



UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES

Multiplicación *in vitro* de material seleccionado de cenízaro (*Samanea saman* Jacq.) como alternativa para la producción de material vegetal de alta calidad

Trabajo de graduación bajo la modalidad de artículo científico para optar por el grado de
Licenciatura en Ingeniería en Ciencias Forestales con Énfasis en Manejo Forestal

Presentado por
Karol Carrillo Oporto

Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica
2023

Multiplicación *in vitro* de material seleccionado de cenízaro (*Samanea saman* Jacq.) como alternativa para la producción de material vegetal de alta calidad

Trabajo de graduación bajo la modalidad de artículo científico para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería en Ciencias Forestales con Énfasis en Manejo Forestal

Miembros del tribunal examinador:

M.Sc. Douglas Barraza Ruíz
Representante Decano Facultad de Ciencias
de la Tierra y el Mar

MGCI. Nancy Zamora Cervantes
Representante de la Dirección
EDECA

M.Sc. Laura Sánchez Calvo
Tutora del trabajo

Ph.D. William Hernández Castro
Lector del trabajo

Ph.D. Ana Hine Gómez
Lectora del trabajo

Bach. Karol Carrillo Oporto
Postulante del trabajo

Multiplicación *in vitro* de material seleccionado de cenízaro (*Samanea saman* Jacq.) como alternativa para la producción de material vegetal de alta calidad

***In vitro* multiplication of selected material of cenízaro (*Samanea saman* Jacq.) as an alternative for the production of high-quality plant material**

Karol Carrillo-Oporto¹, Laura Sánchez-Calvo², Ana Hine-Gómez³, William Hernández-Castro⁴

Resumen

[Introducción]: *Samanea saman* es una especie forestal nativa de Costa Rica, valorada por su madera en diversos mercados y sus beneficios en sistemas silvopastoriles; sin embargo, la extracción ilegal de árboles en los bosques está generando la degradación de estas poblaciones. Para contrarrestar esta presión sobre los bosques, las técnicas de cultivo *in vitro* se han convertido en una herramienta para proporcionar material vegetal de calidad para el establecimiento de plantaciones forestales. **[Objetivo]:** Desarrollar un protocolo de multiplicación *in vitro* de material seleccionado de cenízaro (*Samanea saman* Jacq.) para un programa de mejoramiento genético y conservación de germoplasma en Costa Rica. **[Metodología]:** Para la introducción de segmentos nodales y ápices, se usaron metodologías con hipoclorito de sodio y cloruro de mercurio (II) como agentes desinfectantes. Para el desarrollo de los brotes subcultivados, se evaluaron las condiciones físicas y químicas por medio de la adición suplementos, las sales de los medios de cultivo, el fotoperiodo, el tipo de recipiente, agentes gelificantes y el nivel de intercambio gaseoso. Para la multiplicación *in vitro* se evaluaron las citoquininas BAP, KIN y 2-ip en 4 concentraciones en medio de cultivo WPM. **[Resultados]:** Se estableció un 85% de segmentos nodales, mediante la desinfección con cloruro de mercurio (II) al 0.2 % por 5 minutos, durante la época seca. Por otro lado, la mejor calidad de brotes se obtuvo al cultivarlos en el medio de cultivo WPM suplementado con 4 gL⁻¹ de Phytigel® en frascos. La incorporación de citoquininas en las concentraciones evaluadas no evidenció un aumento en la brotación de los nudos. **[Conclusiones]:** Tras introducir material sin contaminación, es necesario identificar las condiciones físicas y químicas que favorezcan el crecimiento ideal de los brotes establecidos, con el propósito de continuar con el protocolo de multiplicando *in vitro*.

Palabras claves: *Samanea saman*; desinfección; citoquininas; brotes; desarrollo *in vitro*

Abstract

[Introduction]: *Samanea saman* is a native forest species of Costa Rica, valued for its timber in various markets and its benefits in silvopastoral systems; however, the illegal extraction of trees in forests generates the degradation of populations. To counteract this pressure on forests, *in vitro* culture techniques have become a tool to provide quality plant material for the establishment of forest plantations. **[Objective]:** To develop a protocol for *in vitro* multiplication of selected

¹ Ingeniera en ciencias forestales, Universidad Nacional (UNA), Costa Rica. karol.carrillo.oporto@hotmail.com; <https://orcid.org/0009-0003-8425-2562>

