, los explantes se mantienen durante el tiempo que exista disponibilidad de nutrientes sin manipulación, este tiempo varía según la etapa y la especie. Los explantes se encuentran colocados ordenadamente, pueden ser colocados polar o apolarmente, y la brotación crecerá en contra de la gravedad (George, Hall, y Klerk, 2008).

Otro tipo de sistema es el medio líquido, en el cual, el material vegetal recibe los nutrientes a partir de medios sin agente gelificante, estos pueden estar estáticos, en agitación, sumergidas en su totalidad en el medio o con estructuras que funcionen como puente, en especies en donde los polifenoles liberados originen condiciones negativas para el tejido. Este es un sistema muy estudiado, sin embargo, no alcanza su máxima efectividad, pues el porcentaje de mortalidad por asfixia del tejido es elevado y la hiperhidricidad que se presenta por la cantidad de agua en los medios de cultivo, modificando el balance hídrico y la

disponibilidad de oxígeno (Georgiev, Schumann, Pavlov, y Bley, 2014; Posada Pérez *et al.*, 2003).

Dadas las limitaciones de los sistemas de cultivo líquidos, surge un tercer sistema, de inmersión temporal, que como indica su nombre, consiste en la inmersión del material vegetal a intervalos establecidos en medio de cultivo líquido, en el periodo de no inmersión, el material se encuentra sin contacto con el medio de cultivo pero expuesto a un entorno gaseoso (Georgiev *et al.*, 2014). Los biorreactores contribuyen con la producción de cultivos a gran escala, ya sea de plantas diferenciadas o indiferenciadas, en condiciones controladas y con medios líquidos, en los cuales se busca producir de forma económicamente factibles y en abundantes cantidades. En estos sistemas automatizados, se controlan condiciones físicas y de composición de medio nutritivo, en un ambiente completamente aséptico regulado para proporcionar el escenario ideal para el crecimiento de la biomasa vegetal (Georgiev *et al.*, 2014).

Entre las condiciones que se controlan por medio de este sistema automatizado se encuentran el nivel de medio líquido, la frecuencia de inmersión, el tiempo de aireación, la presión, la composición del entorno gaseoso, entre otros (Georgiev *et al.*, 2014).

#### **2.4. Aspectos determinantes en el rendimiento del cultivo *in vitro***

La intensidad lumínica representa un factor importante en la calidad de las plántulas, ya que varía en dependencia del número y densidad de los explantes, al modificar la temperatura interna del frasco, lo que puede ocasionar una pérdida de la capacidad de las plantas para absorber los nutrientes. En condiciones lumínicas elevadas, el porcentaje de transpiración y la competencia por luz genera plantas más elongadas y etioladas, características que podrían afectar en su posterior aclimatación (Daquinta, Ramos, Lezcano, Rodríguez, y Escalona, 2000). En los sistemas de cultivo semisólido, la falta de intercambio gaseoso provoca una disminución en el desarrollo de brotes, a consecuencia de la acumulación de etileno que

merma la disponibilidad de oxígeno, en los medios líquidos, para favorecer la oxigenación, los explantes pueden colocarse en agitadores orbitales, y en los SIT, la atmósfera gaseosa se recambia con cada inmersión (Rodríguez Beraud y Morales Ulloa, 2015, Igarza Castro *et al.*, 2012).

La densidad de los explantes tanto en medio semisólido como en medio líquido, es otro factor a tomar en cuenta. Investigaciones demuestran que cuando los explantes no tienen competencia entre sí, es decir, cada uno tiene la cantidad de nutrientes necesarios accesibles todo el tiempo, crecen más lento, mientras que, con competencia mínima, se obtiene un mayor desarrollo y brotación en menos tiempo. Por el contrario, a densidades altas, se obtienen plantas más elongadas, pero con deficiencias en brotación y calidad (Daquinta Gradaille *et al.*, 2000). En los SIT, la densidad de plantas por mililitro de medio de cultivo es un factor igualmente importante, sin embargo, la competencia por nutrientes se minimiza, ya que, en la inmersión, se da una distribución homogénea de nutrientes (Cruzat G, 2009).

El sistema semisólido permite que las plantas mantengan una orientación, así un crecimiento organizado de raíces y brotes generados, al no estar sumergidos, no requieren de aireación, permiten la observación sencilla a través de las paredes del recipiente, y la manipulación de los explantes es más fácil, ya que no se forman agregados que en algunas ocasiones se obtienen en los SIT (George *et al.*, 2008).

El tamaño del recipiente donde se encuentran contenidas las plántulas también genera condiciones influyentes. A menor densidad vegetal y mayor volumen del recipiente, se da una menor transpiración y por lo tanto una mayor humedad relativa, generando mayor cantidad de brotes, pero de bajo crecimiento, por lo tanto es de gran importancia establecer el mejor envase de cultivo en función de la especie con la que se trabaja (Rodríguez Beraud y Morales Ulloa, 2015). En los SIT, el volumen del recipiente influye en la capacidad de producción, sin embargo, pueden incluirse sopladors adicionales o suministros de gases como dióxido de carbono que recambian la atmósfera del frasco en cada inmersión, por lo que el efecto de la transpiración se ve disminuido (Cruzat G, 2009).



El efecto del pH para los diferentes tipos de cultivo *in vitro*, también es un factor importante, este componente afecta la absorción de nutrientes, así como las actividades enzimáticas y hormonales en plantas. Los explantes producen exudados y liberan al medio de cultivo una variedad de sustancias secundarias que alteran la composición del medio y de los nutrientes asequibles, las vías metabólicas por las que las plantas absorben las fuentes de nitrógeno son las que ocasionan la variación en el pH del medio y, a su vez, una reducción en el ATP. Además, puede darse una alteración de la región extracelular de las células vegetales, donde se pueden dar cambios químicos como la conversión de fosfato inorgánico en orgánico. Todos estos cambios contribuyen a que las plántulas puedan verse afectadas en etapas posteriores de su desarrollo (Huda *et al.*, 2009).

## **2.5. Sistemas de Inmersión Temporal**

Buscando una reducción de los costos al prescindir del agente gelificante, y una automatización del protocolo que disminuya la mano de obra, se implementaron los medios líquidos, sin embargo, es frecuente que las plántulas presenten asfixia e hiperhidricidad (Ziv, 2005). Para contrarrestar estos efectos, surgen los sistemas de inmersión temporal, también conocidos como biorreactores de inmersión temporal, los cuales son sistemas especializados, conformados por uno o dos frascos de cultivo y un control computarizado, su fin principal es la producción masiva de biomasa vegetal, a bajo costo, para su uso inmediato o posterior. Estos sistemas garantizan las condiciones asépticas y crean ambientes ideales para la transferencia de nutrientes y gases (Georgiev *et al.*, 2014).

Escalona *et al.* (1999) diseñaron un sistema de inmersión temporal, el cual consiste en dos frascos idénticos, en uno permanecen las plantas y en el otro el medio nutritivo. Ambos contenedores están conectados entre sí por mangueras de silicona o plástico, a su vez, cada frasco está conectado a una vía que lleva flujo de aire desde un compresor. El aire que ingresa al sistema es esterilizado mediante filtros hidrofóbicos con tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . El aire genera una diferencia de presión que ocasiona que el líquido se transfiera de un frasco a

otro, primeramente, hacia el contenedor con las plántulas (llenado) sumergiéndolas en el medio de cultivo durante el tiempo establecido y posteriormente regresando el medio al contenedor (vaciado). La frecuencia y duración de la inmersión se programa mediante temporizadores computarizados, que se conectan al sistema a través de válvulas solenoides.

## **2.6. Ventajas y desventajas de los Sistemas de Inmersión Temporal**

La reconocida superioridad en la calidad de los explantes y brotes provenientes de los SIT se ha atribuido, a que, dentro del frasco de inmersión, diariamente se renueva la atmósfera gaseosa y se mantiene una saturación permanente de humedad relativa por las características hidrofóbicas del filtro de aire, que asegura la asepsia del aire que ingresa al sistema en cada periodo de inmersión. El recambio de aire evita la acumulación de gases nocivos en la atmósfera del frasco de cultivo, mientras que, con cada inmersión se garantiza que la capilaridad de los tejidos vegetales mantenga una película del medio líquido en la superficie de los explantes, estableciendo una presencia de nutrientes permanente y evitando la desecación (Igarza Castro *et al.*, 2012).

Los SIT son una opción para la reducción de costos, espacio y tiempo requerido para la multiplicación masiva de plantas, al permitir una semiautomatización del proceso e incrementando la producción (Castro R *et al.*, 2002; Posada Pérez *et al.*, 2003). El cambio del medio de cultivo puede realizarse por simple trasvase, minimizando las operaciones manuales, el tiempo requerido y la manipulación de las plántulas. Empleando distintas técnicas, puede incluso prescindirse del proceso de autoclavado. La ausencia del agente gelificante, por ejemplo, contribuye a una mejor disponibilidad del agua y de los nutrientes en el medio, y disminuye significativamente los costos referentes al uso este reactivo (Alvard, Cote, y Teisson, 1993).

Sharry, Adema, y Abedini (2015), mencionan que los costos de producción del medio de cultivo se encuentran cerca del 15% de la inversión, mientras que el costo del agente

gelificante representa un 70% del costo del medio de cultivo, por tanto, prescindir de dicho compuesto en la producción masiva, representa una ventaja económica sobre el medio de cultivo semisólido. Otra ventaja de los SIT con respecto al medio semisólido, consiste en la capacidad de los contenedores que pueden utilizarse, siendo de mayor volumen los empleados en SIT debido a la facilidad operacional de estos sistemas en cuanto al montaje y desmontaje de los recipientes, mientras que no es práctico emplear recipientes similares a los utilizados en SIT con medios semisólidos (Etienne y Berthouly, 2002).

Por otra parte, el burbujeo originado en la inmersión contribuye en la concentración de oxígeno disuelto y en la dispersión de los tejidos vegetales. Las principales condiciones a establecer en los sistemas de inmersión temporal, son el tiempo y la frecuencia de las inmersiones, en dependencia del tratamiento, la especie y el tejido a evaluar (Igarza Castro et al., 2012). El tiempo de inmersión consiste en el tiempo que durará el medio líquido en contacto con el material vegetal y la frecuencia se refiere a la cantidad de inmersiones que se realizarán (Etienne y Berthouly, 2002). La eficacia en la proliferación de brotes se optimiza con las proporciones del volumen del medio y el del recipiente de cultivo (Etienne y Berthouly, 2002).

La inmersión temporal también es un buen método para disminuir el porcentaje de hiperhidricidad que se presenta con frecuencia en los medios líquidos estáticos. Esta condición, que origina una apariencia vítrea y una succulencia de tejidos, es producida por la presencia y almacenamiento de gran cantidad de agua en los espacios apoplásticos, así como el bajo contenido de oxígeno (Georgiev *et al.*, 2014). Las plantas hiperhídricas pueden presentar desórdenes fisiológicos importantes e hipoxia en los tejidos (De Fera, Silva, Jiménez, y Milián Chávez, 2002; Posada Pérez *et al.*, 2003). Esta condición puede controlarse ajustando los tiempos y frecuencias de inmersión, así como con ciclos de soplado adicionales (Etienne y Berthouly, 2002).

En los SIT, la exposición al entorno gaseoso facilita la difusión del oxígeno, y además, algunos sistemas permiten el suministro de dióxido de carbono, aumentando la síntesis de

metabolitos secundarios, favoreciendo procesos embriogénicos y preparando y activando las estructuras estomáticas tempranamente (Georgiev *et al.*, 2014).

La capacidad de los explantes de adaptarse a las condiciones dentro del SIT, puede generar un conjunto de características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas que les permiten un mejor aprovechamiento de los nutrientes del medio dentro de cada recipiente de inmersión. (Igarza Castro *et al.*, 2012). Se ha demostrado que, en etapas posteriores a la multiplicación, como lo son la aclimatación y el enraizamiento, las plantas procedentes de los SIT presentan mejor desempeño que el material obtenido en medios semisólidos o líquidos, asociados a mejores procesos de fotosíntesis y transpiración (Etienne y Berthouly, 2002; Quiala *et al.*, 2012).

Entre las desventajas de los SIT, se encuentra la elevada inversión inicial en infraestructura y en la automatización computarizada. Otra desventaja importante a considerar es que la presencia de contaminación ocasiona la pérdida de todo el material, al ser medio líquido, todos los explantes son bañados propiciando la contaminación de todo el lote, y siendo propagación masiva, esta contaminación representa pérdidas superiores a las que podría darse en semisólido. Debido a ello, debe prestarse especial atención a la esterilidad de los sistemas y garantizar el mantenimiento de los contenedores libres de microorganismos (Rodríguez, Escalona, Rodríguez, Cid, y González, 2000).

### **3. Marco Metodológico**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Organismos Fototróficos del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) perteneciente al Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT). Se trabajó con semilla seleccionada, de padres conocidos y cruces controlados, pertenecientes a un programa de mejoramiento genético, propiedad de la empresa NovelTeak y donadas por dicha empresa.

### 3.1. Protocolo de apertura e introducción de las semillas

Las semillas debidamente separadas por genotipo (aproximadamente 350 frutos), fueron extraídas del pericarpo y lijadas hasta eliminar los tricomas y la parte blanda exterior, con el fin de facilitar su apertura.

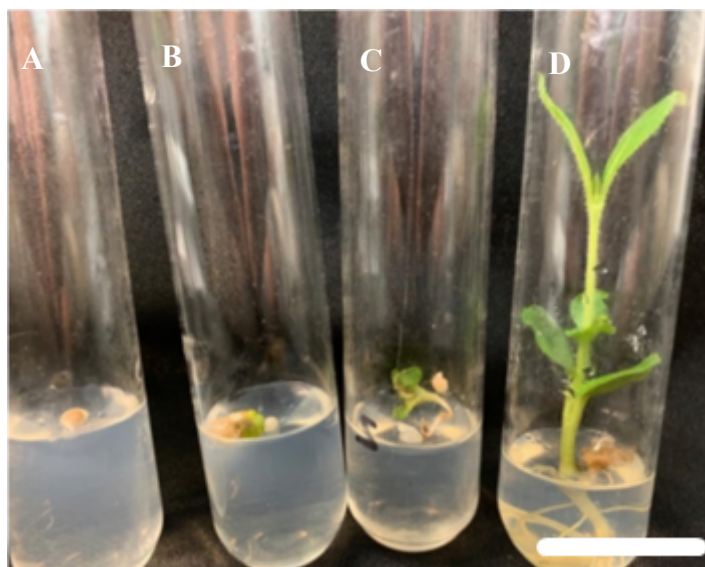
De manera mecánica, se quebró el endocarpo cuidadosamente para abrir la drupa sin dañar las semillas internas, las cuales fueron extraídas con ayuda de pinzas y bisturí (figura 1).



**Figura 1.** Extracción de semillas de teca. A. Fruto con exocarpo; B. Frutos con endocarpo y lijados; C. Semillas de teca dentro del fruto. Barra de escala: 1cm.

Las semillas extraídas se desinfectaron mediante la metodología establecida por el Laboratorio de Biotecnología del INISEFOR, la cual aún no ha sido publicada, por lo tanto, no se brindan detalles del procedimiento.

Posterior a la desinfección, las semillas se sembraron en 10mL de medio Murashige y Skoog (1962) (M&S) enriquecido con 0,5 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) contenido en tubos de ensayo. Se realizaron evaluaciones constantes de todo el material, tomando datos del desarrollo cada siete días, por aproximadamente 6 semanas (figura 2).



**Figura 2.** Proceso de germinación de las semillas de teca *in vitro*. A. 1 día; B. 7 días; C. 14 días; D. 22 días. Barra: 1cm.

### 3.2. Medio de multiplicación y desarrollo

Las semillas de cada genotipo se germinaron simultáneamente. Las plántulas germinadas se sometieron a cuatro ciclos de multiplicación en medio M&S semisólido para alcanzar el número de plantas requeridas para el ensayo.

El recambio a medio fresco de todas las plantas se realizó cada 30 días. Una vez que los brotes sembrados en medio de multiplicación alcanzaran una altura mínima de 3 cm y se contara con 250 plantas por genotipo, se eligieron las mejores tomando en cuenta características fenotípicas cualitativas (vigor, rectitud, apariencia, ausencia de vitrificación, necrosis o clorosis) (Figura 3).

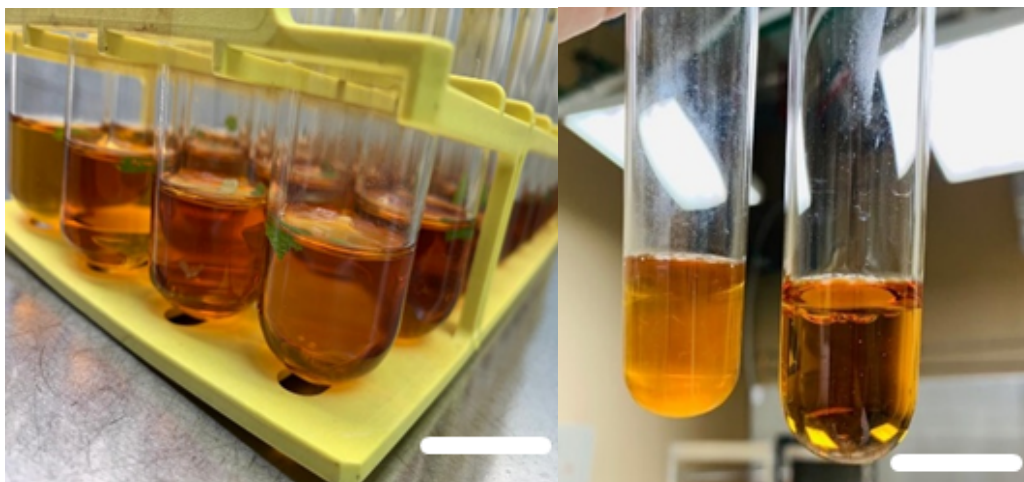


**Figura 3.** Plantas de teca con características idóneas para el ensayo. Barra de escala: 1cm.

### **3.3. Pruebas para verificar ausencia de contaminantes fúngicos y bacterianos en las plántulas.**

Se realizaron dos pruebas con el fin de descartar contaminación bacteriana o fúngica de los explantes previo a la siembra de estos en los BIT. La primera prueba consistió en sembrar los explantes en medio de cultivo M&S, suplementado con 0,288 g/L de peptona y 0,065 g/L de levadura. Como resultado de esta prueba las plántulas que evidenciaran contaminación fueron descartadas del ensayo (Hernández Aguilar *et al.*, 2013).

