

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES
LICENCIATURA EN INGENIERIA EN CIENCIAS FORESTALES

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE
MATERIAL SELECCIONADO DE CENÍZARO (SAMANEA SAMAN JACQ. MERR.)**

Trabajo de graduación sometido a consideración por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional, para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Ciencias Forestales con énfasis en Manejo Forestal

Modalidad: artículo científico

MARÍA ELENA CORRALES TORRES

Heredia, Costa Rica.

Noviembre, 2022

ACTA DE APROBACIÓN

Trabajo de graduación sometido a consideración por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional, para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Ciencias Forestales con énfasis en Manejo Forestal.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Gustavo Hernández Sánchez, MSc.
Representante del Decano Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

Melissa Blandón Naranjo, MSc.
Representante de la Escuela de Ciencias Ambientales

Ana Hine Gómez, Ph.D
Tutora

William Hernández Castro, Ph.D
Lector

José Bernal Azofeifa Bolaños, MSc
Lector

María Elena Corrales Torres

María Elena Corrales Torres
Estudiante

Desarrollo de un protocolo de establecimiento *in vitro* de material seleccionado de cenízaro (*Samanea saman* Jacq. Merr.)

María Elena Corrales-Torres ¹

Ana Hine-Gómez ²

Laura Sánchez-Calvo ²

Resumen

El cenízaro (*Samanea saman*) es una especie nativa de árbol en Costa Rica, de reconocido valor económico por la calidad de la madera y la variedad de usos; estas características le permite competir con otras especies usadas para reforestación, con el fin de generar productos dirigidos a mercados selectos. El objetivo de esta investigación fue desarrollar una metodología para el establecimiento *in vitro* de Cenízaro como herramienta para un programa de mejoramiento genético y conservación de germoplasma en Costa Rica. El ensayo se estableció a partir de material reproducido en un invernadero micro túnel y fuera de este; posteriormente, se evaluaron dos agentes desinfectantes, hipoclorito de sodio (NaClO) y cloruro de mercurio (HgCl₂), en diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Se obtuvieron porcentajes de establecimiento *in vitro* bajos e inferiores al 12,5 % al emplear material proveniente del invernadero tipo túnel; mientras que, el material proveniente fuera del invernadero, presentó porcentajes de establecimiento *in vitro* superiores a 72,3 %. El tratamiento para el segundo ensayo presentó menor porcentaje de contaminación para nudos fue con el uso de hipoclorito de sodio (NACIO) al 1 % por 20 minutos (D5), en el cual se obtuvo un 85,47 % de explantes establecidos y con la mejor apariencia. Por otro lado, el mejor tratamiento para ápices fue con el uso de cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,2 % por 5 minutos (D6), en el cual se obtuvo un 100 % de explantes establecidos y con la mejor apariencia.

Palabras clave: Cenízaro, *Samanea saman*, *in vitro*, desinfección, explantes, establecimiento.

¹ Escuela de Ciencias de Ambientales, Universidad Nacional, Costa Rica.
maryct8@gmail.com

² Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional, Heredia,
Costa Rica. ana.hine.gomez@una.cr; laura.sanchez.calvo@una.cr

Abstract

The Cenízaro tree species (*Samanea saman*) is native to Costa Rica, of recognized economic value due to the quality of the wood and variety of uses, characteristics that allow it to compete with other species used for reforestation in order to generate products aimed at select markets. The objective of this research was to develop a methodology for the *in vitro* establishment of Cenízaro as a tool for a genetic improvement and germplasm conservation program in Costa Rica. The test was established from material reproduced in a tunnel-type micro-greenhouse and outside of it, two disinfectant agents, sodium hypochlorite (NaClO) and mercuric chloride (HgCl₂), were evaluated at different concentrations and exposure times. Low *in vitro* establishment percentages of less than 12.5 % were obtained when using material from the tunnel-type greenhouse, while material from outside the greenhouse presented *in vitro* establishment percentages greater than 72.3 %. The best treatment for second trial of nodes was sodium hypochlorite (NaClO) 1 % i.a for 20 minutes (D5), in which 85.47 % of established explants and with the best appearance were obtained. Moreover, the best treatment for apexes was mercuric chloride (HgCl₂) 0.2 % for 5 minutes (D6), in which 100 % of established explants and with the best appearance.

Keywords: Cenízaro, *Samanea saman*, *in vitro*, disinfectant agents, explant, establishment.