² Investigadora del Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional (UNA), Costa Rica. laura.sanchez.calvo@una.cr

³ Investigadora y docente del Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional (UNA), Costa Rica. ana.hine.gomez@una.ac.cr; <https://orcid.org/0000-0002-7226-2275>

⁴ Investigador y docente del Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional (UNA), Costa Rica. william.hernandez.castro@una.cr

cenizaro (*Samanea saman* Jacq.) material for a genetic improvement and germplasm conservation program in Costa Rica. **[Methodology]**: Methodologies with sodium hypochlorite and mercury (II) chloride as disinfectant agents were used for the introduction of nodal segments and apices. For the development of subcultured shoots, physical and chemical conditions were evaluated by adding supplements, salts in the culture media, photoperiod, type of container, gelling agents, and the level of gas exchange. For *in vitro* multiplication, BAP, KIN, and 2-iP cytokinins were evaluated at 4 concentrations in a WPM culture medium. **[Results]**: 85 % of nodal segments were established by disinfection with 0.2 % mercuric chloride (II) for 5 min, during the dry season. The best quality of shoots was obtained by growing them in a WPM culture medium supplemented with 4 gL⁻¹ of Phytigel® in flasks. The incorporation of cytokinins at the concentrations evaluated did not evidence an increase in the sprouting of the nodes. **[Conclusions]**: After introducing uncontaminated material, it is necessary to identify the physical and chemical conditions that favor the ideal growth of established shoots, with the purpose of continuing with the *in vitro* multiplying protocol.

Keywords: *Samanea saman*; disinfection; cytokinins; sprouts; *in vitro* development.

1. Introducción

La cobertura boscosa en Costa Rica es del 52,4%, según el último inventario forestal en el 2013; por lo tanto, para asegurar la conservación de estos bosques, se ha implementado el manejo forestal sostenible, la cual es una estrategia que permite aprovechar los recursos forestales sin comprometer su estructura ni diversidad (Barquero y Hernández, 2015). Sin embargo, debido a razones administrativas y políticas, la extracción de especies nativas está casi prohibida, lo que ha dado lugar a la extracción ilegal y a la degradación genética del ecosistema. Debido a lo anterior, se da la disminución de la variabilidad al reducirse el intercambio genético entre individuos por el descenso de sus poblaciones (Molina, 2018; Solano *et al.*, 2018). Con este panorama, a largo plazo se pueden manifestar dificultades para obtener material con calidad genética para la producción de madera comercial.

Así pues, una alternativa para reducir la extracción de especies forestales comerciales de los bosques es establecer plantaciones forestales o sistemas agroforestales utilizando clones con calidad genética obtenidos mediante técnicas de multiplicación *in vitro* (Abdelnour *et al.*, 2012). Esta herramienta biotecnológica permite una reproducción masiva de individuos genéticamente idénticos en poco tiempo y contribuye a los programas de mejoramiento genético (Indacochea, 2017). Asimismo, según Rayas *et al.* (2019), se puede crear un banco de germoplasma con el material multiplicado, el cual servirá como fuente de variación genética útil en el futuro para contrarrestar la pérdida de diversidad.

Ahora bien, el desarrollo de las tecnologías de propagación *in vitro* en Costa Rica ha proporcionado avances significativos en la clonación de especies forestales comerciales usadas a nivel nacional; por ejemplo, la propagación de clones de teca (*Tectona grandis*) y melina (*Gmelina arborea*) para la reforestación nacional (Murillo y Guevara, 2013). Debido a ello, es importante de mejorar los protocolos para la multiplicación *in vitro* de especies nativas, las cuales tienen gran potencial para el desarrollo comercial en el establecimiento de plantaciones forestales (Murillo y Guevara, 2013). Un ejemplo de ello es el cenízaro (*Samanea saman*) que es nativo de Costa Rica y está altamente valorado por su madera en la construcción, fabricación de muebles e implementación en sistemas silvopastoriles (Zamora, 2004). Esta especie es considerada gourmet y cuenta con una amplia distribución natural. Asimismo, es una de las prioritarias a mejorar para competir en términos de

calidad de la madera con las especies exóticas (Murillo-Gamboa, 2018), lo cual resalta la necesidad de mejorar los paquetes tecnológicos para el cenízaro y proveer material vegetal con calidad genética para su reforestación comercial.