De manera complementaria, en el caso de las plántulas libres de contaminación visible, se les realizó una segunda prueba. Para la cual, se extrajo un segmento de hoja y se incubó durante cuatro días en medio líquido de tripticasa y soya a 37°C (figura 4).



**Figura 4.** Pruebas de fragmentos de hoja de teca para evidenciar presencia de microorganismos. Barra de escala: 1cm.

Las plántulas que evidenciaran contaminación en uno o en los dos tipos de pruebas fueron descartadas.

### **3.4. Diseño experimental**

Para evaluar la producción máxima de brotes con SIT, se utilizaron los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) según concepto de Escalona et al. (1999), y con similitud al experimento realizado por Quijala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012).

Los frascos utilizados tanto para los tratamientos en medio semisólido (MSS) así como para armar los BIT, fueron de marca Nalgene® de poliuretano con una capacidad de 2 L. En el caso de los BIT, tenían mangueras de silicona y filtros hidrófobos Sartorius® de 0,2  $\mu\text{m}$  adaptados en sus tapas y conectados al sistema automatizado Smart Bit® (figura 5).





**Figura 5.** Frascos utilizados tanto para los BIT como para los MSS. Barra de escala: 1cm.

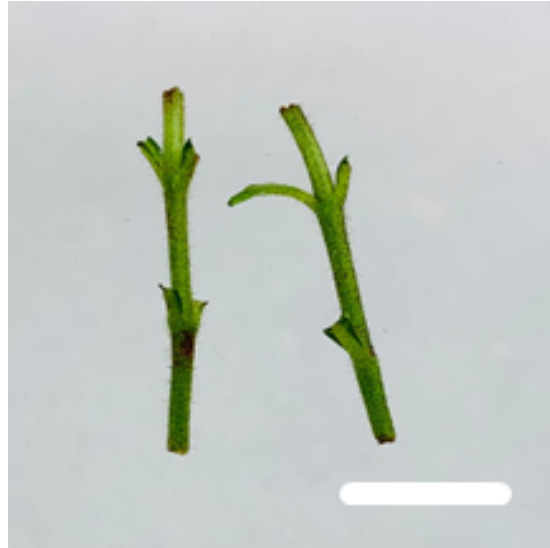
Se evaluó la capacidad de multiplicación de dos genotipos seleccionados de teca (618 y 117) en medio de cultivo M&S con 3% de sacarosa, con tres concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L) y pH de 5,7 (Cuadro 1). Los medios semisólidos fueron gelificados con phytigel (3,5 g/L). Por su parte, el tiempo y frecuencia de inmersión de los explantes en SIT fue de 1 minuto cada 24 horas, y el experimento tuvo una duración de 30 días (Cuadro 1.).

Cuadro 1. Diseño experimental.

Genotipo seleccionado	Tratamientos	Concentración de BAP	Sistema
618	T1 (Control)	0,0	BIT
	T2	0,5	BIT
	T3	1,0	BIT
	T4	1,5	BIT
	T1 (Control)	0,0	MSS
	T2	0,5	MSS
	T3	1,0	MSS
	T4	1,5	MSS
117	T1 (Control)	0,0	BIT
	T2	0,5	BIT
	T3	1,0	BIT
	T4	1,5	BIT
	T1 (Control)	0,0	MSS
	T2	0,5	MSS
	T3	1,0	MSS
	T4	1,5	MSS

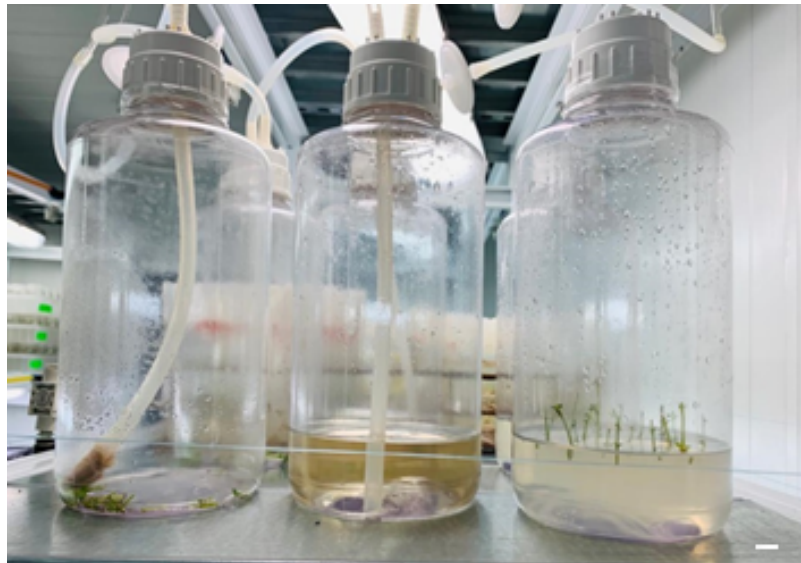
BIT: Biorreactor de Inmersión Temporal, MSS: Medio Semisólido.

Tanto en los BIT como los frascos con medio semisólido, se empleó una densidad de 20ml/explante, es decir, 20 segmentos nodales con 400mL de medio de cultivo. Los explantes fueron sembrados sin hojas, con dos nudos, con una longitud de 1,5 a 2,0 cm y decapitados para eliminar dominancia apical y fomentar la brotación (Jiménez-Terry y Agramonte, 2013; D ) (figura 6).



**Figura 6.** Segmentos nodales de teca utilizados para sembrarlos en los diferentes tratamientos. Barra de escala: 1cm.

Durante los treinta días de ensayo, los biorreactores y frascos de cultivo se mantuvieron en cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de  $24,2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  generada por tubos fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a  $25 \pm 2$  °C. Se realizaron revisiones periódicas con el fin de detectar cualquier inconveniente en el desarrollo de la investigación (figura 7).



**Figura 7.** BIT y MSS en cuarto de crecimiento. Barra de escala: 1cm

### 3.5. Evaluación de los explantes

Transcurridos 30 días de cultivo, cada tratamiento fue evaluado con el fin de cuantificar los brotes generados, los rebrotes (brotes generados a partir de un brote), el crecimiento en centímetros del brote de mayor longitud, número de hojas y el peso seco de cada explante.

Se cuantificó el peso fresco (PF) de cada planta empleando para ello una balanza analítica y posteriormente, se colocaron en estufa durante 48 horas a 65 °C, para determinar el peso seco (PS) de cada plántula. El contenido de agua (CA) se calculó como sigue,

$$CA(\%) = \frac{(PF - PS)}{PF} * 100$$

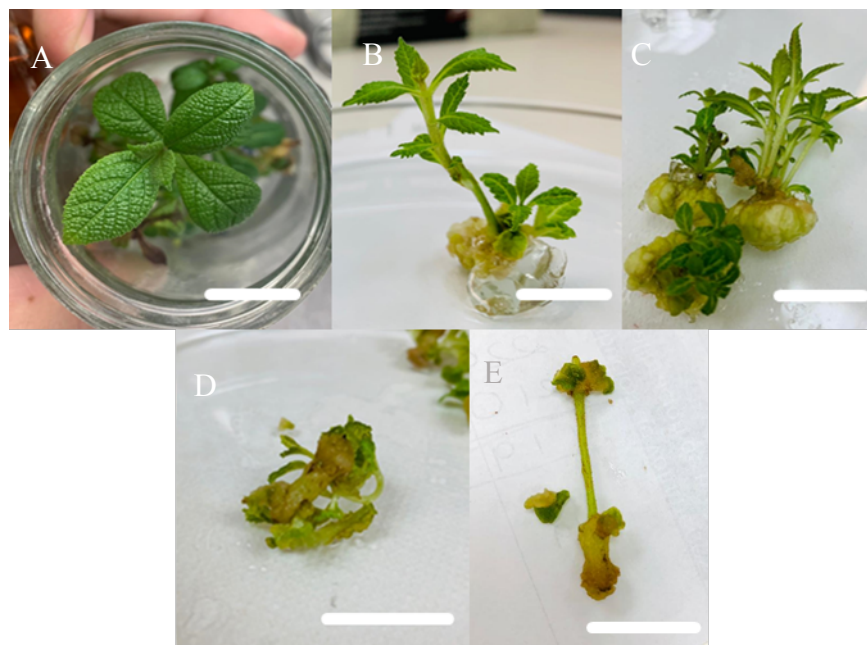
El coeficiente de multiplicación (CM) se calculó como el cociente del número final de brotes totales (BF) entre el número inicial de brotes (BI) (Hernández Aguilar *et al.*, 2013):

$$CM = \frac{BF}{BI}$$

Adicionalmente, de manera cualitativa se determinó la presencia o ausencia de raíz, callo e hiperhidricidad en los explantes, y se elaboró una escala de calidad, tomando en cuenta el vigor, la coloración, presencia / ausencia de hiperhidricidad, así como estructura y desarrollo de las plantas (Cuadro 2, Figura 8).

Cuadro 2. Escala de calidad generada a partir de las observaciones, para evaluar cualitativamente los brotes obtenidos en cada tratamiento.

Descripción	Escala de calidad
Brotes vigorosos, bien desarrollados, hojas bien formadas, coloración verde oscuro brillante, sin hiperhidricidad.	5
Brotes con menos vigor, desarrollados, hojas bien formadas, coloración verde brillante, sin hiperhidricidad.	4
Brotes no vigorosos, hojas formadas, coloración verde oscuro opaco o con indicios de colores claros, con poca hiperhidricidad.	3
Brotes deformes, con callo, hojas poco desarrolladas, coloración verde muy claro, hiperhídrico.	2
Brotes atrofiados o ausentes, con callo, hojas no desarrolladas o ausentes, coloración verde muy claro a blanco, muy hiperhídrico.	1



**Figura 8.** Escala de calidad para la clasificación de plantas de *Tectona grandis*: A. Puntuación 5; B. Puntuación 4; C. Puntuación 3; D. Puntuación 2; E. Puntuación 1. Barra de escala: 1cm.

### **3.6. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el programa estadístico Minitab, versión 19.2020.1.0. Para comparar los tratamientos con diferentes medios y sistemas de cultivo, se realizó un Modelo Lineal General (valor de alfa=0,05) que permitió analizar los datos correspondientes a brotación, mayor longitud del brote, número de hojas y peso seco, y comparaciones múltiples mediante pruebas de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Para evaluar la fuerza en la relación entre las variables número de brotes y número de hojas, se realizó una correlación de Pearson, utilizando de igual manera Minitab.

Los resultados obtenidos de la evaluación de variables cualitativas fueron graficados con el fin de describir el comportamiento de estas en los diferentes tratamientos.

## 4. Resultados

### 4.1. Análisis de las variables cuantitativas del genotipo 618

Al aplicar el Modelo Lineal General, para analizar las variables cuantitativas, fue posible determinar el efecto tanto del medio de cultivo, como del sistema y la interacción de ambos (cuadro 3). Este modelo es más flexible en cuanto al cumplimiento de supuestos estadísticos de normalidad y homocedasticidad que otras pruebas paramétricas, por lo cual permitió un análisis completo y confiable de las variables.

A partir del análisis de los datos correspondientes a variables cuantitativas, se evidenció que el medio de cultivo tiene un efecto significativo sobre todas las variables analizadas (brotación, rebrotación, brotes totales (brotes más rebrotes), mayor longitud del brote, número de hojas y peso seco); mientras que el sistema surtió un efecto significativo únicamente para las variables de mayor longitud del brote y peso seco (cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de los factores y su interacción sobre las variables cuantitativas de *T. grandis* perteneciente genotipo 618, mediante Modelo Lineal General.

Factores	Variables					
	Brotes	Rebrotes	Brotes totales	Mayor longitud del brote	Hojas	Peso seco
Medio de cultivo	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,005	p=0,000
Sistema	p=0,093	p=0,809	p=0,309	p=0,000	p=0,825	p=0,000
Medio de cultivo*Sistema	p=0,004	p=0,001	p=0,003	p=0,000	p=0,000	p=0,000

Prueba estadística con valor de  $\alpha=0,05$ .

Por otro lado, la interacción de los factores medio de cultivo y sistema ejercieron un efecto significativo para todas las variables, cuyo efecto comparativo entre tratamientos se detalla en el cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto de la concentración de BAP y sistema de cultivo en el desarrollo de explantes de *T. grandis* del genotipo 618.

Sistema	Tratamiento		Variables					
	Id	Concentración de BAP (mg/L)	Número de brotes (v.e p=0,004)	Número de rebrotes (v.e p=0,001)	Número de brotes totales (v.e p=0,003)	Mayor longitud del brote (v.e p=0,000)	Número de hojas (v.e p=0,000)	Peso seco (mg) (v.e p=0,000)
BIT	T1	0,0	2,00 ± 0,56 <sup>d</sup>	0,10 ± 0,45 <sup>de</sup>	2,10 ± 0,72 <sup>d</sup>	4,19 ± 1,26 <sup>a</sup>	13,90 ± 3,4 <sup>bc</sup>	31,85 ± 13,27 <sup>cd</sup>
	T2	0,5	2,40 ± 0,82 <sup>cd</sup>	2,30 ± 1,81 <sup>ab</sup>	4,70 ± 2,13 <sup>abc</sup>	4,47 ± 0,97 <sup>a</sup>	20,45 ± 5,80 <sup>ab</sup>	65,90 ± 19,08 <sup>bc</sup>
	T3	1,0	2,65 ± 1,84 <sup>deb</sup>	1,65 ± 2,16 <sup>abcd</sup>	4,30 ± 3,54 <sup>bc</sup>	0,97 ± 1,32 <sup>c</sup>	12,80 ± 13,62 <sup>bc</sup>	71,09 ± 60,07 <sup>b</sup>
	T4	1,5	4,15 ± 1,09 <sup>a</sup>	1,20 ± 1,67 <sup>bcd</sup>	5,35 ± 2,06 <sup>ab</sup>	1,80 ± 0,69 <sup>bc</sup>	20,35 ± 7,67 <sup>ab</sup>	155,36 ± 77,76 <sup>a</sup>
MSS	T1	0,0	2,85 ± 1,22 <sup>bcd</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>e</sup>	2,85 ± 1,23 <sup>cd</sup>	1,26 ± 0,56 <sup>bc</sup>	12,60 ± 4,99 <sup>c</sup>	11,340 ± 3,68 <sup>d</sup>
	T2	0,5	2,50 ± 1,00 <sup>cd</sup>	0,70 ± 1,08 <sup>cde</sup>	3,20 ± 1,74 <sup>bcd</sup>	1,67 ± 1,16 <sup>bc</sup>	14,40 ± 6,84 <sup>bc</sup>	17,15 ± 12,17 <sup>d</sup>
	T3	1,0	3,60 ± 0,75 <sup>ab</sup>	2,95 ± 1,96 <sup>a</sup>	6,55 ± 2,23 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,67 <sup>b</sup>	23,50 ± 8,68 <sup>a</sup>	21,03 ± 9,16 <sup>d</sup>
	T4	1,5	3,45 ± 1,19 <sup>abc</sup>	1,85 ± 2,30 <sup>abc</sup>	5,30 ± 2,99 <sup>ab</sup>	0,98 ± 0,43 <sup>c</sup>	18,10 ± 7,69 <sup>abc</sup>	14,77 ± 7,34 <sup>d</sup>

v.e: Valor del estadístico

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey, P≤0,05).



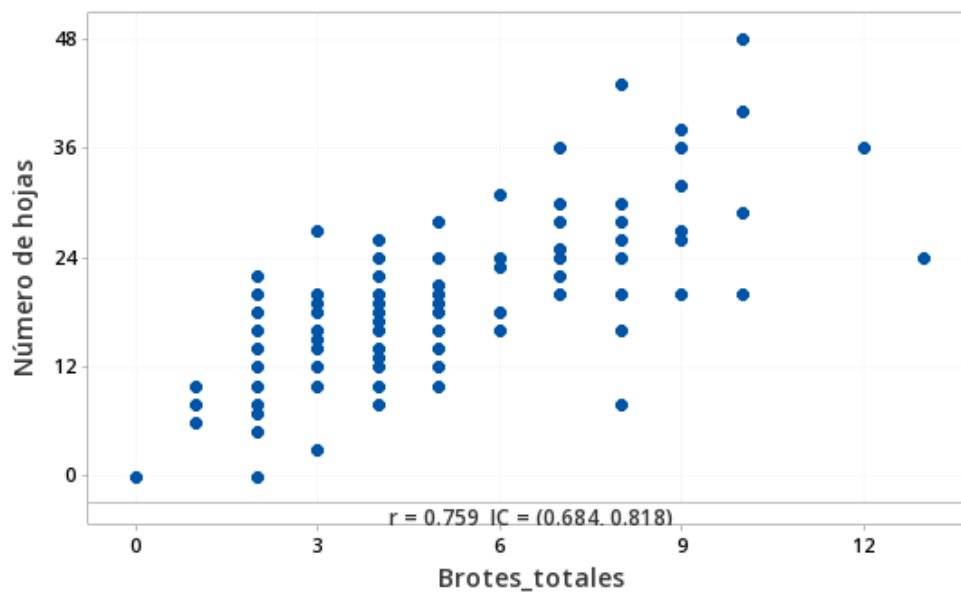
Los análisis estadísticos del comportamiento del material seleccionado 618 expuesto a diferentes concentraciones de BAP, presentados en el cuadro 4, evidenciaron que, en el sistema BIT el número de brotes fue significativamente mayor en el tratamiento suplementado con la mayor concentración de BAP (1,5mg/L). Para el medio semisólido, únicamente difieren los tratamientos suplementados con 0,5 y 1,0 mg/L de BAP, sin embargo, no se observa un efecto determinante entre los tratamientos.