Introducción

Los bosques naturales o plantados juegan un papel fundamental en aspectos ambientales, económicos y sociales a nivel mundial. De acuerdo con Reed, et al. [1], estos proporcionan leña, medicamentos, ingresos y empleo para millones de personas de áreas rurales. Además, el componente arbóreo brinda beneficios ambientales al regular el aire y el agua, facilita la polinización de los cultivos, enriquece el suelo y reduce la erosión.

En muchos lugares, los madereros y comerciantes de madera están involucrados en la tala ilegal y la sobre explotación de los recursos, lo que provoca impactos negativos en la economía y servicios ecosistémicos [2]. Lo anterior, ocasiona una alta erosión genética al reducir las reservas de germoplasma en los bosques. Aunado a lo anterior, el autor Quesada [3] menciona que, a medida que transcurre el tiempo, este escenario de explotación provocará que las especies declinen en su capacidad reproductiva y en la alteración del medio en que se desarrollan; por lo tanto, esta situación repercute directamente en el aprovechamiento futuro, ya que la disponibilidad de material vegetal de calidad para programas de mejoramiento sería escaso o inexistente.

El interés por la conservación del germoplasma usado en la reforestación o el manejo de bosques ha contribuido al desarrollo de herramientas en el campo del mejoramiento genético, con el fin de impulsar la actividad forestal. Asimismo, el auge de las tecnologías de propagación vegetativa *in vivo* ha evolucionado en la última década en el país, lo que ha permitido avances significativos en la clonación de prácticamente todas las especies forestales comerciales del país [4]. Debido a lo anterior, se han desarrollado protocolos para la propagación de especies forestales nativas y, de esta manera, facilitar la reforestación del mayor número de individuos de calidad genética.

De acuerdo con Scherer, et al. [5], a través de la micropropagación, se ha avanzado en la implementación de procedimientos que permiten el desarrollo de especies mejoradas. Para facilitar la clonación de materiales seleccionados en el corto plazo, la micropropagación se convierte en una herramienta de la biotecnología que

permite la producción de individuos con características genéticas similares a la planta que les dio origen. Además, el establecimiento *in vitro* permite un rápido aumento en el número de plantas o la obtención de material vegetal con elevada calidad sanitaria.

A pesar de la importancia económica y ecológica de la especie a nivel nacional e internacional, existe poca información en la literatura sobre el establecimiento *in vitro* del cenízaro como parte de un programa de conservación y mejoramiento genético. Por lo tanto, se vuelve imperante la micropropagación a través del cultivo de tejidos mediante un sistema eficiente de propagación vegetativa. Hasta la fecha, no hay información sobre micropropagación de especies de cenízaro para producir clones fieles [6].

El objetivo de esta investigación es desarrollar una metodología para el establecimiento *in vitro* de *S. saman* (Cenízaro) para un programa de mejoramiento genético y conservación de germoplasma en Costa Rica.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Forestal del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional, ubicado en Santa Lucía Barva, Heredia, Costa Rica. El laboratorio cuenta con un área de introducción y multiplicación de material vegetal, además de equipo especializado para el desarrollo de proyectos.

Como material vegetal se emplearon plántulas a partir de una semilla germinada en el invernadero, provenientes de la colección de semillas del proyecto denominado “Bases para el mejoramiento genético y conservación de germoplasma de cenízaro (*S. saman*) en Costa Rica”, adscrito al INISEFOR.

Mantenimiento de las condiciones fitosanitarias de plantas madre en invernadero. Para el primer ensayo, las plantas se mantuvieron en un invernadero micro túnel con riego por aspersion diario, con un régimen de riegos de un minuto tres veces

por día (Figura 1A), donde la humedad promedio fue de 72,6 %. Para este caso, se emplearon los tratamientos de desinfección del D1-D4.

Posteriormente, basado en los resultados del primer ensayo, las plantas madre se trasladaron a un espacio dentro del invernadero, pero fuera del invernadero micro túnel para un segundo ensayo se emplearon los tratamientos de desinfección D5 y D6. Con un régimen de riegos de un minuto tres veces por día, y aplicando Kasugamicida 5 ml/l (fungicida y bactericida) dos veces por semana (Figura 1B).



Figura 1. Plantas mantenidas en un invernadero micro túnel (A) y plantas mantenidas fuera del invernadero micro túnel (B).