Aunado a lo anterior, es necesario mejorar la multiplicación de la especie *Samanea saman* de forma asexual en condiciones *in vitro*. Debido a las escasas investigaciones previas en el ámbito nacional e internacional, debe realizarse un protocolo para la reproducción de árboles con características genéticas deseables previamente evaluados por medio de ensayos de progenies en campo.

De esta manera, el objetivo de la investigación fue desarrollar un protocolo de multiplicación *in vitro* de material seleccionado de cenízaro (*Samanea saman* Jacq.) para un programa de mejoramiento genético y conservación de germoplasma en Costa Rica.

2. Metodología

2.1. Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Forestal del Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (INISEFOR), ubicado en Santa Lucía de Barva, en Heredia, Costa Rica. Se empleó material vegetativo de plantas de *S. saman* de 10 meses, germinadas en invernadero, provenientes de la colección de semillas de 8 procedencias del proyecto denominado “Bases para el Mejoramiento Genético y Conservación de germoplasma de Cenízaro (*Samanea saman*) en Costa Rica”, el cual se encuentra adscrito al INISEFOR.

2.2 Mantenimiento de plantas madre en condiciones de invernadero

Las plantas donadoras se conservaron en condiciones de invernadero con riego automático por aspersión durante 5 minutos, 3 veces al día. Como fase preparativa, fueron tratadas mediante la aplicación de una solución de 5 gL⁻¹ de Kasugamicina®, una vez por semana, para disminuir la carga microbiana.

2.3 Condiciones experimentales

En todos los experimentos, el medio de cultivo fue ajustado a un pH 5.7 y esterilizado en la autoclave (21 °C, 15 lb. Presión) durante 25 min (Rojas y Hine, 2019). Posteriormente, todos los explantes fueron cultivados bajo condiciones de asepsia dentro de la cámara de flujo laminar.

Asimismo, los ensayos y el banco de explantes se almacenaron en el cuarto de crecimiento en condiciones controladas, con una intensidad lumínica de 24.2 μmol m⁻² s⁻¹ generados por tubos fluorescentes de luz blanca durante 16 horas y 8 horas oscuridad a una temperatura de 25 °C. Así pues, este fue el lugar donde se realizaron los monitoreos a las diversas variables de estudio.

2.4 Fase de establecimiento *in vitro*

Ahora bien, se introdujeron en condiciones *in vitro* 2 tipos de explantes: el ápice y el segmento nodal, el cual está constituido por la última y penúltima yema axilar de las plantas. Para la desinfección del material, se colectaron los explantes en el invernadero y se trasladaron al laboratorio; así pues, en primer lugar, estos se mantuvieron bajo el flujo de agua constante durante 30 min, después se sumergieron en una solución de agua y jabón líquido Antibacterial Bactex® (Punto Rojo S.A) al 1.0% durante 10 min en agitación para eliminar los contaminantes adheridos superficialmente, luego se lavaron con abundante agua (Hine-Gómez *et al.*, 2014). Posteriormente,

para la introducción *in vitro*, se continuó con 2 metodologías de desinfección establecidas por Valverde *et al.* (1997) y Hine-Gómez *et al.* (2014), las cuales adaptadas para la especie por Corrales-Torres (2022). Dichas metodologías se describen a continuación:

Desinfección I: Los explantes se sumergieron en una solución de 5 mL⁻¹ de Kasugamicina® durante 30 min en agitación. Seguidamente, en la cámara de flujo laminar, las estacas se desinfectaron con una solución al 1.0% (i.a) hipoclorito de sodio (NaClO) y 0.1% de Tween 80 en agitación durante 20 minutos. Una vez concluido este tiempo, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para asegurar la eliminación del químico.

Desinfección II: Las estacas se sumergieron en una solución de cloruro de mercurio (II) (HgCl₂) al 0.2% durante 5 minutos en una bomba de vacío. Una vez concluido este tiempo, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para asegurar la eliminación del químico.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección empleados para el establecimiento *in vitro* de explantes de *S. saman*

Table 1. Disinfection treatments used for *in vitro* establishment of *S. saman* explants.