Pese a que el valor del estadístico  $p$  para la variable número de rebrotes indica que existen diferencias significativas entre tratamientos, no se muestra una tendencia clara que sugiera un efecto contundente, lo anterior tanto para medio semisólido como para inmersión temporal. Por su parte, la variable brotes totales, que contempló la sumatoria de brotes y rebrotes, para el medio semisólido, muestra que las dos concentraciones más altas en medio semisólido inducen una brotación significativamente mayor con respecto al tratamiento control. El tratamiento MSS T4 no es estadísticamente significativo del tratamiento MSS T2. Para el sistema BIT, el tratamiento control presentó menor cantidad de brotes totales en comparación con todos los tratamientos suplementados con el regulador de crecimiento. No obstante, entre éstos no hubo diferencias significativas. Además, cabe destacar, que no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos control en ambos sistemas de cultivo para esta variable.

Por otra parte, el crecimiento del brote de mayor longitud fue significativamente superior en el BIT con los medios de cultivo sin regulador de crecimiento y suplementado con la concentración más baja de éste (tratamientos T1 y T2, respectivamente). Lo anterior no fue detectado en MSS.

En relación al número de hojas, no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos ni sistemas. Respecto al peso seco, el tratamiento que presentó el valor más alto fue el tratamiento enriquecido con 1,5mg/L de BAP en BIT, mientras que los cuatro tratamientos del medio semisólido no presentaron diferencias significativas entre sí.

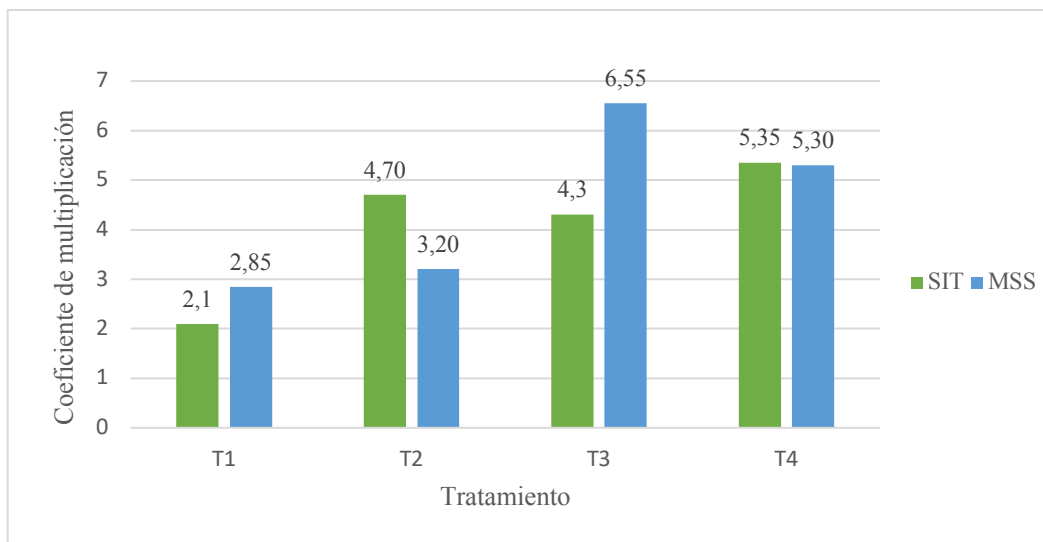
Al correlacionar las variables número de hojas con número de brotes, se obtuvo un valor de  $p$  de 0,000 y un coeficiente de Pearson de 0,759, lo cual sugiere la existencia de correlación lineal positiva de 75,9% entre las variables mencionadas (figura 9).



**Figura 9.** Correlación lineal de Pearson entre número de hojas y brotes totales de *T. grandis* genotipo 618.

#### 4.2. Coeficiente de multiplicación para el genotipo 618.

Al calcular el coeficiente de multiplicación de los diferentes sistemas y medios de cultivo empleados, se obtuvieron los valores mostrados en la figura 10.

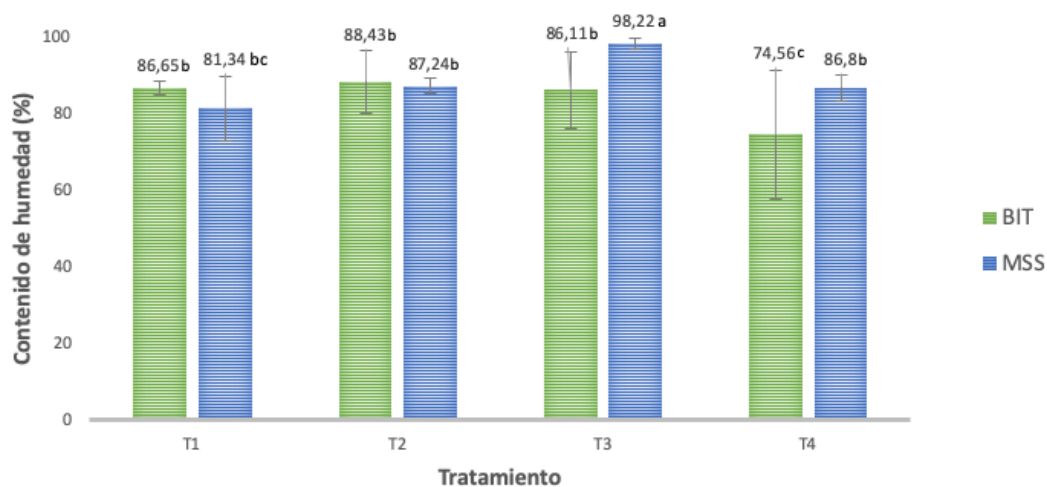


**Figura 10.** Efecto de la concentración de BAP sobre el coeficiente de multiplicación en explantes de *T. grandis*, genotipo 618 cultivados en biorreactores de inmersión temporal (BIT) y medio semisólido (MSS). (T1: 0,0 mg/l; T2: 0,5 mg/L; T3: 1,0 mg/L; T4: 1,5 mg/L).

El coeficiente de multiplicación para el genotipo 618 fue mayor en los tratamientos en los que se adicionó BAP al medio de cultivo. Para los SIT, el tratamiento que obtuvo un valor más alto fue el T4, seguido de T2 y T3. En cuanto al medio semisólido, el tratamiento T3 generó el coeficiente de multiplicación más alto, seguido de T4 y T2 (figura 10).

#### 4.3. Contenido de agua del genotipo 618 cultivados en medio semisólido y en BIT.

Al calcular el contenido de agua de los diferentes sistemas y medios de cultivo empleados, se obtuvieron los valores porcentuales mostrados en la figura 11.



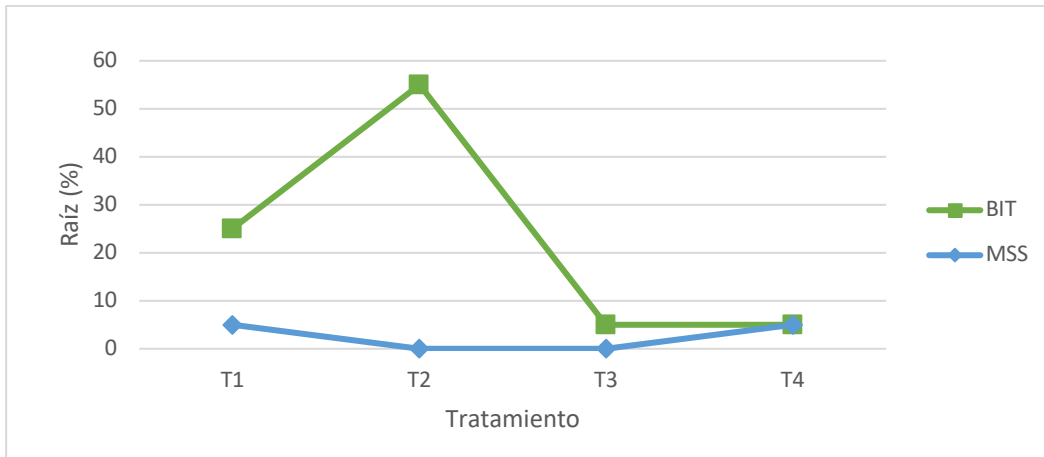
**Figura 11.** Efecto del sistema de cultivo en el contenido de agua de plantas de *T. grandis*, genotipo 618, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

Al comparar el contenido de agua de las plantas mediante un Modelo Lineal General, se evidenció que el tratamiento suplementado con 1,0mg/L de BAP, cultivado en sistema semisólido, obtuvo valores mayores estadísticamente significativos, mientras que el tratamiento control fue el más bajo. Para el sistema de inmersión temporal, el mayor contenido de humedad se obtuvo en el tratamiento T2 (0.5mg/L), y el más bajo en el tratamiento suplementado con 1,5mg/L.

#### 4.4. Análisis de las variables cualitativas del genotipo 618.

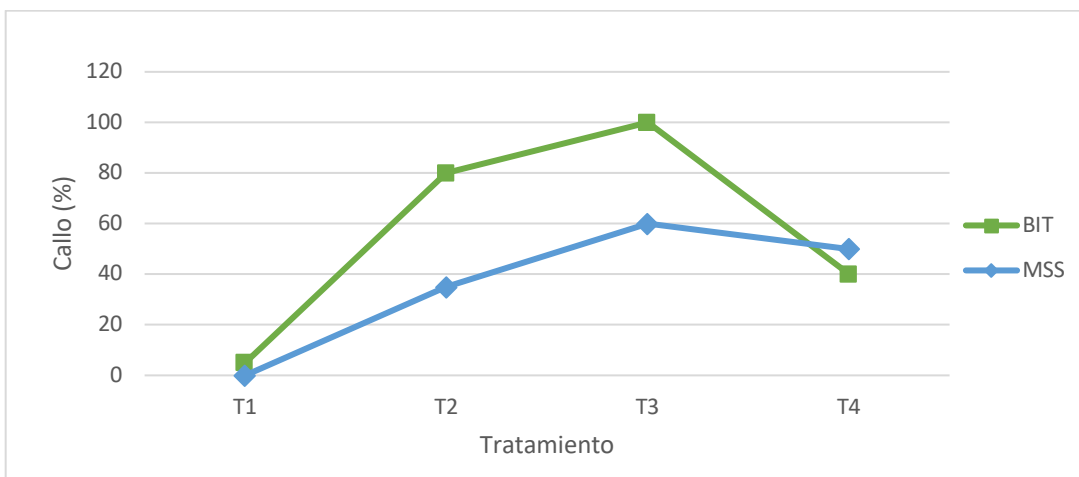
La evaluación de la presencia o ausencia de raíz muestra que la rizogénesis se vio favorecida en los sistemas de inmersión temporal, principalmente en los tratamientos control y con 0,5mg/L de BAP (figura 12).



**Figura 12.** Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de raíz en explantes de *Tectona grandis*, genotipo 618 cultivados en Biorreactores de Inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0 mg/l; T2: 0,5 mg/L; T3: 1,0 mg/L; T4: 1,5 mg/L).

El mayor porcentaje de plantas con raíz se obtuvo en el BIT con la menor concentración de citoquinina añadida (T2), seguido del tratamiento control. Para el medio semisólido, solo se encontró una planta con raíz en el tratamiento control y en el tratamiento con mayor concentración de BAP.

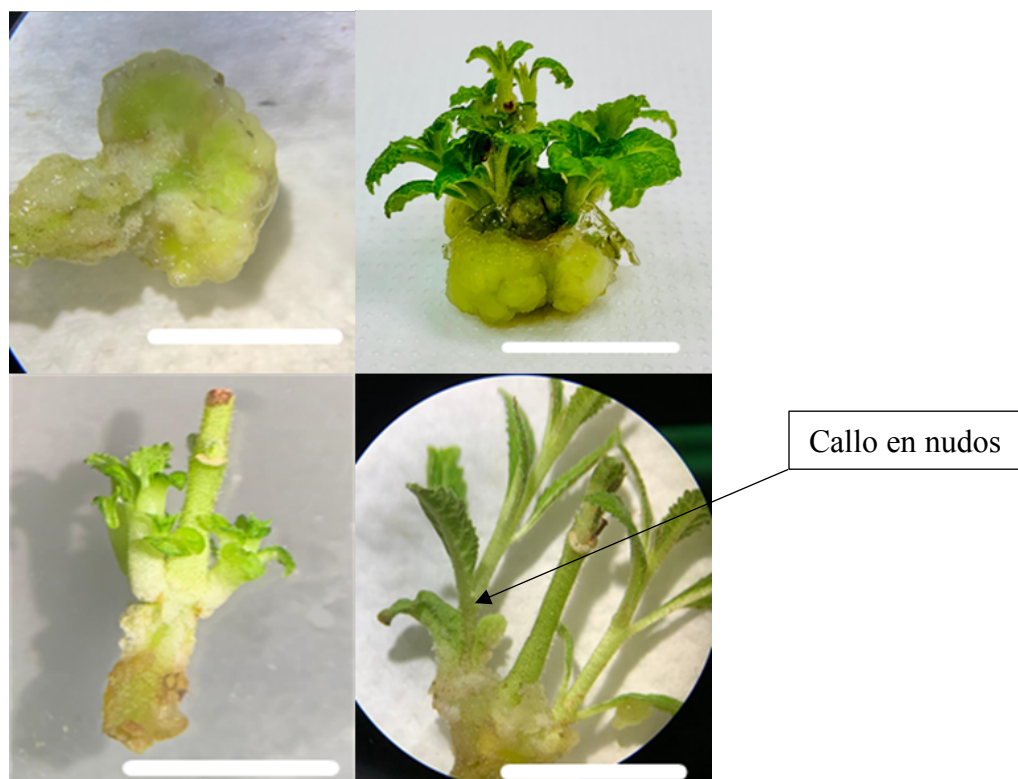
Los resultados de la presencia de callo en los explantes cultivados en ambos sistemas y en los diferentes medios de cultivo se muestran en la figura 13.



**Figura 13.** Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de callo en explantes de *Tectona grandis*, genotipo 618 cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

El mayor porcentaje de callo se obtuvo en el BIT con el tratamiento que contenía 1,0 mg/L de BAP, seguido del tratamiento suplementado con 0,5 mg/L de dicho compuesto. El MSS mostró una tendencia similar al callo obtenido en BIT para todos los tratamientos, pero con una reducción de aproximadamente el 50% y el 40% en comparación de los tratamientos T2 y T3 de los BIT, respectivamente. En el tratamiento T4, el MSS generó un porcentaje superior cercano al 10% respecto al BIT.

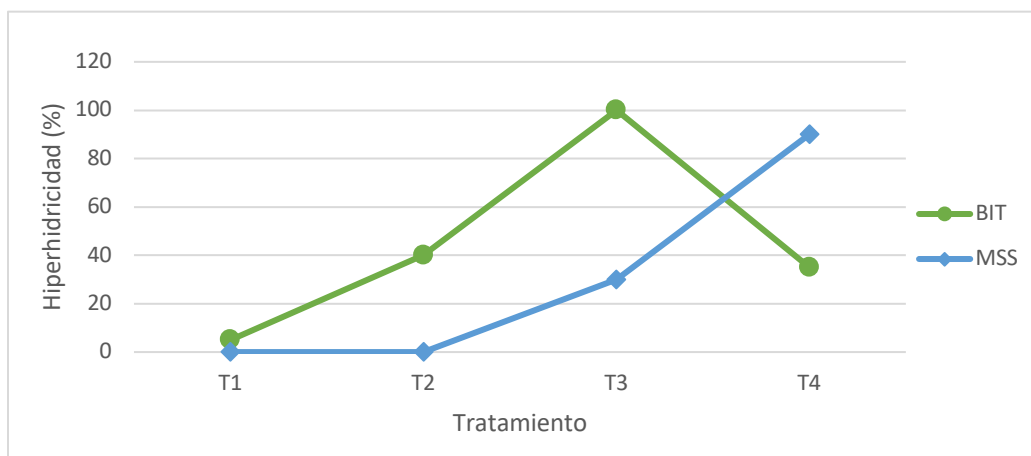
Es importante mencionar que existen diferencias cualitativas entre las masas callosas observadas en los sistemas, siendo los callos formados en medio semisólido más densos y sólidos y crecen directamente en el sitio de corte en contacto con el medio de cultivo. El callo formado en los BIT fue más pequeño y esponjoso, se encontraban en los nudos de las plantas y de los brotes nuevos (figura 14).



**Figura 14.** Diferencias morfológicas del callo formado en los explantes de *T. grandis*. A: MSS (A1. Corte longitudinal de un callo, A2. Callo entero). B: BIT (B1. Callo friable en la base (en contacto con el medio de cultivo semisólido), B2. Callo en los nudos y no en el segmento basal.

Barra de escala: 1cm.

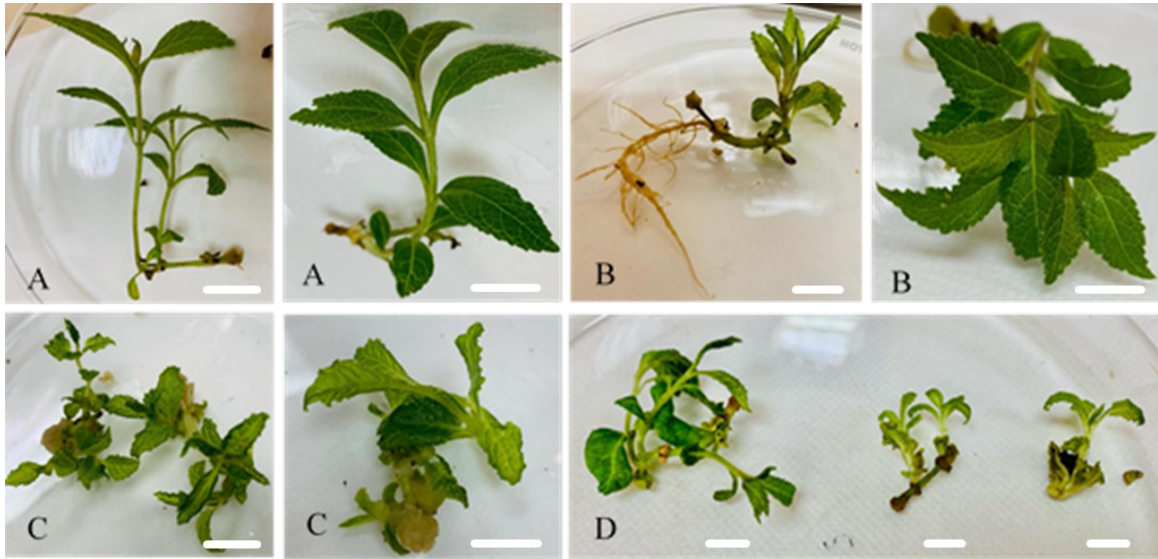
Los explantes cultivados en BIT fueron hiperhídricos en los tratamientos suplementados con BAP. En sistema semisólido, la hiperhidricidad empezó a partir de concentraciones mayores a 1,0 mg/L (figura 15).