Figure 1. Plants kept inside a micro tunnel greenhouse (A) and plants kept outside the micro tunnel greenhouse (B).

Colecta de material. El material experimental para introducir en condiciones *in vitro*, consistió en ápices y nudos tomados del último y antepenúltimo segmento nodal de cada plántula. En total fueron 120 explantes para cada desinfección. Posteriormente, se evaluaron dos metodologías de desinfección para la introducción *in vitro* de los nudos, descrita a continuación.

Metodologías de desinfección de segmentos nodales, para el establecimiento en condiciones in vitro. Para esta etapa, se emplearon dos métodos de trabajo, partiendo de la metodología de desinfección de semillas de *S. saman* establecida por Valverde, et al. [7] y Hine, et al. [8].

En primer lugar, de las plantas desarrolladas y mantenidas en condiciones de invernadero, se cortaron los ápices y segmentos nodales de 2,5 cm de largo y se colocaron bajo un flujo constante de agua durante 30 min. Seguidamente, se lavaron con agua y jabón líquido 1% (bactex antibacterial®) por 10 min en agitación. Posteriormente, se siguió la metodología del Cuadro 1 y Cuadro 2.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección empleados para el establecimiento en condiciones *in vitro* de nudos y ápices provenientes de plantas mantenidas en un invernadero micro túnel correspondientes al primer ensayo.

Table 1. Disinfection treatments used for the establishment in *in vitro* conditions of nodes and tips from plants kept in a tunnel-type micro-greenhouse to belong the first trial

Pasos	Tratamientos			
	D 1	D 2	D 3	D 4
Sumergir en una mezcla en agitación de Agrimicin® (2 g/l) y Benlate® (2 g/l) por 30 min	x		x	
Sumergir en una solución en agitación de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% i.a. + tween al 0,1 % por 20 min.	x			
Sumergir en una solución de cloruro de mercurio (HgCl ₂) al 0,1 % p/v por 5 min en agitación		x		
Sumergir en una solución en agitación de hipoclorito de sodio (NaClO) 2,5% i.a.+ tween al 0,1 % por 15 min.			x	
Sumergir en una solución de cloruro de mercurio (HgCl ₂) al 0,1 % p/v por 5 min con bomba de vacío.				x
Tres lavados con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar, durante 2 min.	x	x	x	x

x: Paso aplicado, D: tratamiento de desinfección.

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección empleados para el establecimiento en condiciones *in vitro* de nudos y ápices de plantas mantenidas fuera del invernadero micro túnel.

Table 2. Disinfection treatments used for the establishment in *in vitro* conditions of nodes and tips of plants kept outside the tunnel-type micro-greenhouse.

Pasos	Tratamientos	
	D5	D6
Sumergir en una mezcla en agitación de Kasugamicida 5 ml/l por 30 min	x	
Sumergir en una solución en agitación de hipoclorito de sodio (NaClO) 1 % i.a.+ tween al 0,1 % por 20 min.	x	
Sumergir en una solución de cloruro de mercurio (HgCl ₂) al 0,2% p/v por 5 min con bomba de vacío		x
Tres lavados con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar, durante dos min.	x	x

x: Paso aplicado, D: tratamiento de desinfección.

Por último, se inocularon en los medios de cultivo MS (1962) y WPM, descrito a continuación.

Efecto del medio de cultivo semisólido de Murashige y Skoog (MS) (1962) [9] y Woody Plant Medio (WPM) sobre el crecimiento de segmentos nodales. Se evaluó el efecto del medio de cultivo semisólido empleando dos medios de cultivo: el MS (1962) y el (WPM). Ambos se complementaron con 3 % de sacarosa, el pH del medio fue ajustado a 5,7 antes de la esterilización por autoclave (21 °C, 1,1 kg/cm² presión y 25 min) y, finalmente, se solidificaron con 0,2 % de Phytigel®. Cada unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con 10 ml de medio, con 30 repeticiones por tratamiento. El material cultivado se colocó en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica. La evaluación de la contaminación se realizó cada ocho días durante un mes.

Diseño estadístico y análisis de información. Se realizaron dos ensayos independientes primeramente se analizó el material proveniente del invernadero micro túnel y posteriormente se evaluó el material proveniente fuera del invernadero micro túnel.