Tratamiento	Desinfección	Explante	Nº de Explantes
D1	Desinfección I: Kasugamicina® e hipoclorito de sodio	Ápice	35
D2	Desinfección I: Kasugamicina® e hipoclorito de sodio	Nudo	35
D3	Desinfección II: Cloruro de mercurio (II)	Ápice	35
D4	Desinfección II: Cloruro de mercurio (II)	Nudo	35

Así pues, el ensayo se realizó con 3 réplicas, lo que implicó la introducción de 420 explantes en total. Dichos explantes se sembraron en el medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se complementó con 3% de sacarosa, 3 gL⁻¹ de gelificante y 0.5 gL⁻¹ de caseína. Asimismo, las variables medidas fueron los explantes contaminados (%) (hongo y/o bacteria), los explantes necrosados (%) y los explantes vivos sin contaminación (%). Finalmente, las evaluaciones se realizaron semanalmente durante un periodo de 5 semanas.

De igual manera, se realizaron en total 5 ensayos (lotes) en diferentes momentos para evaluar las desinfecciones durante la época lluviosa. El diseño experimental consistió en 35 unidades * 3 réplicas * 5 repeticiones (lotes), para tener una muestra (n) de 15 como producto promedio de las réplicas para cada tratamiento. Dicho diseño se dio con el fin de realizar un análisis estadístico.

Una vez validada la metodología de desinfección, se procedió a evaluar la metodología de desinfección II que utilizó HgCl₂. Como se muestra en el **Cuadro 2**, se incrementó el tiempo de exposición de los explantes al agua estéril (D5 y D6) para estudiar el daño al tejido vegetal causado por el agente desinfectante. De esta forma, se realizaron 2 ensayos (lotes) para este propósito, durante la época seca. El diseño experimental fue de 35 unidades * 3 réplicas * 2 repeticiones (lotes).

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección con HgCl₂ empleados para el establecimiento *in vitro* de explantes de *S. saman* después de la validación de la metodología de desinfección.

Table 2. HgCl₂ disinfection treatments used for *in vitro* establishment of *S. saman* explants after validation of the disinfection methodology.

Tratamiento	Desinfección	Explante	Nº de Explantes
D3	Desinfección II: Cloruro de mercurio (II)	Ápice	35
D4	Desinfección II: Cloruro de mercurio (II)	Nudo	35
D5	Desinfección II: Cloruro de mercurio (II) + 1 hr de reposo en agua destilada estéril	Ápice	35
D6	Desinfección II: Cloruro de mercurio (II) + 1 hr de reposo en agua destilada estéril	Nudo	35

2.5 Fase de desarrollo *in vitro*

En esta fase, se evaluó la calidad y el desarrollo de los brotes subcultivados de la fase anterior, considerando variables químicas y condiciones físicas.

2.5.1 Adición de suplementos

Para esta fase, se establecieron 3 tratamientos (**Cuadro 3**) utilizando un medio de cultivo semisólido MS, el cual se complementó con 3% de sacarosa, 3 gL⁻¹ de gelificante y 0.5 gL⁻¹ de caseína. La unidad experimental fue un brote cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 mL de medio de cultivo. Asimismo, se utilizó un n=20 para cada tratamiento. Finalmente, se evaluó, a los 60 y 120 días, la longitud (cm) y la calidad usando una escala del 1 al 5, en donde 1 y 2 son brotes no aptos para seguir subcultivando; mientras que 3, 4 y 5 son considerados aceptables.

Cuadro 3. Tratamientos empleados con adición de suplementos al medio de cultivo para evaluar la calidad de brotes *in vitro* de *S. saman*.

Table 3. Treatments used with addition of supplements to the culture medium to evaluate the quality of *in vitro* shoots of *S. saman*.

Tratamiento	Suplemento	Concentración (gL ⁻¹)
M1 testigo	-	-
M2	Sequestrene	0.15
M3	Carbón activo	0.5

2.5.2 Composición basal y fotoperiodo

El ensayo consistió en usar 4 medios de cultivo semisólidos: MS (1962), QL (Quorin y Lepoivre, 1977), WPM (Woody Plant Medio) (Lloyd y McCown, 1980) y DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), complementados con 3% de sacarosa y 3 gL⁻¹ de gelificante. De esta manera, se establecieron 3 fotoperiodos: 16 horas de luz directa con 8 horas oscuridad; 16 horas de luz difusa con 8 horas oscuridad; 12 de horas luz directa con 12 horas oscuridad.