**Figura 15.** Efecto de la concentración de BAP sobre la hiperhidricidad en explantes de *Tectona grandis*, genotipo 618 cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1: 0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

#### 4.5. Apreciación fenotípica de los explantes por tratamiento y sistema del genotipo 618.

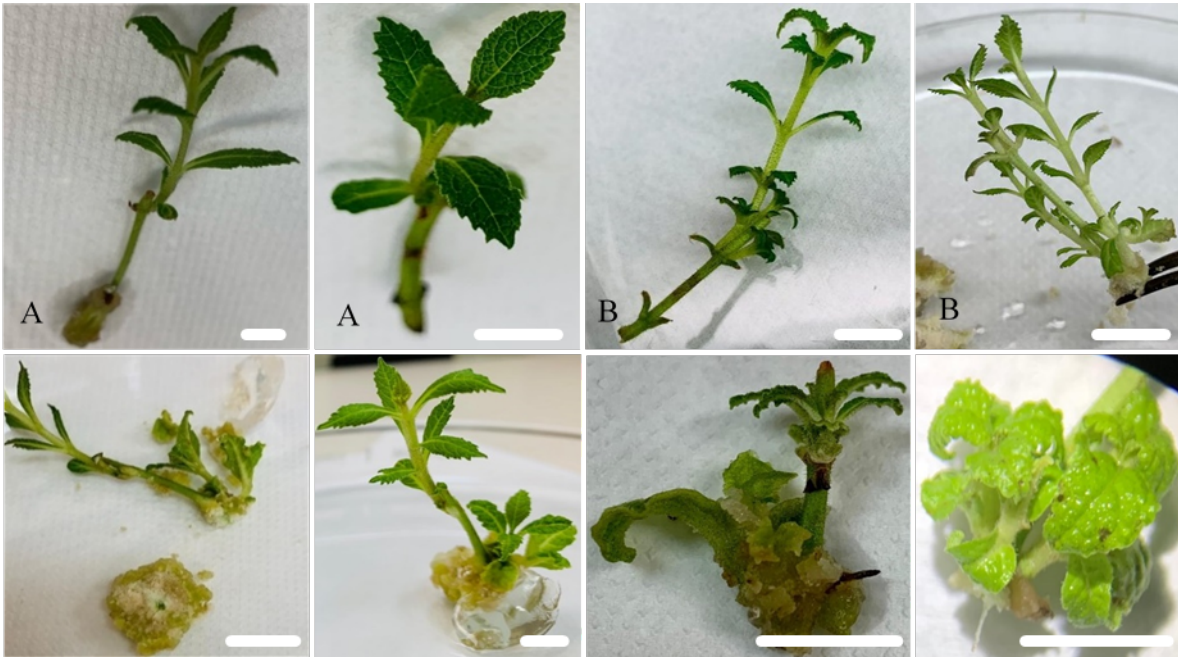
Las plantas producidas en los Sistemas de Inmersión Temporal crecieron entrelazadas manteniendo la polaridad. Como se mencionó anteriormente, el callo encontrado en estas plantas tenía poco volumen, era suave, con una apariencia esponjosa, y no se limitó únicamente a la base (figura 16).



**Figura 16.** Efecto del sistema BIT sobre el fenotipo algunas de las plantas de *T. grandis*, del genotipo 618, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A: Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante y buen vigor. B: Plantas con algún grado de hiperhidricidad y calogénesis, su vigor y color depende del grado de hiperhidricidad. C y D: Plantas con hiperhidricidad y generación de calogénesis, lo que compromete su color y su vigor. Barra de escala: 1cm.

Por otro lado, las plantas cultivadas en medio semisólido, también tuvieron un crecimiento con polaridad definida, pero el callo se formó en el sitio de corte en la base del explante en contacto con el medio de cultivo. Este callo era muy duro y de forma esférica (figura 17).

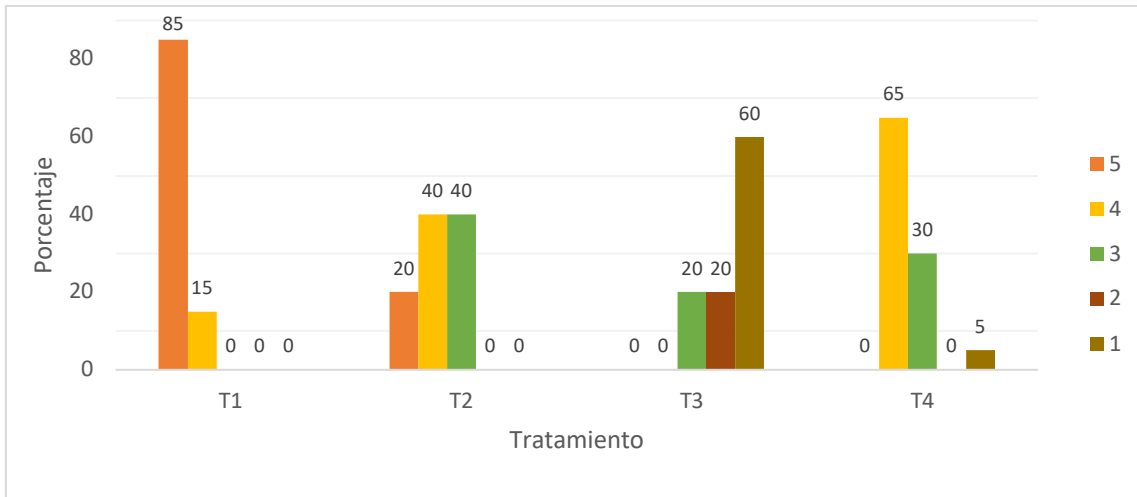




**Figura 17.** Efecto del sistema MSS sobre el fenotipo de algunas plantas de *T. grandis* del genotipo 618, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A: Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante y buen vigor. B: Plantas con nula hiperhidricidad y algún grado de calogénesis en su base, hojas color verde brillante y buen vigor. C: Plantas con generación de callo en su base, presencia de algún grado de hiperhidricidad. D: Plantas con hiperhidricidad y generación de calogénesis, lo que compromete su color y su vigor y por lo tanto su calidad. Barra de escala: 1cm.

#### 4.6. Evaluación de la calidad de los explantes del genotipo 618.

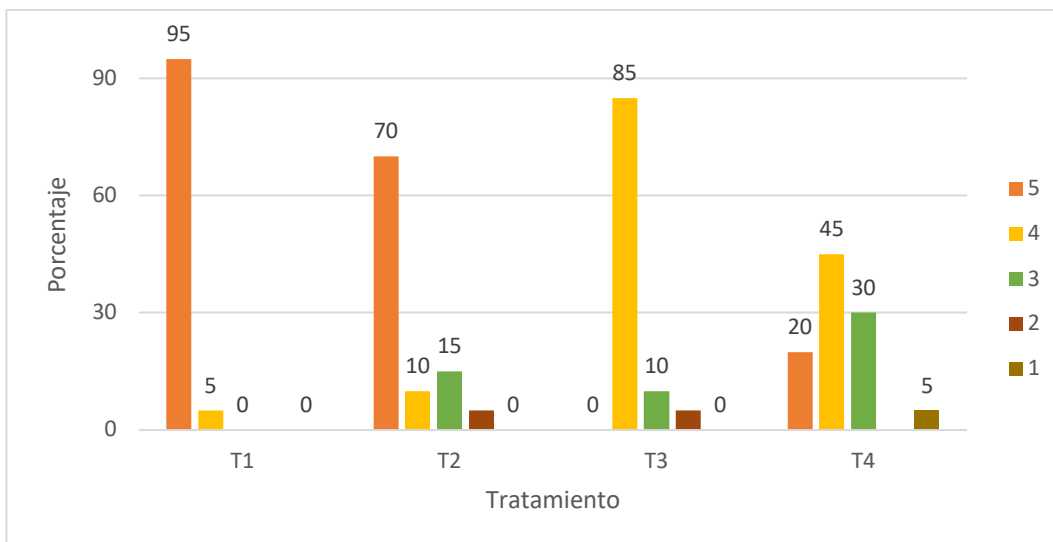
Al aplicar la escala de calidad elaborada para cuantificar la calidad de las plantas cultivadas en sistemas de inmersión temporal, y expuestas a diferentes concentraciones de BAP se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 18.



**Figura 18.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de *T. grandis*, genotipo 618, cultivadas en sistemas de inmersión temporal. La escala de calidad muestra el estado de las plantas obtenidas, en donde 1 es la menor calidad y 5 es la mejor calidad.

El análisis de calidad de las plantas cultivadas en BIT, evidencia que, en el tratamiento control, las plantas fueron clasificadas en calidad 5 mayoritariamente. Las plantas cultivadas con 0,5mg/L de BAP presentaron calidades en el rango de 3 a 5, mientras que para el tratamiento T3, el 60% de las plantas presentaron calidad deficiente, es decir, con categoría 1. Finalmente, las plantas procedentes del tratamiento T4, presentaron en su mayoría calidad 4.

Al analizar la calidad de las plantas cultivadas en medio semisólido con diferentes concentraciones de BAP, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 19.



**Figura 19.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de *T. grandis*, genotipo 618 cultivadas en medio semisólido. La escala de calidad muestra el estado de las plantas obtenidas, en donde 1 es la menor calidad y 5 es la mejor calidad.

En medio semisólido, el tratamiento control y el suplementado con 0,5mg/L de BAP, presentaron en su mayoría plantas de calidad 5, mientras que las plantas cultivadas en medio suplementado con 1,0 mg/L y 1,5mg/L fueron de calidad 4 mayoritariamente. Además, las plantas con la concentración más alta de citoquinina mostraron mayor variedad en la calidad (figura 19).

#### 4.7. Análisis de las variables cuantitativas genotipo 117.

Al igual que para el análisis de resultados del genotipo anterior, se utilizó para el genotipo 117 el Modelo Lineal General, para el análisis de las variables cuantitativas, por la flexibilidad de este modelo en el cumplimiento de supuestos estadísticos de normalidad y homocedasticidad.

A partir del análisis de los datos correspondientes a variables cuantitativas del cultivo de *T. grandis* el material seleccionado 117, se evidenció que el medio de cultivo y el sistema tienen un efecto significativo sobre todas las variables analizadas (brotación, rebrotación, brotes totales (brotes más rebrotes), mayor longitud del brote, número de hojas y peso seco).

Por otra parte, la interacción de los factores medio de cultivo y sistema ejercieron un efecto significativo para las variables de rebrotación y mayor longitud del brote (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de los factores y su interacción sobre las variables cuantitativas de *Tectona grandis* perteneciente genotipo seleccionado 117, mediante Modelo Linear General.

Factores	Variables					
	Brotos	Rebrotos	Brotos totales	Mayor longitud del brote	Hojas	Peso seco
Medio de cultivo	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,000
Sistema	p=0,007	p=0,000	p=0,005	p=0,000	p=0,000	p=0,003
Medio de cultivo*Sistema	p=0,250	p=0,050	p=0,128	p=0,000	p=0,110	p=0,493

Prueba estadística con valor de  $\alpha=0,05$ .

Los análisis estadísticos del comportamiento del material seleccionado 117, expuesto a diferentes concentraciones de BAP, evidenciaron que, para las variables brotación, rebrotos, brotes totales, número de hojas y peso seco no presentaron diferencias estadísticas significativas (cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la concentración de BAP y sistema de cultivo en el desarrollo de explantes de *T. grandis* del genotipo 117.

Tratamiento			Variables					
Sistema	Id	Concentración de BAP (mg/L)	Número de brotes (v.e p=0,050)	Número de rebrotes (v.e p=0,128)	Número de brotes totales (v.e p=0,003)	Mayor longitud del brote (v.e p=0,000)	Número de hojas (v.e p=0,110)	Peso seco (mg) (v.e p=0,493)
BIT	T1	0,0	2,55 ± 0,89 <sup>bc</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>d</sup>	2,55 ± 0,89 <sup>de</sup>	1,76 ± 0,91 <sup>d</sup>	10,65 ± 4,4 <sup>d</sup>	13,38 ± 4,68 <sup>c</sup>
	T2	0,5	4,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,80 ± 2,12 <sup>cd</sup>	5,80 ± 2,12 <sup>cd</sup>	4,10 ± 0,71 <sup>a</sup>	30,65 ± 12,14 <sup>bc</sup>	44,64 ± 44,29 <sup>ab</sup>
	T3	1,0	3,70 ± 0,73 <sup>a</sup>	3,70 ± 5,05 <sup>bc</sup>	7,40 ± 5,11 <sup>bc</sup>	2,57 ± 1,18 <sup>bc</sup>	24,40 ± 18,51 <sup>c</sup>	33,11 ± 22,61 <sup>abc</sup>
	T4	1,5	3,75 ± 0,64 <sup>a</sup>	5,60 ± 2,21 <sup>ab</sup>	9,35 ± 2,21 <sup>ab</sup>	2,68 ± 0,53 <sup>b</sup>	35,25 ± 8,67 <sup>abc</sup>	51,98 ± 20,00 <sup>a</sup>
MSS	T1	0,0	2,20 ± 0,76 <sup>c</sup>	0,05 ± 0,22 <sup>d</sup>	2,25 ± 0,79 <sup>c</sup>	1,92 ± 0,58 <sup>cd</sup>	11,90 ± 2,63 <sup>d</sup>	10,46 ± 2,93 <sup>c</sup>
	T2	0,5	3,20 ± 0,95 <sup>ab</sup>	5,25 ± 2,77 <sup>b</sup>	8,45 ± 3,24 <sup>bc</sup>	1,96 ± 0,5 <sup>cd</sup>	35,20 ± 10,84 <sup>abc</sup>	31,01 ± 26,7 <sup>abc</sup>
	T3	1,0	3,60 ± 1,27 <sup>a</sup>	4,75 ± 2,27 <sup>bc</sup>	8,35 ± 2,89 <sup>bc</sup>	1,39 ± 0,37 <sup>d</sup>	37,40 ± 12,58 <sup>ab</sup>	21,78 ± 12,53 <sup>bc</sup>
	T4	1,5	3,55 ± 0,83 <sup>a</sup>	8,65 ± 5,58 <sup>a</sup>	12,20 ± 6,07 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,53 <sup>d</sup>	47,45 ± 20,82 <sup>a</sup>	32,07 ± 33,70 <sup>abc</sup>

v.e: Valor del estadístico.

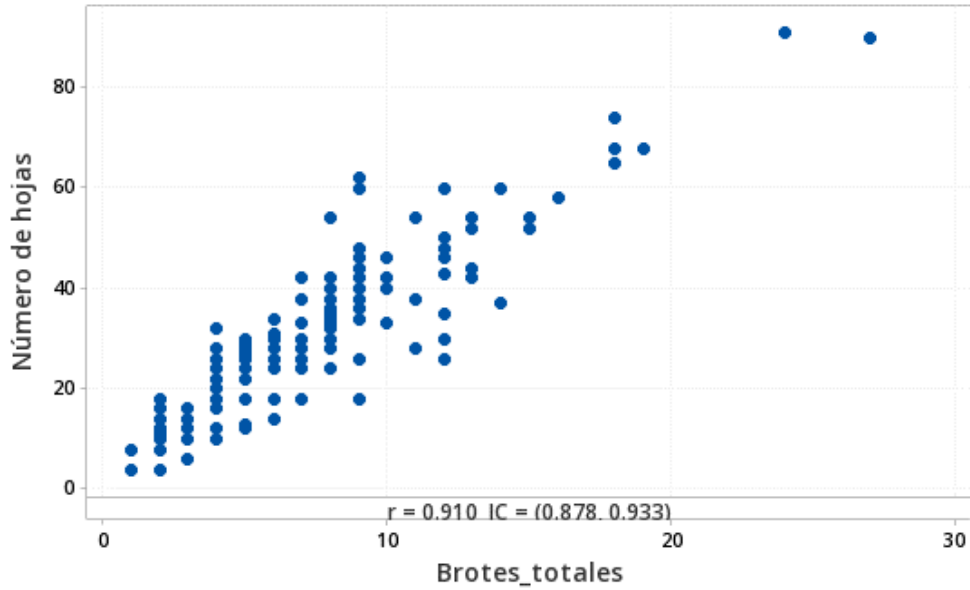
Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

Los análisis estadísticos del comportamiento del material seleccionado 117 expuesto a diferentes concentraciones de BAP, presentados en el cuadro 6, evidenciaron que existen diferencias significativas para el número de brotes, en el sistema BIT fue significativamente mayor en todos los tratamientos suplementados con BAP. Para el medio semisólido, se observa la misma tendencia, difieren los tratamientos suplementados con BAP.

Para la variable número de rebrotes, en el sistema BIT, las dos concentraciones más altas promueven una rebrotación significativamente mayor con respecto al tratamiento control. En el medio semisólido, el tratamiento T4 muestra el mayor valor obtenido en esta investigación para la generación de rebrotes. Por su parte, la variable brotes totales, que contempló la sumatoria de brotes y rebrotes, muestra que las dos concentraciones más altas en sistema BIT induce una brotación significativamente mayor con respecto al tratamiento control. En el medio semisólido, nuevamente la concentración de 1,5 mg/L de BAP generó la mayor cantidad de brotes totales, los tratamientos T2 y T3 también fueron diferentes estadísticamente al tratamiento control.

A su vez, el crecimiento del brote de mayor longitud fue significativamente superior en el BIT con la concentración de 0,5 mg/L de BAP, para el medio semisólido, no hay diferencias entre los tratamientos. Para la variable número de hojas, los tratamientos con adición de BAP difieren del tratamiento control pero no entre sí en el sistema BIT, para el medio semisólido, los tres tratamientos con la adición de citoquina muestran diferencias respecto a su control. Respecto al peso seco, no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en ambos sistemas de cultivo.