Para cada desinfección consistió en treinta nudos y treinta ápices introducidos en condiciones *in vitro*, con dos repeticiones. Como unidad experimental, se consideró un nudo de 2,5 cm de longitud cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo. Se evaluaron las variables: porcentaje de nudos y

ápices contaminados, número de nudos y ápices establecidos *in vitro*, número promedio de brotes por nudo desinfectado y longitud de los brotes. Asimismo, el ensayo se evaluó semanalmente durante un mes. Se utilizó un modelo lineal general y, posteriormente, las diferencias entre los tratamientos se determinaron con la prueba exacta de Fisher con una confianza del 95 %. El procesamiento de la información se realizó con el “software” estadístico *Minitab*.

Resultados y discusión

Al evaluar el efecto de cada una de las metodologías de desinfección sobre los ápices y nudos provenientes de invernadero tipo túnel en el primer ensayo, se obtuvo una diferencia estadística significativa en cada una de las variables evaluadas ($P \leq 0,05$) y altos porcentajes de contaminación, mayormente por bacteria. Sin embargo, se puede apreciar que, tanto para el caso de los nudos como de los ápices, no se observó diferencia estadística significativa entre los resultados de las metodologías de desinfección D1, D2 y D3 con respecto a la contaminación por bacteria, mostrando un porcentaje de contaminación superiores al 70 %. De igual manera, se puede apreciar que, tanto para el caso de los nudos como de los ápices, tampoco se observó diferencia estadística significativa entre las metodologías de desinfección D1 y D2 con respecto al porcentaje de explantes establecidos, obteniéndose un promedio entre un 7 % y un 11 % de explantes establecidos en condiciones *in vitro*, respectivamente (Cuadro 3).

Además, los resultados obtenidos evidencian que sin importar el tipo de explante, con la desinfección D3 no se logra el establecimiento de explantes en condiciones *in vitro*. Aunado a lo anterior, es importante mencionar que, aunque la metodología de desinfección D4 obtuvo los porcentajes más bajos de contaminación por bacteria sin importar el tipo de explantes, el porcentaje promedio de explantes establecidos en condiciones *in vitro* fue bajo (1,5 %).

Los resultados obtenidos muestran que al emplear hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % i.a. + tween al 0,1 % por 20 min (D1) o cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,1 % p/v por 5 min en agitación (D2), se obtiene en promedio los mismos porcentajes de establecimiento tanto para ápices como para nudos. Sin embargo, al aumentar la

concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) a 2,5 % i.a. y disminuir el tiempo de exposición a 15 minutos (D3) o emplear bomba en la metodología cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,1 % p/v por 5 minutos (D4), los resultados no mejoran ni para el porcentaje de contaminación ni para el porcentaje de nudos o ápices establecidos en condiciones *in vitro* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Establecimiento en condiciones *in vitro* de nudos y ápices provenientes de plantas mantenidas en invernadero micro túnel, luego de 28 días de cultivo *in vitro*.

Table 3. Establishment under *in vitro* conditions of nodes and tips from plants kept inside a tunnel-type micro-greenhouse, after 28 days of *in vitro* culture.

Explante	Desinfección*	Contaminación			Mortalidad (%)	Explantos establecidos (%)
		Hongo (%)	Bacteria (%)	Ambos (%)**		
Nudos	D1	8,33 ^b	81,67 ^{ab}	3,33 ^b	0,00 ^b	6,66 ^{abc}
	D2	11,67 ^b	80,00 ^{ab}	1,67 ^b	0,00 ^b	6,66 ^{abc}
	D3	10,00 ^b	71,67 ^{ab}	15,00 ^a	3,33 ^b	0,00 ^c
	D4	40,32 ^a	43,55 ^c	14,52 ^a	0,00 ^b	1,61 ^{bc}
Ápices	D1	3,33 ^b	86,67 ^a	1,11 ^b	0,00 ^b	8,88 ^{ab}
	D2	8,86 ^b	74,68 ^{ab}	1,27 ^b	2,53 ^b	12,65 ^a
	D3	3,17 ^b	87,30 ^a	0,00 ^b	9,52 ^a	0,00 ^c
	D4	12,50 ^b	65,63 ^b	20,31 ^a	0,00 ^b	1,56 ^c

Si las letras son distintas, es que hay diferencias significativas $p < 0.05$.

*D1: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % i.a. por 20 min, D2: cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,1 % p/v por 5 min en agitación, D3: Hipoclorito de sodio (NaClO) 2,5 % i.a. por 15 min y D4: cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,1 % p/v por 5 min con bomba de vacío.