Cuadro 4. Tratamientos empleados para estudiar el efecto de las sales del medio de cultivo y la cantidad de iluminación en la calidad de los brotes de *S. saman*.

Table 4. Treatments used to study the effect of salts in the culture medium and the amount of illumination on the quality of *S. saman* shoots.

Tratamiento	Medio de cultivo	Fotoperiodo	Tratamiento	Medio de cultivo	Fotoperiodo
M4	QL	16/8	M10	WPM	16/8
M5	QL	12/12	M11	WPM	12/12
M6	QL	16/8 difusa	M12	WPM	16/8 difusa
M7	MS	16/8	M13	DKW	16/8
M8	MS	12/12	M14	DKW	12/12
M9	MS	16/8 difusa	M15	DKW	16/8 difusa

Así pues, la unidad experimental consistió en un brote, de 1.7 cm de longitud en promedio, cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 mL de medio de cultivo. Se utilizó un n=15 por tratamiento y se evaluó la calidad (escala de 1 al 5, previamente explicada), defoliación (%), longitud (cm) y mortalidad (%) a los 60 y 120 días.

2.5.3 Comparación medios basales MS y WPM con tipo de frasco

Para evaluar la calidad (escala de 1 al 5, previamente explicada) de los brotes, se utilizaron 2 medios de cultivo semisólidos (MS y WPM) y 2 tipos de recipientes: frasco de vidrio, con capacidad para 150 ml y con 25 mL de medio de cultivo, y tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 mL de medio, lo que genera 4 tratamientos (**Cuadro 5**) con un n=15 por tratamiento. Finalmente, se aireó manualmente en la cámara de flujo laminar cada 15 días y procedió a una evaluación a los 30 días

Cuadro 5. Tratamientos del ensayo preliminar para estudiar la calidad de brotes de *S. saman* en 2 medios de cultivo y 2 tipos frascos.

Table 5. Preliminary trial treatments to study the quality of *S. saman* shoots in 2 culture media and 2 types of flasks.

Tratamiento	Medio de cultivo	Recipiente
M16	WPM	Frasco
M17	MS	Frasco
M18	WPM	Tubo
M19	MS	Tubo

2.5.4 Agentes gelificantes e intercambio gaseoso

A partir de los resultados del ensayo anterior, se diseñó el experimento para evaluar el efecto de 2 agentes gelificantes (4 gL⁻¹ de Phytigel® y 10 gL⁻¹ de agar) con 3 niveles de intercambio gaseoso en el medio de cultivo semisólido WPM suplementado con 3% de sacarosa (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Tratamientos empleados para estudiar la calidad en brotes de *S. saman* de acuerdo a 2 tipos de gelificante y 3 niveles de aireación.

Table 6. Treatments used to study the quality of *S. saman* shoots according to 2 types of gelling agent and 3 levels of aeration.

Tratamiento	Gelificante	Nivel de aireación
M20	Agar	Tapa con filtro
M21	Agar	Manual*
M22	Agar	Sin aireación

M23	Phytigel®	Tapa con filtro
M24	Phytigel®	Manual*
M25	Phytigel®	Sin aireación

*El proceso implica introducir los frascos en la cámara de flujo laminar, retirar las tapas y exponerlos al flujo del aire contrario durante aproximadamente 1 minuto. Este procedimiento se llevó a cabo en intervalos de 15 días (J. Bello, comunicación personal, 20 de octubre de 2022).

La unidad experimental consistió en un brote seleccionado del banco establecido, cultivado en frasco de vidrio, con capacidad para 150 mL, con 25 mL de medio de cultivo. Para ello, se utilizó un n=20 por tratamiento. Las variables evaluadas fueron la calidad (escala de 1 al 5, previamente explicada), la diferencia (Δ) en la longitud (cm) (**Ecuación 1**), número de nudos y la diferencia (Δ) en el número de hojas (**Ecuación 2**). Se realizó una evaluación inicial y, transcurridos 30 días, se hizo una segunda evaluación del ensayo.

$$\Delta \text{ número de hojas} = \text{número de hojas final} - \text{número de hojas inicial} \quad (\text{E. 1})$$

$$\Delta \text{ longitud (cm)} = \text{longitud final} - \text{longitud inicial} \quad (\text{E. 2})$$

2.6 Fase de multiplicación

Para esta fase, se preparó a partir del medio de cultivo semisólido WPM complementado con 3 % de sacarosa y 4 gL⁻¹ de Phytigel® como agente gelificante. Asimismo, para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento, se emplearon las citoquininas bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) y isopentiladenina (2-iP) en 4 concentraciones (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹).