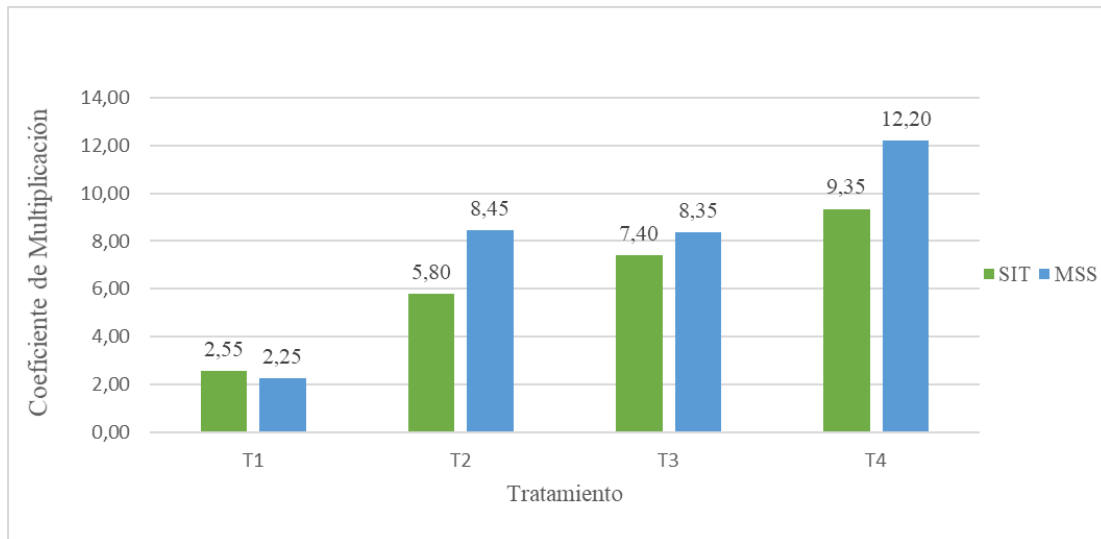
Al correlacionar las variables número de hojas con número de brotes, se obtuvo un valor de  $p$  de 0,000 y un coeficiente de Pearson de 0,910, lo cual sugiere la existencia de correlación lineal positiva de 91% entre las variables mencionadas (figura 15).



**Figura 20.** Correlación lineal de Pearson entre número de hojas y brotes totales de *T. grandis* genotipo 117.

#### 4.8. Coeficiente de multiplicación para el genotipo 117.

Al calcular el coeficiente de multiplicación de los diferentes sistemas y medios de cultivo empleados, se obtuvieron los valores que se muestran en la figura 16.

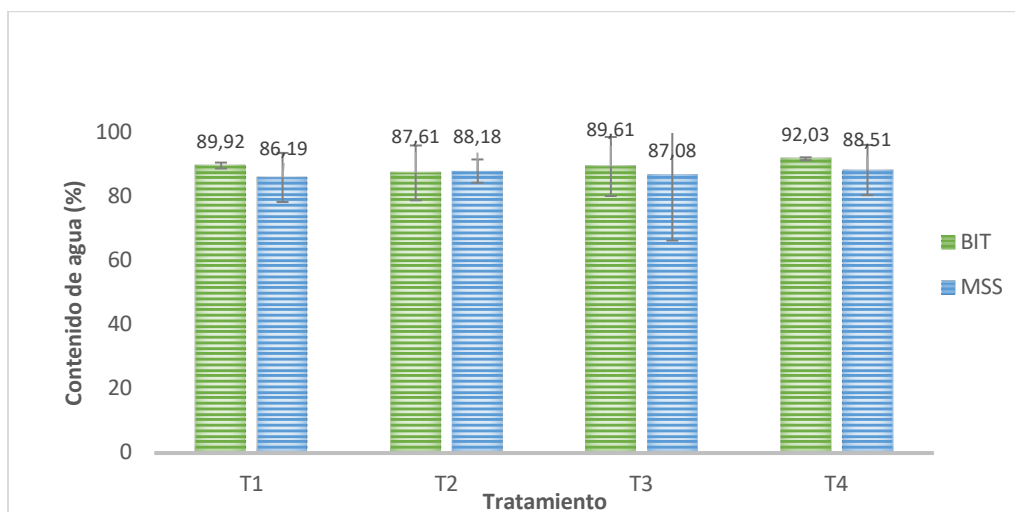


**Figura 21.** Efecto de la concentración de BAP sobre el coeficiente de multiplicación en explantes de *T. grandis* cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1: 0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

El coeficiente de multiplicación para el genotipo 117 fue menor para los dos tratamientos T1 y la proliferación de brotes aumentó conforme se incrementó la concentración de la citoquinina, tanto para el MSS como para el SIT. El medio semisólido generó más brotes en todos los tratamientos respecto al SIT.

#### 4.9. Contenido de agua del genotipo 117

Al comparar el contenido de agua de las plantas mediante un modelo lineal general, se evidenció que no existen diferencias significativas, entre los tratamientos evaluados (valor de  $p=0,717$ ) (figura 17).



**Figura 22.** Efecto del sistema de cultivo en contenido de agua en plantas de *T. grandis*, del genotipo 117, cultivadas a diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

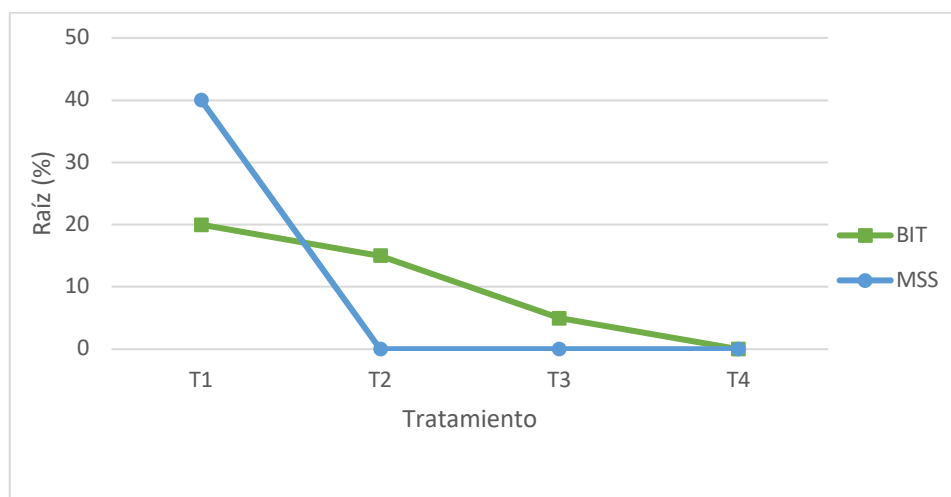
No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

En los SIT, el mayor contenido de humedad se localizó en el tratamiento T4, y el más bajo en el T2, mientras que en MSS el contenido más alto de humedad se obtuvo en el T4 y el más bajo en el control.



#### 4.10. Análisis de las variables cualitativas genotipo 117.

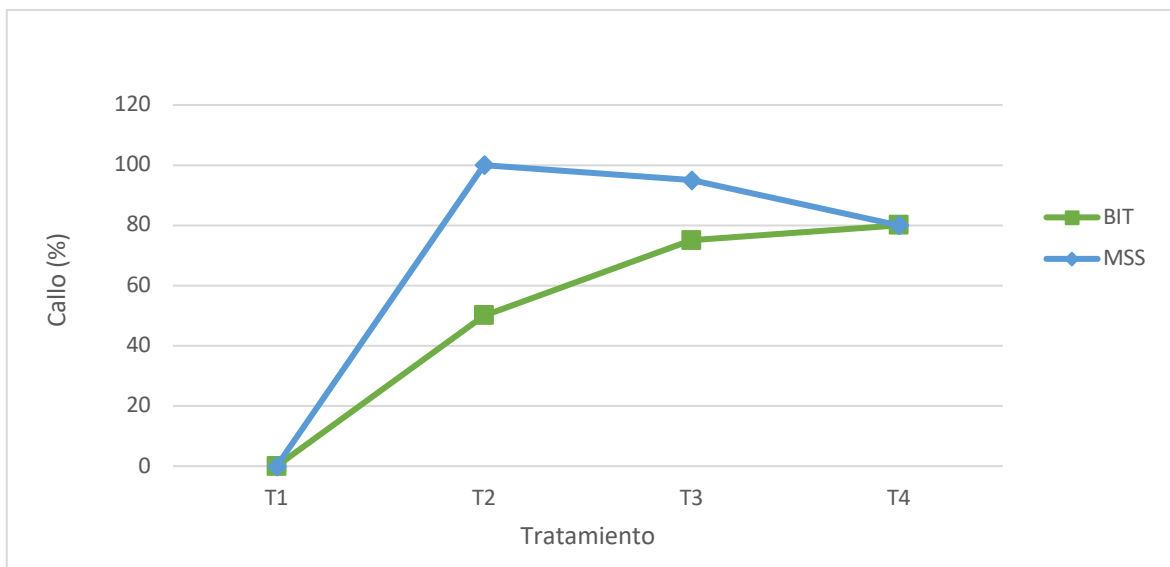
La generación de raíz para el medio semisólido, se evidenció únicamente en el tratamiento T1, mientras que en el sistema BIT, hubo formación de raíz en los tratamientos T1, T2 y T3. El tratamiento con más citoquinina de ambos sistemas no generó raíces (figura 18).



**Figura 23.** Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de raíz en explantes de *T. grandis* cultivados en Biorreactores de Inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

Con respecto a la presencia de callo, se observó un mayor porcentaje en los medios semisólidos. Los tratamientos T2 y T3 en MSS presentaron 50 y 20 por ciento más de calogénesis en comparación con los tratamientos respectivos en BIT.

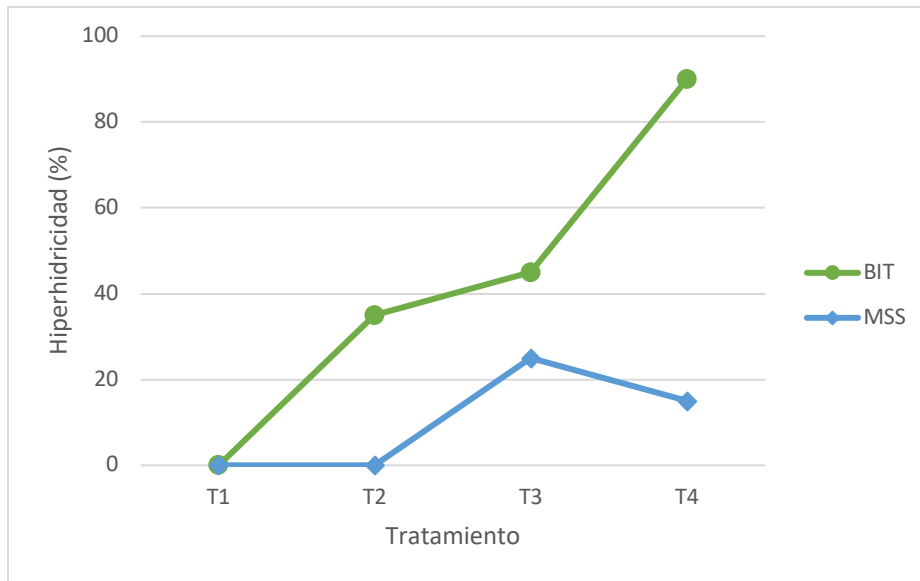
Para el medio semisólido, la mayor generación de callo sucedió en el tratamiento suplementado con 0,5 mg/L de BAP, seguido del tratamiento con 1,0mg/L de dicho compuesto. Para ambos sistemas, el control no evidenció presencia de callo, y para los sistemas de inmersión temporal, la cantidad de callo aumentó conforme se aumentaba la concentración de BAP, produciendo mayor formación de callo en el tratamiento T4.



**Figura 24.** Efecto de la concentración de BAP sobre la generación de callo en explantes de *T. grandis* cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1:0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

Con respecto a la variable hiperhidricidad, se encontró un porcentaje mayor en los biorreactores de inmersión temporal en comparación con el medio semisólido, en aquellos tratamientos suplementados con citoquinina (figura 20).

Independientemente del sistema de cultivo, las plantas cultivadas en tratamiento control, no presentaron hiperhidricidad. En el sistema BIT, la hiperhidricidad aumentó conforme se incrementó la concentración de BAP, mientras que, en el sistema semisólido, T2 no presentó hiperhidricidad y el tratamiento T3, suplementado con 1,0mg/L de citoquinina, fue el que presentó mayor cantidad de plantas hiperhídricas.

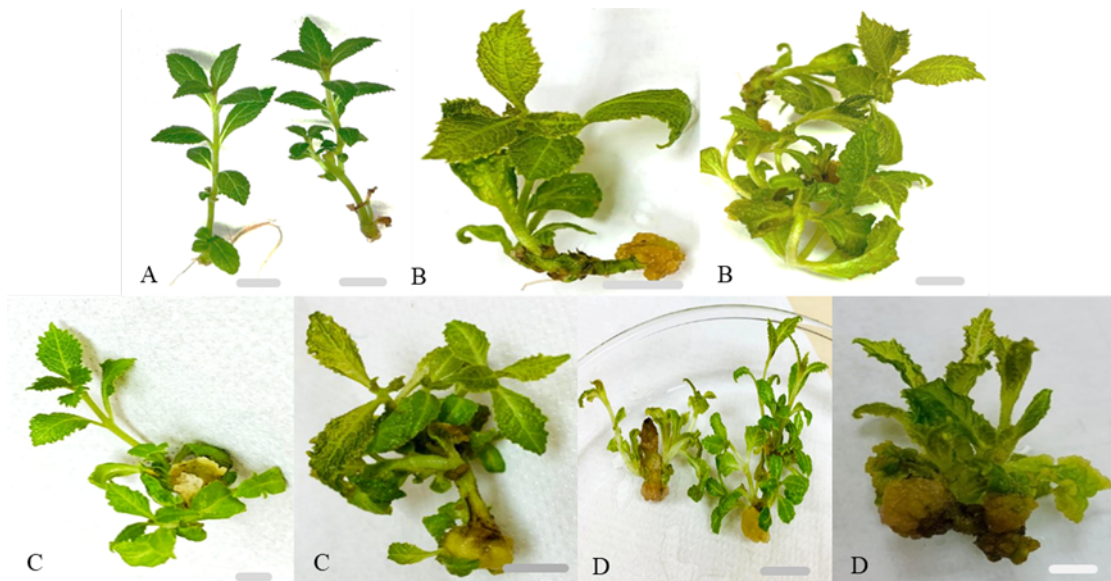


**Figura 25.** Efecto de la concentración de BAP sobre la hiperhidricidad en explantes de *T. grandis* cultivados en biorreactores de inmersión temporal y medio semisólido. (T1: 0,0mg/l; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L).

Sin diferenciar entre sistemas de cultivo, las plantas cultivadas en tratamiento control, no presentaron hiperhidricidad. En el sistema BIT, la hiperhidricidad aumentó conforme se incrementó la concentración de BAP, obteniendo un 90% de hiperhidricidad en el tratamiento T4, mientras que en el sistema semisólido el tratamiento T2 tampoco presentó hiperhidricidad y el tratamiento T3, suplementado con 1,0mg/L de citoquinina, fue el que presentó mayor cantidad de plantas hiperhídricas con un 25%.

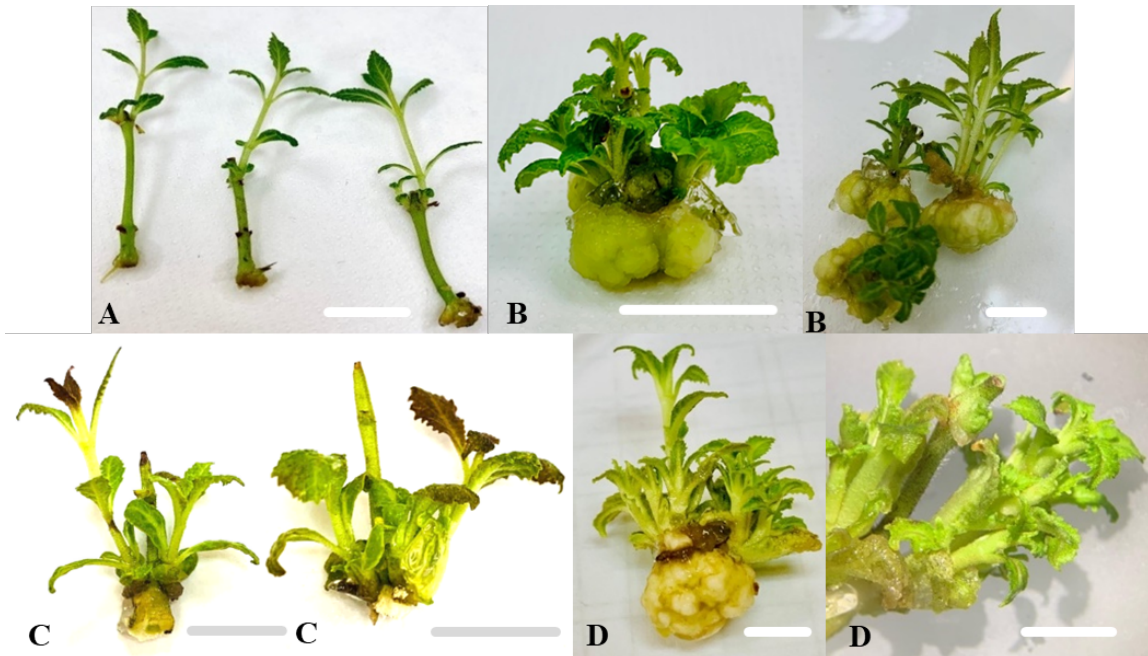
#### **4.11. Apreciación fenotípica de los explantes por tratamiento y sistema.**

Las plantas producidas en los sistemas BIT mantuvieron una tendencia fenotípica similar a las descritas para el genotipo 618, los brotes crecieron entrelazados manteniendo la polaridad. El callo igualmente presentó poco volumen, era suave, con una apariencia esponjosa, y no se limitó únicamente a la base (figura 21).



**Figura 26.** Efecto del sistema BIT sobre el fenotipo de las plantas de *T. grandis* cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A: Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante y buen vigor. B: Plantas con algún grado de hiperhidricidad y calogénesis, su vigor y color depende del grado de hiperhidricidad. C y D: Plantas con diferentes grados de hiperhidricidad y generación de calogénesis, lo que compromete su color, su vigor y su calidad. Barra de escala: 1cm.