* * En la variable ambos se deben considerar los explantes contaminados tanto por bacteria como por hongo.

Estos resultados confirman lo investigado por otros autores, los cuales reportan que las plantas de tallo leñoso poseen más dificultad para ser introducir las *in vitro* [10], el establecimiento del cultivo es a menudo limitado debido a las tasas de contaminación mayores [11], y que, por su crecimiento lento, se encuentran más propensas durante mayor tiempo a diferentes tipos de bacterias y hongos difíciles de erradicar externamente [12], [13].

Un factor que pudo haber afectado la eficiencia de las metodologías de desinfección empleadas, pudo ser que se introdujo material proveniente del invernadero micro túnel, donde el ambiente con alta humedad relativa, propició la proliferación de microorganismos. En países tropicales, las condiciones de temperatura y humedad son propicias para el desarrollo de un sinnúmero de organismos, como es el caso de los hongos [14]. Por lo general, se desarrollan en ambientes con humedad relativa de 74 % a 80 % y temperaturas que van de los 23 °C a los 28 °C [15], los cuales, se encuentran dentro del rango de humedad identificado en el invernadero micro tipo túnel de 72 % y 25 °C en promedio. Lo anterior evidenció que el manejo fitosanitario de las plantas madre antes de realizar los ensayos de establecimiento *in vitro* es de suma importancia.

Establecimiento in vitro de nudos y ápices tomados de plantas provenientes de invernadero, mantenidas fuera del túnel. Dado los resultados identificados en el ensayo del material vegetal provenientes del micro túnel, se resolvió emplear un manejo fitosanitario y colocar las plantas en temperatura ambiente, dicho proceso evidenció mejoras en el establecimiento del protocolo.

Al evaluar el efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % i.a. + tween al 0,1 % por 20 min (D5) y cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,2 % p/v por 5 min con bomba de vacío (D6) sobre los explantes (ápices o nudos) mantenidas fuera del invernadero micro túnel, se obtuvo una diferencia estadística significativa en cada una de las variables evaluadas ($P \leq 0,05$) (Cuadro 4). Ambas metodologías mostraron ser eficientes en la eliminación de patógenos, obteniéndose porcentajes muy bajos de contaminación, inferiores al 13 % (Cuadro 4). Estos bajos porcentajes, permitieron

la obtención de altos porcentajes de establecimiento de nudos y ápices. Para el caso de los nudos, se encontró una diferencia estadística significativa ($p = 0,05$) entre ambas metodologías respecto al porcentaje de establecimiento, siendo la metodología con del hipoclorito de sodio (NaClO) con la que se obtiene mayor porcentaje de establecidos en condiciones *in vitro* (85%) (Fig 2A). Para el caso de los ápices, no se encontró diferencia estadística significativa entre ambas metodologías respecto al porcentaje de establecimiento, la cual alcanzó porcentajes altos de nudos establecidos en condiciones *in vitro* entre un 98 % y 100 % (Cuadro 4). Sin embargo, se observó que los ápices tratados con la metodología de desinfección que incluía cloruro de mercurio (HgCl_2) (Figura 2B), presentaron mejor apariencia.

Cuadro 4. Establecimiento en condiciones *in vitro* de nudos y ápices provenientes de plantas mantenidas fuera del invernadero micro túnel, luego de 35 días de cultivo *in vitro*.

Table 4. Establishment under *in vitro* conditions of nodes and tips from plants kept outside the tunnel-type mini-greenhouse, after 28 days of *in vitro* culture.

Explante	Desinfección*	Contaminación			Mortalidad (%)	Explantos Establecidos (%)
		Hongos (%)	Bacteria (%)	Ambos (%)**		
Nudos	D5	3,42 ^b	5,98 ^a	2,56 ^b	2,56	85,47 ^b
	D6	13,00 ^a	4,07 ^{ab}	8,94 ^a	1,63	72,36 ^c
Ápices	D5	1,67 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00	98,33 ^a
	D6	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00	100 ^a

Si las letras son distintas, es que hay diferencias significativas $p < 0.05$.

*D5: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % i.a. por 20 min, D6: cloruro de mercurio (HgCl_2) al 0,2 % p/v por 5 min con bomba. Prueba Fisher con un 95% de confianza.

* * En la variable ambos se deben considerar los explantes contaminados tanto por bacteria como por hongo.