El ensayo constó de 10 tratamientos (**Cuadro 7**) con un diseño al azar en 3 réplicas. Así pues, cada tratamiento, se conformó con 10 nudos introducidos en condiciones *in vitro*. La unidad experimental fue un segmento nodal entre 0.5-1.0 cm de longitud con 1 o 2 nudos, el cual fue cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 mL de medio de cultivo.

Finalmente, se evaluó el número de brotes, longitud del brote más largo (cm), número de nudos del brote más largo, calidad de brote más largo (escala de 1 al 5, previamente explicada), presencia de callo (escala de 0 al 3, donde 0 significa ausencia y 3 abundancia de callo) y número de brotes no desarrollados. Posteriormente, se realizó una evaluación a los 30 días.

Cuadro 7. Diseño de los tratamientos con citoquininas para estudiar la brotación en nudos de *S. saman*.

Table 7. Design of cytokinin treatments to study sprouting in *S. saman* knots.

Tratamiento	Citoquinina	Concentración (mgL ⁻¹)
T1 Control	-	0.0
T2	BAP	0.5
T3	BAP	1.0
T4	BAP	1.5
T5	2-ip	0.5
T6	2-ip	1.0
T7	2-ip	1.5
T8	KIN	0.5
T9	KIN	1.0
T10	KIN	1.5

2.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos, se llevó a cabo la verificación de los supuestos estadísticos de las variables mediante la prueba de normalidad de residuos utilizando a Shapiro Wilk, Kolmogorov Smirnov y Anderson Darling, la prueba de homocedasticidad empleando a Levene y, finalmente, la prueba de aleatoriedad. Estas 3 pruebas sí se cumplieron y las diferencias entre los tratamientos se determinaron utilizando un análisis estadístico paramétrico con ANOVA. Por un lado, en caso de encontrar diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Por el otro lado, en situaciones donde los supuestos estadísticos no se cumplieron, se usó el Modelo Lineal General. Finalmente, el procesamiento de los datos se realizó utilizando el software estadístico Minitab 19 (Minitab Inc. 2019).

3. Resultados

3.1 Fase de establecimiento *in vitro*

El mayor porcentaje de desinfección (hongo, bacteria y hongo/bacteria) fue de un 38%. Los ápices (D1 y D3) tendieron a una mayor mortalidad; sin embargo, no fue superior al tratamiento D4. Por lo tanto, el porcentaje de los explantes establecidos después de 35 días del cultivo osciló entre 13-21%, sin mostrar diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos (**Cuadro 8**).

En cuanto a la contaminación por hongos, esta fue superior al 52%, con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos D2 y D3. Esta situación demuestra que desinfectar ápices con $HgCl_2$ logró un porcentaje de desinfección por hongos mayor que al utilizar $NaClO$ en segmentos nodales, pero no se presentaron diferencias con el resto de los tratamientos.

Para la contaminación bacteriana, se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con $NaClO$ en ápices (D1) y las desinfecciones con $HgCl_2$ (D3-D4). Por un lado, el tratamiento D1 mostró mayor eficacia contra las bacterias. Con respecto a la relación contaminación por hongo/bacteria, el porcentaje fue inferior al 4%, sin diferencias significativas (**cuadro 8**).

Cuadro 8. Efecto de las desinfecciones en el establecimiento *in vitro* de 2 tipos de explantes de *S. saman* en época de lluvia, luego de 35 días de cultivo.

Table 8. Effect of disinfections on *in vitro* establishment of 2 types of *S. saman* explants in rainy season after 35 days of culture.

Tratamiento	Contaminación (%)			Mortalidad (%) p= 0.001	Sobrevivencia (%) p= 0.734
	Hongo p= 0.010	Bacteria p= 0.036	Hongo y bacteria p= 0.633		
D1	59 ^{ab}	2 ^b	3 ^a	17 ^a	19 ^a
D2	78 ^a	3 ^{ab}	2 ^a	4 ^b	13 ^a
D3	52 ^b	7 ^a	3 ^a	17 ^a	21 ^a
D4	66 ^{ab}	6 ^a	4 ^a	7 ^{ab}	17 ^a

Medias con letra distinta para misma variable denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Desinfecciones: I- 5 mL⁻¹ de Kasugamicina® por 30 min, seguido de $NaClO$ al 1.0 % y 0.1% de Tween 80 en agitación durante 20 min, usando D1: Ápices y D2 Nudos; II- $HgCl_2$ al 0.2 % por 5 min en una bomba de vacío, usando D3: Ápices y D4: Nudos.