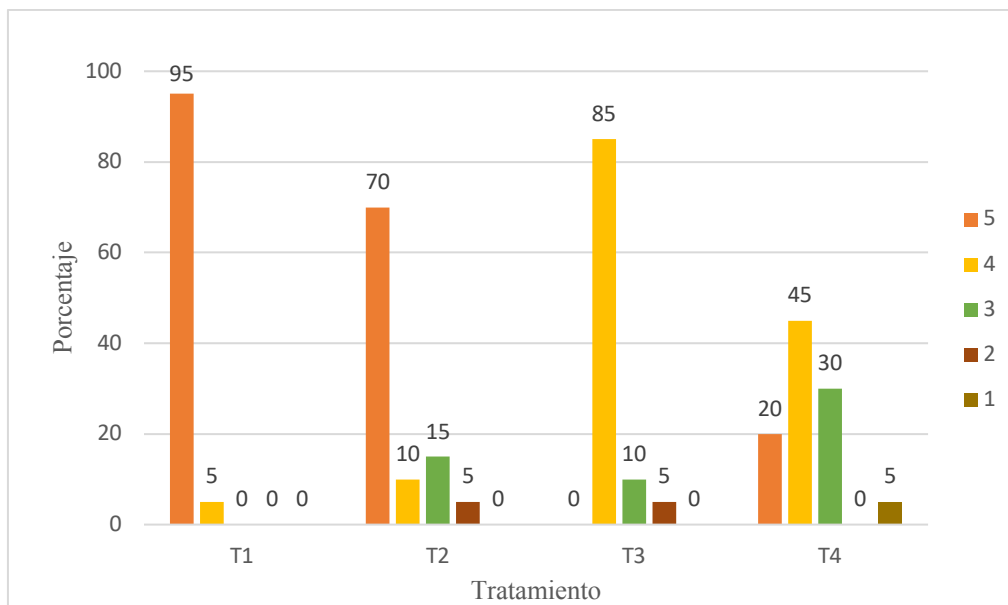
Asimismo, las plantas crecidas en medio semisólido, tuvieron un crecimiento con polaridad definida, y de haber generado callo, este se encontró en la base del explante donde se encontraba en contacto con el medio de cultivo. Este callo era muy duro y de forma esférica (figura 22).



**Figura 27.** Efecto del sistema MSS sobre el fenotipo de las plantas de *T. grandis* cultivadas a diferentes concentraciones de BAP. A: 0,0mg/L; B: 0,5mg/L; C: 1,0mg/L; D: 1,5mg/L). A: Plantas con nula hiperhidricidad y callo, hojas de un verde brillante. B: Plantas con nula hiperhidricidad y algún grado de calogénesis en su base, hojas color verde brillante. C: Plantas con generación de callo en su base, presencia de algún grado de hiperhidricidad. D: Plantas con hiperhidricidad y generación de calogénesis, lo que compromete su color y su vigor y por lo tanto su calidad. Barra de escala: 1cm.

#### 4.12. Evaluación de la calidad de los explantes del genotipo 117.

Al evaluar cualitativamente la calidad de las plantas cultivadas en sistemas de inmersión temporal, y expuestas a diferentes concentraciones de BAP se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 23.

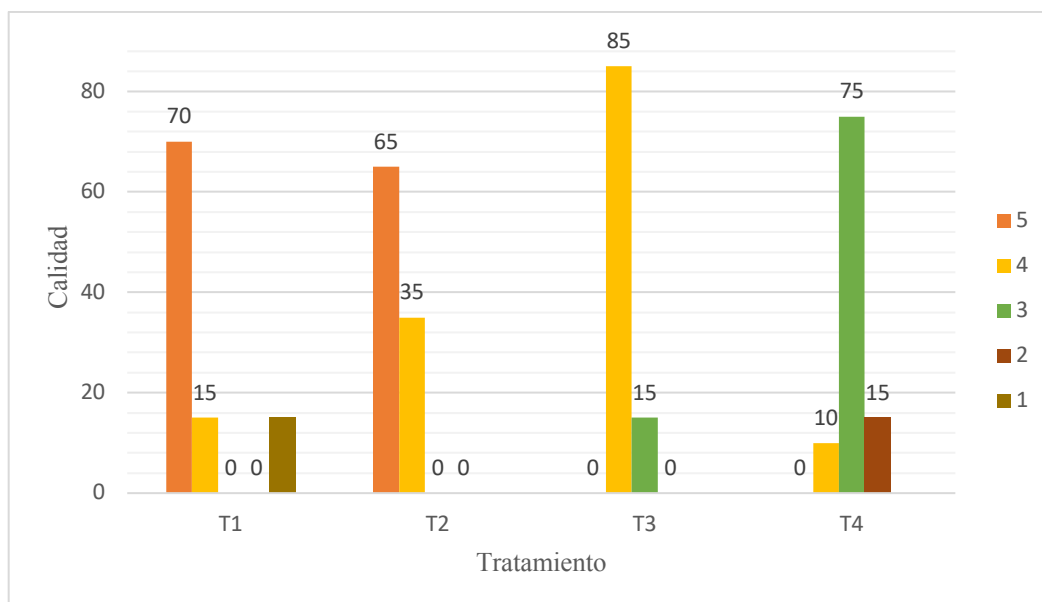


**Figura 28.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de *T. grandis*, genotipo 117 cultivadas en sistemas de inmersión temporal.

El análisis para los sistemas BIT, evidencia que, en el tratamiento control y el tratamiento T2, las plantas presentaron los valores más altos de calidad 5 mayoritariamente. Por su parte, T3 obtuvo el valor más alto de calidad 4 seguido por T4 (figura 23).

Al evaluar cualitativamente la calidad de las plantas procedentes del medio semisólido cultivadas con diferentes concentraciones de BAP, se obtienen los resultados mostrados la figura 24.

En medio semisólido, el tratamiento control y el suplementado con 0,5mg/L de BAP, presentaron en su mayoría plantas de calidad 5, mientras que las plantas cultivadas en medio suplementado con 1,0 mg/L presentaron mayoritariamente calidad 4. Por su parte, el medio enriquecido con 1,5mg/L obtuvo calidad 3 en su mayoría (figura 24).



**Figura 29.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP (T1:0,0mg/L; T2: 0,5mg/L; T3: 1,0mg/L; T4: 1,5mg/L) en la calidad de las plantas de *T. grandis*, genotipo 117 cultivadas en medio semisólido.

## 5. Discusión

### 5.1. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la brotación de explantes de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.

Para ambos genotipos, el BAP es determinante para la brotación, lo cual concuerda con diversos autores, entre ellos Quiala *et al.* (2012), Gupta, Nadgir, Mascarenhas, y Jagannathan (1980), Tiwari, Tiwari, y Siril (2002) y Mendoza de Gyves, Royani, y Rugini (2007), quienes mencionan que el BAP es la citoquinina más utilizada para la micropropagación teca, sola o en combinación con kinetina u otros reguladores para obtener resultados diferentes. Se ha utilizado también el BAP para evaluar la brotación de especies forestales maderables en peligro de extinción (Indacochea *et al.*, 2018).

Específicamente para el genotipo 117, en ambos sistemas, los tratamientos a los cuales se les adicionó BAP, mostraron una mayor brotación y una mayor brotación total (brotes más rebrotes) que los respectivos tratamientos control. Esto concuerda con Daquinta *et al.* (2000),

en cuya investigación, a partir de ápices de teca, se obtuvo la mayor brotación al cultivarlos en medio semisólido M&S suplementado con 1,5 mg/L de BAP (T4 de la presente investigación), y partiendo de segmentos nodales de teca, la mayor brotación la obtuvo cuando agregó 2,0 mg/L de BAP, esta respuesta fue superior a medios suplementados con BAP y GA<sub>3</sub>.

En una investigación similar del mismo autor (Daquinta *et al.*, 2003), se alcanzó mayor producción de brotes cuando además del BAP se agregó Kinetina a los medios de cultivo. Hubo un resultado similar en la investigación de Ramírez Aguilar *et al.* (2003), en donde la mejor brotación de ápices teca se obtuvo en medio M&S con concentración de sales al 100% y con suplemento de BAP al 1,0mg/L y kinetina al 0,5mg/L. En otro estudio, se generó una mayor brotación de ápices de teca en medio semisólido (promedio de brotes totales 2,5-2,7) cuando igualmente, se suplementó el medio con 1,0mg/L de BAP, que concuerda con el resultado obtenido para el tratamiento T3 de la presente investigación para el genotipo 618 (promedio de brotes totales: genotipo 618: 6,55; genotipo 117: 8,35) (Castro R *et al.*, 2002).

Quiala-Mendoza, (2012), establece con la utilización de BIT, el tratamiento control de su estudio, presentó la menor brotación de ápices, lo cual coincide con los resultados obtenidos aquí. Con ese estudio también se coincide con el tratamiento T4 de la presente investigación para ambos genotipos (promedio de brotes totales: genotipo 618: 5,35 ; genotipo 117: 9,35), en que la mayor cantidad de brotes se produjo con una concentración de 1,5 mg/L de BAP (10,30 media de brotes obtenidos) cuando se utilizó SIT.

En otra investigación, del equipo de Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012), con la utilización de los sistemas de inmersión temporal y del medio semisólido, y evaluando concentraciones de BAP para teca, obtuvieron que la mayor producción de brotes se obtuvo a 6,66  $\mu$ M (1,5mg/L), lo cual, como se menciona en el párrafo anterior, concuerda con lo obtenido para los tratamientos T4 de ambos genotipos evaluados en este estudio para el sistema BIT. Esto confirma, que, para teca, el BAP induce la proliferación de brotes. El sistema que más favoreció la multiplicación de teca en dicha investigación fue el de



inmersión temporal, lo cual difiere de los datos obtenidos para el genotipo 117, y para el tratamiento T3 del genotipo 618.

Según lo analizado, tanto el MSS como el BIT, permiten la brotación de teca eficientemente sin diferencias significativas, lo cual contrasta con la literatura reportada para teca, en la cual usualmente los SIT producen mayor brotación. La especie *Juglans neotrópica*, se comportó de manera similar al genotipo 618, pues no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas de inmersión temporal y los medios semisólidos (Rocano Curillo, 2017).

## **5.2. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la elongación de brotes de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

Para el genotipo 117, en concentraciones bajas de citoquina como las utilizadas en T1 y T2, los BIT favorecieron la elongación, para el genotipo 618, se encontró diferencias significativas en el tratamiento T2 de los BIT. Esto coincide con el objetivo mismo de los SIT, al haber un mayor contacto del medio con las plántulas, un intercambio gaseoso sin restricción y la disposición para controlar la atmósfera gaseosa, se fomenta un incremento en la elongación de los brotes y en la calidad y desarrollo de las plantas (Cruzat, 2009). Adicionalmente, se ha documentado, que a mayor concentración de citoquinina se da una disminución en la elongación (Bermúdez-Caraballosa, Rodríguez Urquiza, Reyes Vega, y Jiménez Padrón, 2019), los resultados de la presente investigación evidencian esa tendencia.

Investigaciones de Arista, Leiva, Guerrero, y Collazos (2019), reportan mayor elongación y calidad en la reproducción de arándanos en SIT y concuerdan con otro estudio donde también se utilizaron sistemas de inmersión temporal para la reproducción de clavel, demostrando su eficiencia para la elongación de las plantas, siempre que la concentración de BAP no sea superior a 1,0mg/L (Ahmadian, Babaei, Shokri, y Hessami, 2017).

### **5.3. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la producción de hojas de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

Para los dos genotipos, hubo un aumento en el número de hojas totales para los medios suplementados con citoquina, siendo mayor el conteo en el tratamiento con más concentración de la hormona, con excepción del tratamiento de T3 del genotipo 618, lo cual puede explicarse al obtener una mayor cantidad de brotes en T3 que en T4, por lo tanto, se espera una mayor generación de hojas a mayor brotación. Lo anterior puede deberse a que, como se ha mencionado a lo largo del documento, el BAP induce la producción de brotes, y cada brote conforme se va desarrollando va produciendo hojas, por lo cual dichas variables se relacionan. El análisis de correlación lineal, evidenció que aumento de una variable conforme se incrementa la otra. Para el genotipo 618 el coeficiente de correlación lineal de Pearson mostró una relación de 76% entre las variables mencionadas, mientras que para el genotipo 117 dicho coeficiente fue de 91%.

Cabe destacar, que altas concentraciones de BAP pueden alterar la formación y desarrollo de los brotes, por trastornos como la hiperhidricidad lo cual podría afectar la calidad y cantidad de las hojas (Polo Santos, Suarez Padrón, y Gatti, 2013).

Se ha documentado que los SIT contribuyen con el desarrollo y crecimiento de las plantas, por la renovación de la atmósfera gaseosa, esto conlleva a que se estimulen las estructuras autotróficas, disminuyéndose la dependencia por el medio de cultivo (Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez, 2012). Para el genotipo 618, no hubo diferencias entre los sistemas, esto podría deberse, a que el tamaño de la botella era amplio, por lo que, a pesar de ser un frasco cerrado sin recambio de la atmósfera gaseosa, el espacio aéreo pudo ser suficiente para que las plantas no presentaran un estrés significativo. Los resultados obtenidos para ambos genotipos no demuestran la misma tendencia, sin embargo, son genéticas diferentes, por lo que no se espera que reaccionen de forma idéntica a mismas condiciones de cultivo, de ahí la importancia de la evaluación de genotipos y la selección de los mismos.

#### **5.4. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la rizogénesis de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

Los datos correspondientes a la variable raíz, se anotaron con el fin de evidenciar la presencia ausencia de las mismas en los genotipos, aunque no se añadieron reguladores para la inducción de la rizogénesis. Dependiendo de la cantidad y morfología del callo, no se puede determinar si existió o no raíz en donde se formaron las masas callosas. Se ha reportado que la formación de callo a concentraciones mayores de BAP, puede comprometer irreversiblemente la estructura caulinar de los brotes, interrumpiéndoles el crecimiento de los mismos (Álvarez, M *et al.*, 2011), para el genotipo 618, esto no correspondió, en el tratamiento T4 de ambos sistemas se encontró desarrollo de rizogénesis.

En el genotipo 117, con el sistema semisólido, solo se evidenció generación de raíz en el tratamiento control, y para el BIT, conforme se aumentó la citoquina se redujo la presencia de raíz, esto concuerda con lo reportado en la literatura, a concentraciones más elevadas de citoquininas hay una inhibición de la rizogénesis (Sharry *et al.*, 2015).

Resultados similares se encontraron en los estudios de Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012); Quiala, Cañal, Meijón, *et al.* (2012), donde la producción de raíz se afectó a concentraciones de 1,5mg/L de BAP (tratamiento T4), esto podría deberse a lo mencionado respecto a la relación entre auxinas y citoquininas para la producción de callo, lo cual no concuerda para los datos reportados en el genotipo 618.

Para Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012), la mayor producción de raíces se obtuvo en el tratamiento sin BAP, lo cual tiene concordancia con este estudio respecto al genotipo 117. La ausencia de citoquinina añadida pudo haber favorecido a las auxinas en el balance endógeno auxina/citoquinina, lo que llevó a la producción de raíces.

Según Ramírez-Mosqueda y Iglesias-Andreu (2016), en su estudio en el cual se compararon diferentes sistemas de inmersión para el cultivo de *Vanilla planifolia*, obtuvieron que el mayor porcentaje de raíces se presentó en frascos gemelos (BIT) y también se obtuvo

la mayor elongación de los brotes en este sistema. Por su parte Martre, Lacan, Just, y Teisson (2001) mencionan que la inmersión temporal produce el estímulo adecuado para la producción de raíces en *Hevea brasiliensis*, mas sin embargo, si lo que se requiere es el enraizamiento, es importante regular la cantidad de citoquina añadida.

### **5.5. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la generación de callo en *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

El crecimiento de callo observado, fue mayor en los medios suplementados con BAP respecto al control. Como se mencionó, la morfología, ubicación y textura de los callos fue diferente en entre el sistema semisólido y el de inmersión temporal. La morfología de los callos descrita por Álvarez M. *et al.* (2011), coincide con la descripción de las masas callosas obtenidos en esta investigación en MSS, las cuales eran compactas y duras, mientras que los callos formados en Sistemas de Inmersión Temporal eran friables.

Las citoquininas endógenas se encuentran en el xilema de las plantas y se transportan en los mecanismos de transpiración, las citoquininas añadidas al medio, se almacenan en una concentración mayor en los sitios de corte e ingresan a las corrientes xilemáticas (Nordström & Eliasson, 1986). De acuerdo con Sánchez y Alvarenga (2015), las auxinas y citoquininas del medio de cultivo estimulan una división celular acelerada en los sitios de corte del explante, en donde posteriormente se forman las masas callosas. Dichas masas son crecimientos celulares desorganizados, con proliferación continua y crecimiento amorfo. Además, según investigación de Laiton Alfonso (2021), las citoquinas suministradas en heridas basales potencializan a las fitohormonas. Por lo que esto podría explicar el aumento de la presencia de callo en los tratamientos con BAP respecto del control.

De acuerdo con Álvarez M. *et al.* (2011), al aumentar la dosis de BAP a 1,0mg/L se presenta mayor callogénesis, mayor hiperhidricidad, y disminución en la elongación y la calidad de los explantes, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación. Los callos pueden alterar la correcta absorción de los nutrientes del medio, lo que podría evidenciarse como el detrimento en la salud y apariencia de las plantas (Sánchez,

2017). Estudios realizados por Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012) en la propagación de teca a diferentes concentraciones de BAP mostraron resultados similares.

#### **5.6. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la hiperhidricidad de explantes de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

Las citoquininas son primordiales en los procesos de morfogénesis por la vía de la organogénesis y se encuentran asociadas al aparato fotosintético (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, y Mroginski, 2011). El sistema vascular de las plantas puede ser estimulado por las citoquininas y son contribuyentes del transporte de nutrientes, en dependencia del tipo de citoquinina y del tejido (Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez, 2012).

El BAP es la citoquinina más frecuentemente requerida en la propagación de especies leñosas y como ya se mencionó, es de las principales en la multiplicación *in vitro* de teca por su eficiencia en la brotación, no obstante, es un inductor de procesos hiperhídricos (Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez, 2012).

La hiperhidricidad es una alteración en la morfología, anatomía y fisiología producida por una alteración en la morfogénesis del tejido (Levitus *et al.*, 2011). Fenotípicamente, tallos y hojas adquieren apariencias engrosadas y vidriosas, con cierta rigidez que las hace susceptibles a romperse con extrema facilidad (Tovar Mendoza, 2016).