Según lo expuesto por los autores Kasthuriengan et al [6], se logró una introducción exitosa de cenízaro con nudos provenientes de una planta madre de 20 años de edad, aplicando el hipoclorito de sodio (NaClO) al 5,25 % durante 15 min. Por otra parte, Valverde et al [7], lograron un establecimiento usando como material semillas e hipoclorito de sodio al 5,5 %. Lo anterior confirma los resultados obtenidos, ya que se ha demostrado en trabajos previos, que el hipoclorito de sodio (NaClO) funciona exitosamente en el establecimiento *in vitro* de la especie de *S. saman*, probablemente debido a ser un material de bajo costo y alta efectividad.

A diferencia de los estudios anteriores reportados para *S. saman*, se utilizó material vegetal germinado en invernadero, el cual, permite el establecimiento de material vegetal y su posterior multiplicación a través del tiempo. Además, uno de los hallazgos de esta investigación, es que se demostró que el uso de cloruro de mercurio (HgCl₂) es un método novedoso para la especie.

Asimismo, en el presente estudio se observó una mayor contaminación por nudos en comparación con los ápices. Araya [16], encontró resultados similares para *Alnus acuminata* (Jaúl), donde los ápices obtuvieron una menor contaminación, cuyo porcentaje de contaminación no fue mayor al 45 %. En su estudio utilizó 4 concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO): 0,5 %, 1,0 %, 2,5 % y 5,0 %.

De esta manera, considerando que los ápices son estructuras juveniles y de crecimiento continuo, se dificulta a los agentes contaminantes almacenarse en el interior de dichos tejidos. Tal y como lo indica Araya [16], los ápices son zonas de crecimiento activo, lo que hace que tanto los hongos como las bacterias se localizan en los primordios externos, que son precisamente los que se eliminan durante los procesos de desinfección y disección.

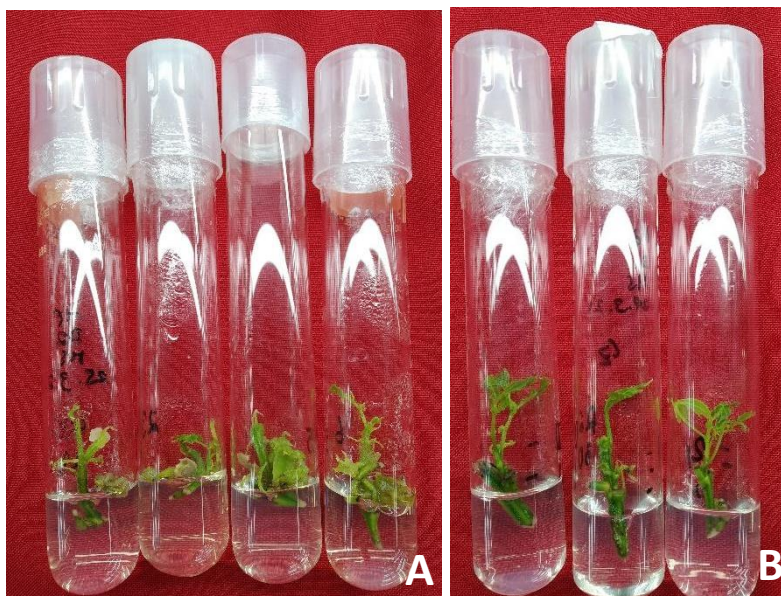


Figura 2. Nudos (A) y ápices (B) establecidos en condiciones *in vitro*.

Figure 2. Nodes (A) and tips (B) established under *in vitro* conditions.

Evaluación de efecto de medio de cultivo y su inducción de brotes en segmentos nodales. De acuerdo con el Cuadro 5, se observa una diferencia significativa entre los dos medios de cultivo, demostrando un mejor desarrollo para MS tanto para la variable brotación de nudos (51,67 %) como para la longitud del brote (0,32 cm). En términos de apariencia, el WPM presentó mayor cantidad explantes de color marrón en comparación con el cultivo MS. Según los autores Azofeifa [17] y Vílchez, et al. [18], el oscurecimiento de tejidos es con frecuencia más pronunciado en un tipo de medio de cultivo que en otro, lo cual puede ser causado por el uso inapropiado de alguno de los nutrientes empleados en el medio.