Fisiológicamente, se produce una disminución en proteínas, compuestos fenólicos y clorofila, a menudo, las hojas con hiperhidricidad pierden sus células de empalizada y mantienen únicamente un esponjoso mesófilo vacuolado con espacios intercelulares agrandados (Quiala *et al.*, 2012; Tovar Mendoza, 2016). Los reguladores de esta condición son la humedad relativa, el potencial hídrico, la proporción de nutrientes, el entorno hormonal, por lo tanto los reguladores de crecimiento, luz y temperatura (Levitus *et al.*, 2011; Tovar Mendoza, 2016). Se distorsionan los procesos de fotosíntesis y transpiración, por lo

que las plantas debido a la afectación estomática y las paredes celulares, se transforman al heterotrofismo y transpiran desmedidamente (Levitus *et al.*, 2011).

Algunos autores sugieren que el BAP también afecta a los fenoles y su metabolismo, alterando los precursores de las ligninas o a éstas propiamente, por lo que la carencia de estas estructuras debilita la pared celular vascular, alterando su permeabilidad e hidrofobicidad, siendo esta otra causa de la hiperhidricidad (Quiala *et al.*, 2012).

Para ambos genotipos, y sistemas, se evidencia que sin la adición de BAP, no se presenta hiperhidricidad de los brotes, mientras que con la adición del regulador de crecimiento es esperable la aparición de la hiperhidratación de los tejidos. Castro *et al.* (2002), evaluó diferentes concentraciones de BAP para inducir la brotación en medio semisólido complementado con agar como agente gelificante. De las concentraciones evaluadas, solo un 5% de los brotes se hiperhidrató con una concentración de 0,5mg/L de BAP, la más alta que utilizó fue 1,0mg/L de BAP misma que mostró un porcentaje de hiperhidricidad significativamente mayor.

Para el genotipo 618, el tratamiento T4 del BIT, presentó una menor incidencia de hiperhidricidad en comparación con T2 y T3, esto podría deberse a que en este biorreactor, específicamente, se dieran las condiciones para que el tejido vegetal recibiera la aireación adecuada en cada ciclo de inmersión, el recambio de la atmósfera gaseosa y el entorno post inmersión resultara beneficioso para esos explantes (Georgiev *et al.*, 2014).

Para el genotipo 117, con la utilización de los BIT, se evidencia una tendencia al incremento de hiperhidricidad conforme se aumenta en la concentración de BAP. Para el medio semisólido, los tratamientos afectados fueron T3 y T4, con mayor porcentaje T3. Esto concuerda con la investigación de Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012), en donde obtuvo el mismo patrón; la adición del BAP aumentó la brotación pero también incrementó la hiperhidricidad de los brotes.

Tanto en esta investigación como en el reporte de Quijala y colaboradores (2012), las concentraciones superiores al 0,5mg/L de BAP aumentan en cantidades importantes la hiperhidricidad de los brotes, pero a concentraciones iguales a 0,5mg/L de BAP, se puede aprovechar el aumento en la proliferación de los brotes por explante con un porcentaje relativamente bajo de brotes deformados.

La hiperhidratación de los tejidos vegetales en Sistemas de Inmersión Temporal puede deberse a que, después de cada inmersión la película de medio nutritivo que queda sobre el explante, puede aumentar la humedad en el tejido, lo cual hiperhidrata los tejidos y provoca cambios morfológicos de la cutícula alterada y la pared celular debilitada (Moncaleán, Fal, Castañón, Fernández y Rodríguez, 2009).

Quijala, Cañal, Meijón, *et al.* (2012), estudiaron la eficiencia de propagación con diferentes concentraciones de BAP en MSS y BIT. La mayor hiperhidricidad se encontró en el tratamiento con 1,5mg/L de BAP, lo anterior concuerda con la presente investigación, específicamente con el genotipo 117 en BIT y el genotipo 618 en MSS.

### **5.7. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la biomasa de explantes de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

En cuanto a la biomasa producida en ambos genotipos, se obtuvo los mayores valores en el BIT con la mayor concentración de BAP. El incremento en la biomasa en estos tratamientos es una sumatoria de la producción de brotes obtenida, la elongación y la producción de hojas que generan más cantidad de tejido vegetal. Todos los tratamientos suplementados con BAP de ambos genotipos y en ambos sistemas tuvieron valores superiores a los del tratamiento control, lo que indica que el regulador de crecimiento contribuyó a la producción de biomasa.

Para esta variable, se evidenció claramente una de las ventajas de la utilización de los sistemas de inmersión temporal que, en su función de biorreactor, contribuye con la formación de biomasa, para asegurar una producción masiva, la constante división celular, y por lo tanto el rendimiento (Muñiz, 2018).

Los Sistemas de Inmersión Temporal han producido mayor cantidad de biomasa en especies como la piña (Escalona *et al.*, 1999), el clavel (Ahmadian *et al.*, 2017), la gmelina (Álvarez M. *et al.*, 2011; Hernández Aguilar *et al.*, 2013), la teca (Daquinta *et al.*, 2002, 2000; Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez, 2012; Quiala, Cañal, Meijón, *et al.*, 2012; Quiala *et al.*, 2014), entre otros.

#### **5.8. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en el porcentaje de multiplicación de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

Los coeficientes de multiplicación obtenidos en el presente trabajo y con respecto a otras investigaciones, muestran valores altos e incluso superiores a otras referencias encontradas en la literatura para esta especie, lo que evidencia que los sistemas utilizados fueron óptimos para la multiplicación de estos genotipos de teca en específico. Para el genotipo 618, los valores más altos de multiplicación fueron de 11,2 brotes/explante, y se obtuvieron en medio semisólido, en contraste, se obtuvo que el coeficiente de multiplicación para los BIT de este clon fue de 8,4 brotes/explante, ambos con la concentración más alta de BAP evaluada. Para este genotipo, todas las concentraciones de BAP en ambos sistemas se consideran adecuadas para la propagación masiva, ya que la concentración más baja de BAP en BIT (0,5mg/L) superó 3 veces al control (4,8 brotes/explante), y la misma concentración en MSS superó a su control en 5,8 veces (7,5 brotes/explante).

Para el genotipo 117, los coeficientes de multiplicación fueron más bajos que los del genotipo 618, lo que podría deberse a las características genéticas de las plántulas, ya que todas las demás condiciones del experimento fueron idénticas. Esto resalta la importancia de conocer y probar metodologías específicas para cada material a trabajar, con el fin de optimizar el proceso en específico (Levitus *et al.*, 2011). Para los tratamientos con los BIT, el genotipo 117 con la concentración de 0,5mg/L fue mayor por 3,4 veces al control (3,7 brotes/explante), y en el MSS lo superó por 3 veces en la concentración de 1,0mg/L (5,5 brotes/explante).



Quiala, Cañal, Meijón, *et al.* (2012), reportó un coeficiente de multiplicación para BIT en teca de 7,7 brotes/explante con una concentración de 1,5mg/L de BAP. Otro reporte de Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012) reportó en la concentración de 0,5mg/L un coeficiente de multiplicación de 4,1 brotes/explante en los BIT y de 3,6 brotes/explante en MSS. . El genotipo 618 tuvo mayores coeficientes de multiplicación que los resultados indicados en dichas investigaciones.

Abdelnour y Muñoz (2005), reportaron un 100% en la brotación de yemas con 2,5 mg/L de BAP y un 88% de brotación con la concentración de 5 mg/L de BAP en medio semisólido.

### **5.9. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en el contenido de agua en *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

Para la variable contenido de agua, los porcentajes obtenidos son elevados. En el cultivo *in vitro* estos resultados no son extraños, para el medio semisólido, al tratarse de un recipiente cerrado la humedad relativa es muy alta, y el intercambio gaseoso es casi nulo (Chen, 2004). En los BIT, se asegura un intercambio gaseoso, la humedad relativa es alta, y la absorción de los nutrientes del medio ocurre a través de toda la superficie de la planta en el caso del BIT. Adicionalmente el intercambio gaseoso puede mejorar la tasa de multiplicación.

La alta humedad relativa y la saturación de la atmósfera de los recipientes aumentan el contenido de humedad de las plantas y pueden inducir la hiperhidricidad (Capote *et al.*, 2009). En investigaciones de Moncaleán *et al.* (2009), con el cultivo de *Actinidia deliciosa* L, se determinó que el porcentaje de humedad aumentó al incrementar la concentración de BAP en medio líquido, también evaluaron el tiempo de exposición a la citoquininas, lo que conllevó a mayor acumulación de citoquininas endógenas activas, y por la tanto mayor acumulación de humedad.

Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez (2012), determinaron que a concentraciones de 1,0mg/L y 1,5mg/L de BAP se aumenta el contenido de humedad en los tejidos vegetales, y

concuerdan con Moncaleán (2013) que se debe a la acumulación de citoquininas activas, y que esto conlleva eventualmente a la hiperhidricidad. Esto concuerda únicamente con el tratamiento T3 del genotipo 618, en medio semisólido, en el cual se obtuvo el valor con diferencias significativas, y para el genotipo 117, el tratamiento T4 presentó para ambos sistemas, el valor más alto, sin embargo, no existieron diferencias significativas.

#### **5.10. Efecto de la concentración de BAP y el sistema de cultivo en la calidad de explantes de *Tectona grandis*, para los genotipos 618 y 117.**

A partir de rasgos fenotípicos para el genotipo 618 en SIT, la mejor calidad en presencia de BAP fue la concentración T2, aunque el tratamiento control tuvo el mayor porcentaje de plantas de calidad más alta, el tratamiento T4 presenta un porcentaje importante de plantas con calidad 4, lo cual es relevante. Para el MSS, la mejor calidad en presencia de BAP fue la concentración T2, aunque el tratamiento control tuvo el mayor porcentaje de plantas de calidad más alta. Seguido de T4 y T3. Para este genotipo, en medio semisólido, el porcentaje de plantas con calidad .4 y 5 (suma de ambos) fue del 65 al 100%.

Para el genotipo 117 la mejor calidad en presencia de BAP se obtuvo en el tratamiento T2, tanto para los BIT como para el MSS, aunque el tratamiento control siempre tuvo el mayor porcentaje de plantas de calidad más alta. Seguido de T3 para ambos sistemas, para este genotipo, se observa que la calidad está ligada a la concentración de citoquina añadida al medio de cultivo. Esto destaca la importancia de evaluar todas las condiciones y los requerimientos de la producción, ya que la perspectiva varía si solo se considera una de las variables. Levitus *et al.* (2011), mencionan que el tipo de regulador, cómo se combine y en qué concentraciones se utilice debe ser en función de la especie, del material genético y de la etapa de multiplicación que corresponde.

El tipo de recipiente, el microambiente, la frecuencia y duración de inmersión, la intensidad de la luz, la composición del medio de cultivo, la densidad por explante, la concentración de gases como el dióxido de carbono y el etileno entre otros, son factores que

influyen en el resultado de las variables estudiadas (Aitken-Christie, Kozai, y Takayama, 1995; Quiala-Mendoza y Barbon-Rodríguez, 2012).

Castro *et al.* (2002), mencionan que la mejor calidad y brotación fueron obtenidas con la concentración 0,5mg/L de BAP. Quiala, Cañal, Meijón, *et al.* (2012), encontraron que los Sistemas de Inmersión Temporal son mejores que los semisólidos para la reproducción del material y que la concentración que brindó mejor calidad de los explantes fue la de 0,5mg/L, aunque la que produjo más brotes por biorreactor fue la de 1,0mg/L de BAP. En esta investigación, para el genotipo 618, en cuestión meramente de calidad, el sistema con mejores índices fue el semisólido y para el genotipo 117, fueron los SIT.

#### **5.11. Características operativas de los sistemas de inmersión temporal y de los medios semisólidos.**

Los sistemas de inmersión temporal presentan diversas ventajas sobre los medios semisólidos, como por ejemplo, la disminución de costos al prescindir del agente gelificante, así como costos asociados por concepto de mano de obra.

Si se requiere cambiar el medio de cultivo, existe la posibilidad de que se sustituya el frasco contenedor del medio de cultivo, sin tener que manipular las plántulas. Además, es posible medir y controlar algunas condiciones, como por ejemplo tiempos de aireado adicional, modificar los tiempos y frecuencias de inmersión y optimizar los parámetros en función de la multiplicación masiva de material vegetal de calidad.

En Sistemas de Inmersión Temporal, es posible la renovación de la atmósfera gaseosa cada vez que se hace un ciclo de inmersión, lo cual contribuye con la eliminación de toxinas y otros exudados que pueden ser perjudiciales para las plántulas. El burbujeo que se genera con la entrada del medio líquido al contenedor con las plántulas y el aireado contribuye a que las estructuras estomáticas se preparen más eficientemente para la aclimatación, respecto a las plántulas en el medio semisólido.

Entre las desventajas de los Sistemas de Inmersión Temporal se encuentra la pérdida de gran cantidad de plantas cuando se contamina un biorreactor y la hiperhidricidad en las plantas debido al contenido de humedad. Otra desventajas de estos sistemas automatizados es el elevado costo inicial en infraestructura, sin embargo existen estudios que afirman que dicho costo se recupera satisfactoriamente con el ahorro en el costo del medio de cultivo y del recurso humano.

En cuanto a los MSS, la hiperhidricidad se da en un menor grado, y las posibilidades de pérdidas de material vegetal por concepto de contaminación son menores. El mantenimiento o reemplazo de los recipientes del medio semisólido suele ser más económico, sin embargo, es usual que la cristalería se requiera en mayor cantidad que los biorreactores, para cumplir con aspectos como densidad de los explantes, lo que conlleva costos por reemplazo de los recipientes, mano de obra y lavado de cristalería, que a la larga pueden representar un mayor gasto que la inversión para establecer SIT, sin tomar en cuenta el costo del agente gelificante.

a

## **6. Conclusiones y Recomendaciones**

Los sistemas de inmersión temporal y los medios semisólidos permitieron multiplicar los genotipos 618 y 117 de teca, pertenecientes a un programa de mejoramiento genético.

Para el genotipo 618 se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 5,35, con la utilización de los SIT, y de 6,55 para MSS. Para el genotipo 117, se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 9,35 en SIT, y de 12,20 en MSS.

El tratamiento control presentó menor cantidad de brotes totales que los tratamientos suplementados con el regulador de crecimiento, sin embargo, la calidad fue superior en ausencia de este último, ya que las plantas cultivadas en medio suplementados con mayores concentraciones de BAP tienden a hiperhidratarse.

Existe una correlación lineal positiva entre el número de brotes y el número de hojas, en ambos genotipos, lo cual podría tener un efecto fisiológico favorable en etapas posteriores de aclimatización.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda para el genotipo 618, el tratamiento suplementado con 1,5 mg/L de BAP, para la multiplicación de teca en SIT y el tratamiento enriquecido con 1,0 mg/L de BAP para MSS y para el genotipo 117, el tratamiento suplementado con 1,0 mg/L de BAP para ambos sistemas, debido a que estos tratamientos mostraron una buena relación entre la calidad de plantas, y el coeficiente de multiplicación.

Se recomienda hacer ensayos con concentraciones de regulador de crecimiento intermedias a las utilizadas en esta investigación y ampliar el rango de citoquinina, buscando un equilibrio favorable entre el coeficiente de multiplicación, la hiperhidricidad y la calidad.

Se recomienda mezclar reguladores de crecimiento, basados en metodología de otros autores para evaluar la inducción de brotación.

Se recomienda evaluar diferentes frecuencias y tiempos de inmersión, así como sopladados adicionales, para disminuir la hiperhidricidad.

Por otra parte, aunque todos los resultados evidenciaron una superioridad en los MMS, el experimento se diseñó con recipientes idénticos para homogenizar las condiciones de cultivo, pero el tamaño de estos recipientes específicamente cuando contienen medio semisólido en una producción escalada no es factible, ya que la operación manual de los mismos es complicada en la siembra y cosecha, por lo que en medio semisólido se utilizaría cristalería de un tamaño menor que facilite y agilice la siembra. Todos estos aspectos en el trabajo día a día de una producción *in vitro*, son relevantes para un éxito en la producción.

## 7. Bibliografía

- Abdelnour, A., & Muñoz, A. (2005). Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). *Kurú: Revista Forestal (Costa Rica)*, 2(5).
- Acosta, C. C. (2011). La micropropagación en especies forestales. *Ciencia Actual*, 1, 62–80.
- Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S., & Hessami, S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.005>
- Aitken-Christie, J., Kozai, T., & Takayama, S. (1995). Automation in plant tissue culture — general introduction and overview —. *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, 1–18. [https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6_1)
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/BF00040116>
- Álvarez M., J., Beltrán P., D., & Mesa, N. (2011). Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea* roxb. *Tumbaga*, 1(6), 107–124.
- Arista, J., Leiva, S., Guerrero, J. C., & Collazos, R. (2019). Efecto de las citoquininas en la multiplicación in vitro de cuatro variedades de *Vaccinium corymbosum*, a partir de segmentos nodales. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 2(2), 55–62.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). Fundamentos de Fisiología Vegetal. In *Fundamentos de fisiología vegetal* (2ª). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Basail Pérez, M., Medero Vega, V., Otero Gálvez, E., Torres Delgado, M., López Torres, J., Cabrera Jova, M., Santos Pino, A., Rayas Cabrera, A., Bauta Toledo, M., & Beovidez García, Y. (2012). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación in vitro del cultivar de plátano vianda “INIVITPV06-30” (*Musa* spp., AAB). *Comunicación Corta Biotecnología Vegetal*, 12(1), 53–57.
- Bermúdez-Carabaloso, I., Rodríguez Urquiza, M., Reyes Vega, M., & Jiménez Padrón, A. (2019). Efecto del uso combinado de dos citoquininas en la multiplicación y regeneración de yemas adventicias de banano cv. ‘Gros Michel’ (*Musa* AAA). *Biotecnología Vegetal*, 19(2), 139–146.
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 165–195). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_11)
- Bonilla Morales, M. M., Mancipe Murillo, C., & Aguirre Morales, A. C. (2015). Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos In vitro conservation: a perspective for the management of phylogenetic resources Conservação in vitro: uma perspectiva para a gestão dos recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 67–82.
- Capote, A., Pérez-Alonso, N., Pérez, A., Wilken, D., Gerth, A., Müller-Kuhrt, L., & Jiménez, E. (2009). Efecto del cultivo in vitro en el perfil metabólico de *Psidium guajava* L. *Biotecnología Vegetal*, 9(1).