La media de brotes por explante con la formulación sin la incorporación de ningún tipo de concentraciones de hormonas fue de 51,67 % para el mejor caso. Mientras que lo expuesto por los autores Kasthuriengan et al [6], donde utilizaron diversas concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BA), Ácido giberélico (GA₃) alcanzando para el mejor caso 12,5 brotes por explante en MS y 7,5 en WPM; asimismo, dichos autores confirman que la especie tiene un óptimo desarrollo en el medio de cultivo MS.

Por el contrario, un resultado diferente de otros estudios de especies leñosas donde es mejor el WPM, se presenta en Campos et al [18], donde registraron en su investigación ser más eficiente el medio WPM para el cultivo in vitro de *Swietenia macrophylla* King (caoba), el cual permitió obtener las tasas más altas respecto a la variable número de hojas, longitud y número de brotes. Además, Vílchez, et al. [19], obtuvo una mejor respuesta para el medio WPM en comparación con MS en las variables evaluadas: número de nudos, número de brotes y longitud de brotes, para la especie *Psidium guajava* (guayaba).

En el estudio se evidenció, un óptimo desarrollo de *S. saman* en un medio más que en otro, esto se puede deber a que, el medio MS posee mayores concentraciones NH_4^+ y CaCl_2 en comparación con WPM [6], asimismo, Vengadesan et al. [20] menciona que la concentración iónica es relativamente baja para el medio WPM por lo que, puede afectar en la formación y crecimiento de brotes. Resultados similares fueron obtenidos en otras especies leguminosas *Acacia sinuata* [20] y *Pterocarpus marsupium* [21]. Lo anterior, sugiere que el medio MS favorece en la brotación de especies arbóreas leguminosas.

Cuadro 5. Efecto del medio de cultivo sobre la inducción de brotes en nudos de *S. saman* establecidos en condiciones in vitro, luego de 35 días de cultivo.

Table 5. Effect of the culture medium on the induction of shoots in *S. saman* nodes established under in vitro conditions, after 35 days of culture.

Medio de cultivo	Brotación (%)	Longitud del brote (cm)	Media de brotes por explante
MS	51,67 ^a	0,32 ^a	1 ^a
WPM	34,17 ^b	0,16 ^b	0 ^b

Si las letras son distintas, es que hay diferencias significativas $p < 0.05$.

Conclusiones

En la presente investigación para la especie de *S. saman*, los resultados indicaron que para el segundo ensayo (D5 y D6) los tratamientos evaluados presentaron menor porcentaje de contaminación a diferencia del primer ensayo (D1-D4). Evidenciando la importancia del manejo y condiciones ambientales del material vegetal.

Para el establecimiento *in vitro* de la especie la metodología con solución en agitación de hipoclorito de sodio (NaClO) 1 % i.a.+ tween al 0,1 % por 20 minutos se obtiene mayor porcentaje de nudos establecidos en condiciones *in vitro* (85%). Sin embargo, se observó que los ápices tratados con la metodología de desinfección que incluía solución de cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,2 % p/v por 5 minutos con bomba de vacío, presentaron mejor apariencia (100%), demostrando que el uso de cloruro de mercurio es un método novedoso para la especie, siendo uno de los principales hallazgos de la investigación. Ambas metodologías mostraron ser eficientes en la eliminación de patógenos ya que, se obtuvieron porcentajes bajos contaminación.

Asimismo, el tipo de medio de cultivo influyó en la multiplicación y longitud de brotes de *S. saman* logró mejores resultados para MS, resultados similares para especies leguminosas se reportaron. Demostrando que la especie tiene un óptimo desarrollo en ese medio de cultivo en comparación con otras especies leñosas donde es mejor el WPM.

Recomendaciones

Para asegurar un mayor porcentaje de explantes establecidos, se recomienda mantener las plantas fuera de invernadero con un control fitosanitario riguroso, Además, de realizar la introducción en época seca y, de esta manera, evitar la proliferación de agentes contaminantes comunes en ambientes húmedos.