- Castro R, D., Díaz G, J., & Linero, J. C. (2002). Propagación clonal in vitro de arboles elite de teca (*Tectona grandis* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4, págs. 49-53.
- Colmenares, M., & Giménez, C. (2003). Multiplicación in vitro *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Facultad de Agronomía*, 20(4), 468–477.
- Cruzat G, R. (2009). Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides. In *Experiencias de innovación para el emprendimiento agrario*.
- Daquinta Gradaille, M., Ramos, L., Lezcano, Y., Rodríguez, R., & Escalona, M. (2000). Algunos elementos en la micropropagación de la teca. *Biotecnología Vegetal*, No.1, 39–44.
- Daquinta, M., Ramos, L., Capote, I., Lezcano, Y., Rodríguez, R., & Escalona, M. (2002). Inducción de callos y regeneración de plantas en *Tectona grandis* L. *Biotecnología Vegetal*, 2(1), 15–17.
- Daquinta, M., Ramos, L., Lezcano, Y., Capote, I., Escalona, M., Rodríguez, R., & Trina, D. (2000). Micropropagación de la teca. In *Revista Forestal Centroamericana*.
- Daquinta, M., Rodríguez, R., Ramos, L., Capote, I., Lezcano, Y., Trino, D., & Escalona, M. (2003). Manejo biotecnológico de especies forestales y bambúes en Cuba. In *FAO* (p. s.p.).
- De Faria Silva, M., Jiménez, E., & Milián Chávez, M. (2002). Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación in vitro de brotes de *Saccharum spp. var. IBP 89-112*. 2(3), 143–147.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743–748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Espitia, M., Murillo, O., & Castillo, C. (2011). GANANCIA GENÉTICA ESPERADA EN TECA (*Tectona grandis* L.f.) EN CÓRDOBA (COLOMBIA). *Colombia Forestal*, 14(1), 81–93.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 69, 215–231.
- FAO. (2009). The future of teak and the high-grade tropical hardwood sector. In *Forestry*.
- FAO. (2015). *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO*.
- Florio, S., & Mogoñol. (2011). Efecto de dos citocininas y dos estados físicos del medio de cultivo sobre la multiplicación in vitro del plátano ‘ Hartón Gigante ’ ( *Musa AAB* ) Effect of two cytokinins and two physical states of the culture medium on in vitro multiplication of plantain. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)*, 28(1), 89–98.
- Fonseca, W. (2004). Manual para productores de teca (*Tectona grandis* L.f) en Costa Rica. *SIREFOR*, 1–112.
- Gatti, K. C. (2012). PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE PAU MULATO (*Calycophyllum spruceanum* (Benth) K. Schum.), JEQUITIBÁ (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze) E TECA (*Tectona grandis* Linn. f.) POR MINIESTAQUIA. *Revista Árvore*, 36(3), 389–399.
- George, E. F., Hall, M. a., & Klerk, G.-J. De. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Vol 1. The Background. In *Book*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1)



- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607–621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Gil Rivero, A. E., López Medina, E., & López Zavaleta, A. (2016). Efecto sinérgico del ácido indolacético, ácido giberélico y 6-bencilaminopurina en la propagación in vitro de “papaya” *Carica papaya* L. (Caricaceae). *ArnaldoA*, 23(2), 577–586.
- Giri, S. P., & Varma, S. B. (2013). Study of wound healing activity of *Tectona grandis* Linn. leaf extract on rats. *Ancient Science of Life*, 32(4), 241. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.131984>
- Gómez, P., & Moya-Roque, R. (2012). Comportamiento y costos de secado al aire y preservación por inmersión-difusión de madera de *Tectona grandis* L.f. y *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand de plantaciones de rápido crecimiento en el norte de Costa Rica. *KURÚ: Revista Forestal*, 5(13), 19–31.
- Gupta, P. K., Nadgir, A. L., Mascarenhas, A. F., & Jagannathan, V. (1980). Tissue culture of forest trees: Clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science Letters*, 17(3), 259–268. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(80\)90156-X](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90156-X)
- Hernández Aguilar, A., Rojas Vargas, A., Hine, A., & Daquinta, M. (2013). Multiplicación in vitro de *Gmelina arborea* Roxb en Sistemas de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal*, 13(3), 153–159.
- Huda, K. M. K., Bhuiyan, M. S. R., Zeba, N., Banu, S. A., Mahmud, F., & Khatun, A. (2009). Effect of FeSO<sub>4</sub> and pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of Tossa Jute. *Plant Omics Journal*, 2(5), 190–196.
- Hvoslef-Eide, A. K., & Preil, W. (2005). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (Springer, Ed.).
- Igarza Castro, J., Agramonte, D., Alvarado-Capó, Y., de Fera, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Reseña Científica Bioteología Vegetal*, 12(1), 3–24.
- Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 63–89. <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203>
- Jiménez-Terry, F., & Agramonte, D. (2013). *Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales*. 13(1), 3–21.
- Jones, F. (2006). *Establecimiento in vitro y Micropropagación de frambuesa (Rubus idaeus L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA®*.
- Kollert, W., & Kleine, M. (2017). The Global Teak Study. *International Union of Forest Research Organizations (IUFRO)*, 36, 1–36.
- Kussumoto de Alcântara, B., Marcos Ortega, E. M., & Castro Souza, V. (2016). Identification of morphological descriptors for characterization of teak (*Tectona grandis* L.f.). *Advances in Forestry Science*, 3(1), 1–5.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2011). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. *Consejo Argentino Para La Información y El Desarrollo de La Biotecnología. Rgentino Para La Información y El Desarrollo de La Biotecnología*.
- Martre, P., Lacan, D., Just, D., & Teisson, C. (2001). Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 25–35. <https://doi.org/10.1023/A:1011666531233>

- Marulanda, M. L., & Isaza V, L. (2004). Establecimiento in vitro de heliconias con fines de producción masiva. *Scientia Et Technica*, 26, 193–197.
- Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K., & Mishra, B. N. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *Journal of Biotechnology*, 6(13), 1484–1492. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i13.57591>
- Mendiola, A., Aguirre, C., Dávila, J., Fernández, M., & Vittor, P. (2016). *Estructuración económica y financiera de un instrumento de participación en negocios forestales: el caso de la teca en la región San Martín* (A. Ampuero & J. C. Soto, Eds.; Primera). ESAN.
- Mendoza de Gyves, E., Royani, J. I., & Rugini, E. (2007). Efficient method of micropropagation and in vitro rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. *Annals of Forest Science*, 64(1), 73–78. <https://doi.org/10.1051/forest:2006090>
- Meza, A. R., Rodríguez, J., Gatti, K. C., & Espinoza, E. E. (2015). Propagación de arboles de teca *Tectona Grandis* L. f. por miniestacas Propagation of *Tectona Grandis* L. f. trees by minicutting. *Temas Agrarios*, 20(2), 43–48.
- Moncaleán, P., Fal, M. A., Castañón, S., Fernández, B., & Rodríguez, A. (2009). Relative water content, in vitro proliferation, and growth of actinidia deliciosa plantlets are affected by benzyladenine. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37(4), 351–359. <https://doi.org/10.1080/01140671.2009.9687590>
- Muñiz, R. (2018). La propagación in vitro de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal . Una Tecnología Apropriada para la agricultura sustentable. *Revista Tekhné*, 21(3), 43–50.
- Murillo Gamboa, O., Badilla Valverde, Y., Villalobos, M., & Rojas Parajeles, F. (2013). *Optimización de la tecnología de propagación vegetativa in vivo y plantación de teca y pilón*.
- Murillo, O., Wright, J., Monteuis, O., & Montenegro, F. (2013). Mejoramiento genético de la teca en América Latina. In R. De Camino & J. P. Morales (Eds.), *Las plantaciones de Teca en América Latina: Mitos y Realidades* (p. 27).
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar Alonso, I., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 10–25. <https://doi.org/10.7818/re.2014.16-2.00>
- Pandey, D., & Brown, C. (2000). La teca: una visión global. *Unasylva* 201, 51, 446–450. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90200-2](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90200-2)
- Park, Y., Bonga, J., & Moon, H. (2016). Vegetative Propagation of Forest Trees. In *National Institute of Forest Science*.
- Pérez, A., Nápoles, L., Concepción, O., & Trujillo, R. (2002). Multiplicación in vitro de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales*, 23(3), 57–61.
- Pérez, D., & Kanninen, M. (2005). Stand growth scenarios for *Tectona grandis* plantations in Costa Rica. *Forest Ecology and Management*, 210(1–3), 425–441. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.02.037>
- Polo Santos, J., Suarez Padrón, I., & Gatti, K. C. (2013). Micropropagación de *Tectona grandis* L.f. a partir de meristemos preexistentes. *Temas Agrarios*, 18(2), 83–93.

- Posada Pérez, L., Gómez Kosky, R., Reyes, M., & Díaz Alvares, L. (2003). *Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos*. 3(1), 3–8.
- Quijala, E. (2014). Propagación clonal de la Teca (*Tectona Grandis* L.). Mediante Cultivo in Vitro. *Revista Anales de La Academia de Ciencias de Cuba*, 4(2), 1–34.
- Quijala, E., Cañal, M. J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., de Feria, M., & Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 223–234. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0088-3>
- Quijala, E., Jiménez-Tello, M. V, Barbón, R., Chávez, M., de Feria, M., La O, M., & Pérez, M. (2014). Influence of 6-Benzyladenine and gelling agent on the reduction of hyperhydricity in *Tectona grandis* L. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XVI(1), 129–136.
- Quijala-Mendoza, E. (2012). *Efecto de la 6-Bencilaminopurina en la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de Tectona grandis L. cultivados en sistemas de inmersión temporal*. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las plantas.
- R, Z. A., Shahnadz H, N. A., & Radziah M Z, C. C. (2011). A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. *African Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1349>
- Ramírez Aguilar, D., Agramonte Peñalver, D., Gutiérrez Martínez, O., Barbón, R., Pérez Peralta, M., Collado, R., & Jiménez Terry, F. (2003). Propagación in vitro de explantes de Teca obtenidos a partir de semillas. *Biotecnología Vegetal*, 3(3), 161–167.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52(2). <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Rocano Curillo, M. N. (2017). *Eficiencia de la multiplicación in vitro de Juglans neotrópica (nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)*. 1–82.
- Rodríguez Beraud, M., & Morales Ulloa, D. (2015). Effect of explant density and volume of cultivation medium on in-vitro multiplication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties “Brigitta” and “Legacy.” *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 31–40. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.03>
- Rodríguez, R., Escalona, M., Rodríguez, Y., Cid, M., & González, J. (2000). Aclimatización de plantulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) provenientes de sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 21(3), 51–56.
- Scherer, R. F., García, A. C., Fraga, H. P. de F., Vesco, L. L. D., Steinmacher, D. A., & Guerra, M. P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.027>
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*.
- Shirin, F., Rana, P. K., & Mandal, A. K. (2005). In vitro clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. *Journal of Forest Research*, 10(6), 465–469. <https://doi.org/10.1007/s10310-005-0173-8>
- Steward, F. C., Caplin, S. M., & Millar, F. K. (1952). Investigations on Growth and Metabolism of Plant Cells: I. New Techniques for the Investigation of Metabolism, Nutrition and Growth in Undifferentiated Cells. *Ann. Bot.*, 16(1), 57–79.

- Sudarwoko Adi, D., Gopar, M., Darmawan, T., Amin, Y., & Dwianto, W. (2015). *Evaluation of the wood quality of platinum teak wood.*
- Tiwari, S. K., Tiwari, K. P., & Siril, E. A. (2002). An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(1), 1–6. <https://doi.org/10.1023/A:1016570000846>
- Tovar Mendoza, J. A. (2016). *Algunas características fisiológicas de plantas de vid var. Pedro Ximénez en el roceso de aclimatación al exterior tras su propagación in vitro.* Universidad de Sevilla.
- Valverde-cerdas, L., Alvarado, L., & Hine, A. (2004). Micropropagation of clones from controlled crosses of Gmelina arborea in Costa Rica. *New Forest*, 28(Zeaser 1999), 187–194.
- Vyas, P., Kumar Yadav, D., & Khandelwal, P. (2018). Natural Product Research Formerly Natural Product Letters Tectona grandis (teak) – A review on its phytochemical and therapeutic potential Tectona grandis (teak) – A review on its phytochemical and therapeutic potential. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1440217>
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. In *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 79–93). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_5](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_5)

## Anexos

### Anexo 1

**Cuadro 7.** Análisis estadístico para el genotipo 618, considerando la concentración de BAP en el medio de cultivo.

Tratamiento		Variables					
Medio de cultivo	Concentración de BAP (mg/L)	Brotes (v.e p=0,000)	Rebrotes (v.e p=0,000)	Brotes totales (v.e p=0,000)	Mayor elongación (v.e p=0,000)	Hojas (v.e p=0,005)	Peso seco (v.e p=0,000)
T1	0,0	2,43 c	0,05 b	2,48 c	2,72 a	13,25 b	21,60 c
T2	0,5	2,45 c	1,50 a	3,95 b	3,07 a	17,43 ab	41,52 bc
T3	1,0	3,13 b	2,30 a	4,43 a	1,54 b	18,15 a	46,06 b
T4	1,5	3,80 a	1,53 a	5,33 a	1,39 b	19,23 a	85,06 a

**v.e: Valor del estadístico**

## Anexo 2

Cuadro 8. Análisis estadístico para el genotipo 618, considerando el tipo de sistema (v.e: Valor del estadístico).

Sistema	Variables					
	Número de brotes (v.e p=0,093)	Número de rebrotes (v.e p=0,809)	Número de brotes totales (v.e p=0,309)	Mayor elongación (v.e p=0,000)	Número de hojas (v.e p=0,825)	Peso seco (v.e p=0,000)
BIT	2,80 a	1,31 a	4,11 a	2,85 a	16,88 a	81,05 a
MSS	3,10 a	1,38 a	4,48 a	1,50 b	17,15 a	16,07 b

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ )

v.e: Valor del estadístico

## Anexo 3

Cuadro 9. Análisis estadístico para el genotipo 618, considerando la concentración de BAP en el medio de cultivo.

Tratamiento		Variables					
Medio de cultivo	Concentración de BAP (mg/L)	Número de brotes (v.e p=0,000)	Número de rebrotes (v.e p=0,000)	Número de brotes totales (v.e p=0,000)	Mayor elongación (v.e p=0,000)	Número de hojas (v.e p=0,005)	Peso seco (v.e p=0,000)
T1	0,0	2,43 c	0,05 b	2,48 c	2,72 a	13,25 b	21,60 c
T2	0,5	2,45 c	1,50 a	3,95 b	3,07 a	17,43 ab	41,52 bc
T3	1,0	3,13 b	2,30 a	4,43 a	1,54 b	18,15 a	46,06 b
T4	1,5	3,80 a	1,53 a	5,33 a	1,39 b	19,23 a	85,06 a

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ )

v.e: Valor del estadístico

### Anexo 4

Cuadro 10. Análisis estadístico para el genotipo 618, considerando el tipo de sistema.

Sistema	Variables					
	Número de brotes (v.e p=0,093)	Número de rebrotes (v.e p=0,809)	Número de brotes totales (v.e p=0,309)	Mayor elongación (v.e p=0,000)	Número de hojas (v.e p=0,825)	Peso seco (v.e p=0,000)
BIT	2,80 a	1,31 a	4,11 a	2,85 a	16,88 a	81,05 a
MSS	3,10 a	1,38 a	4,48 a	1,50 b	17,15 a	16,07 b

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ )

v.e: Valor del estadístico

### Anexo 5

Cuadro 11. Análisis estadístico para el genotipo 117, considerando la concentración de BAP en el medio de cultivo.

Medio de cultivo	Variables						
	Concentración de BAP (mg/L)	Número de brotes (v.e p=0,000)	Número de rebrotes (v.e p=0,000)	Número de brotes totales (v.e p=0,000)	Mayor elongación (v.e p=0,000)	Número de hojas (v.e p=0,000)	Peso seco (v.e p=0,000)
T1	0,0	2,38 b	0,03 c	2,40 c	1,84 b	11,28 c	11,92 c
T2	0,5	3,60 a	3,53 b	7,13 b	3,03 a	32,93 b	37,83 ab
T3	1,0	3,65 a	4,23 b	7,88 b	1,98 b	30,90 b	27,45 b
T4	1,5	3,65 a	7,13 a	10,78 a	1,99 b	41,35 a	42,02 a

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ )

v.e: Valor del estadístico

## Anexo 6

Cuadro 12. Análisis estadístico para el genotipo 117, considerando el tipo de sistema.

Sistema						
Sistema	Número de brotes (v.e p=0,007)	Número de rebrotes (v.e p=0,000)	Número de brotes totales (v.e p=0,005)	Mayor elongación (v.e p=0,000)	Número de hojas (v.e p=0,000)	Peso seco (v.e p=0,003)
BIT	3,50 a	2,78 b	6,28 b	2,77 a	25,24 b	35,78 a
MSS	3,14 b	4,68 a	7,81 a	1,64 b	32,99 a	23,83 b

Letras diferentes entre tratamientos evidencian diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ )

v.e: Valor del estadístico



## Anexo 7

Cuadro 13. Supuestos estadísticos obtenidos mediante un Modelo Lineal General para el genotipo 117.

		Clon 117					
		Variable					
Prueba		Brotación	Rebrotes	Brotes totales	Elongación	Número de hojas	Peso Seco
Normalidad Datos	AD	<0,005	<0,005	<0,005	0,006	<0,005	<0,005
	RJ	0,016	<0,010	<0,010	0,012	<0,010	<0,010
	KS	0,006	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Homog. Var. Datos	Comp Mult	0,217	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
	Levene	0,006	0,000	0,000	0,003	0,000	0,017
Normalidad Resi_Sist	AD	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	RJ	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
	KS	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,042	<0,010
Normalidad Resi_Med	AD	<0,005	<0,005	<0,005	0,035	<0,005	<0,005
	RJ	<0,010	<0,010	<0,010	0,068	<0,010	<0,010
	KS	<0,010	<0,010	<0,010	0,054	<0,010	<0,010