Referencias

- [1] J. Reed, J. van Vianen, S. Foli, J. Clendenning, K. Yang, M. MacDonald, G. Petrokofsky, C. Padoch, y T. Sunderland, "Trees for life: The ecosystem service contribution of trees to food production and livelihoods in the tropics". *Forest Policy and Economics*, vol. 84, pp. 62–71, 2017, November 2017. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2017.01.012>
- [2] E. Moravi, Cuidemos nuestra propiedad y el valor de nuestros bosques con buenas prácticas en los contratos madereros. Manual de herramientas II, CATIE, 2014.
- [3] R. Quesada, "Consideraciones silviculturales de ocho especies forestales con poblaciones reducidas o en peligro de extinción en la provincia de Guanacaste", *Revista Foresta Mesoamericana Kúru*, vol. 1, no. 1, pp. 1-15, 2004.
- [4] O. Murillo y V. Guevara, "Estado de los recursos genéticos forestales de Costa Rica", MINAET/FAO/CONAGEBIO, 2012. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-be886s.pdf>
- [5] J. Scherer, L. Silveira, B. Gomes, C. Peiche y A. Vasconcelos," Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub)", *Ciencias Forestales*, Santa Maria, vol.16, no.4, pp. 381-390, 2006. <https://doi.org/10.5902/198050981919>
- [6] S. Kasthuriengan, Y.K. Fong, Y. Hong, L. Xie, y C.H. Li, "In vitro propagation and assessment of genetic stability of micropropagated *Samanea saman* (rain tree) using microsatellite markers", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 35, no.8, pp. 2467–2474, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1281-2>
- [7] L. Valverde, M. Dufour, y V. Villalobos, "In vitro Propagation of *Pithecellobium saman* (cenízaro)", *In Vitro cellular & Developmental Biology. Plant*, vol. 33, no.1, pp. 38-42, 1997. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0038-2>

- [8] A. Hine, A. Rojas y M. Daquinta, “Establecimiento in vitro de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (amarillón) y *Vochysia allenii* (botarrama blanco)”, *Revista Colombiana Biotecnología*, vol.15, no. 2, pp.180-186, 2014. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47240>
- [9] T. Murashige y F. Skoog,” Un medio revisado para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivo de tejido de tabaco. *Physiologia plantarum*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [10] B.M. Panda, U.J. Mehta, y S. Hazra, (2016). “Micropropagation of *Semecarpus anacardium* L. from mature tree-derived nodal explants”, *Plant Biosystems*, vol. 150, no.5, pp. 942–952, 2016. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.993741>
- [11] J. Kanwar, S. Godara, M.K. Kaul y A.K. Srivastava, (2013). “Micro Propagation of Carrizo (*Citrus Carrizo*) through Mature Bud Culture”, *Agricultural Science Digest*, vol.33, no.2, pp. 109–113, 2013.
- [12] A. Villegas, Métodos asépticos. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO, 1990.
- [13] A. Hine y A. Abdelnour, “Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L)”, *Revista Tecnología en marcha*, vol.26, no.4, pp. 64-71, 2013. <https://doi.org/10.18845/tm.v26i4.1584>
- [14] G. Araque, “Evaluación in vitro de cepas nativas de hongos filamentosos como agentes controladores de *Phytophthora infestans*”, Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2014.
- [15] H. Benaouali, N.Hamini, A.Bouras, S.Benichou, M.Kihal y J.Henni, “Isolation, pathogenicity test and physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*”, *Advances in Environmental Biology*, vol.8, no.10, pp.36-49, 2017.
- [16] E. Araya, “Establecimiento y multiplicación in vitro de jaúl (*Alnus acuminata*)”, Tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2000.

- [17] A. Azofeifa, (2009). "Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro", *Agronomía Mesoamericana*, vol.20, no.1, pp.153-175, 2009. ISSN: 1021-7444
- [18] J. Campos, M. Arteaga, S. Campos, J. Chico y L. Cerna, "Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de "caoba" *Swietenia macrophylla King* (Meliaceae)", *Arnaldoa*, vol. 27, no.1, pp. e86-e94, 2020. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>
- [19] J. Vílchez, L. Martínez, C. Álvarez, A. Albornoz, N. Albany, M. Molina y L. García, (2014). "Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación in vitro *Psidium guajava*", *Bioteología Vegetal*, vol.14, no.1, pp. 15-20, 2014. ISSN 2074-8647
- [20] G. Vengadesan, A. Ganapathi, R. Pream Anand y N. Salvaraj. "In vitro propagation of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. From nodal segments of a 10 years old tree", *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, vol 39, no.4, pp 409-414, 2003. doi:10.1079/IVP2003421
- [21] M.K. Husain, M. Anis y A. Shahzad. "In vitro propagation of multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants", *Acta Physiologiae Plantarum*", vol 30, no.3, pp 353-359, 2008. Doi: 10.1007/s11738-007-0130-6