Ahora bien, dado que no se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia, se realizó un análisis estadístico por cada lote. En el lote 5, se presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia de los segmentos vegetales no contaminados, lo que muestra una mayor sobrevivencia en los segmentos nodales y ápices con los tratamientos que emplearon 0.2% de HgCl₂ para la introducción *in vitro*. Cabe mencionar que, para la introducción de explantes de este lote, la humedad relativa en el invernadero era menor debido a que los días de lluvia habían disminuido.

Por un lado, los tratamientos con HgCl₂ realizados durante la época seca lograron mayor porcentaje de establecimiento *in vitro* en comparación con los realizados en época lluviosa, lo cuales obtuvieron porcentajes de establecimiento de hasta un 85 % (**Cuadro 9**). De esta manera, se logró un porcentaje de desinfección (hongo, bacteria y hongo/bacteria) máximo de un 97%.

Por otro lado, en la mortalidad, se observó que los nudos evidenciaron menor afectación que los ápices en ambos tratamientos de desinfección, dando como resultado un porcentaje de sobrevivencia cercano al 85% en nudos para el establecimiento *in vitro* de *S. saman* (**Cuadro 9**). Además, no se evidenció un efecto provocado al aumentar el tiempo de exposición de los explantes al agua.

Cuadro 9. Efecto de las desinfecciones con HgCl₂ en el establecimiento *in vitro* de 2 tipos de explantes de *S. saman* en época seca, luego de 35 días de cultivo.

Table 9. Effect of HgCl₂ disinfections on *in vitro* establishment of 2 types of *S. saman* explants in dry season after 35 days of culture.

Tratamiento	Contaminación (%)			Mortalidad (%) p= 0.000	Sobrevivencia (%) p= 0.000
	Hongo p= 0.511	Bacteria p= 0.008	Hongo y bacteria p= 0.413		
D3	8 ^a	1 ^b	0 ^a	44 ^a	47 ^b
D4	9 ^a	4 ^{ab}	0 ^a	3 ^b	84 ^a
D5	3 ^a	0 ^b	0 ^a	46 ^a	51 ^b
D6	6 ^a	6 ^a	1 ^a	2 ^b	85 ^a

Medias con letra distinta para una misma variable denota diferencias estadísticamente significativas (p<0.05). Desinfecciones: I- HgCl₂ al 0.2 % por 5 min en una bomba de vacío, usando D3: Ápices y D4: Nudos; II- HgCl₂ al 0.2 % por 5 min en una bomba de vacío. Luego, 1 hora de reposo en agua destilada estéril, usando D5: Ápices y D6: Nudos.

3.2 Fase de desarrollo *in vitro*

3.2.1 Adición de suplementos

En términos generales, el análisis comparativo no mostró diferencias significativas con la adición de suplementos en el desarrollo de los brotes (**Cuadro 10**).

Cuadro 10. Efecto de la adición de suplementos en el desarrollo de brotes de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro*, luego de 60 días de cultivo.

Table 10. Effect of supplementation on the development of *S. saman* shoots established under *in vitro* conditions, after 60 days of culture.

Tratamiento	Suplemento	Longitud (cm) p= 0.043	Calidad p=0.392
-------------	------------	---------------------------	--------------------

M1 testigo	-	2.14 ± 0.93 ^a	3.00 ± 0.83 ^a
M2	Sequestrene (0.15 gL ⁻¹)	2.10 ± 0.85 ^a	3.04 ± 0.65 ^a
M3	Carbón activo (0.5 gL ⁻¹)	2.62 ± 1.04 ^a	2.81 ± 0.71 ^a

Medias con letra distinta para una misma variable denota diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

3.2.2 Composición basal y fotoperiodo

En cuanto a la evaluación de la longitud final, la única diferencia significativa (p<0.05) se presentó entre los tratamientos M9 y M15, lo que demostró que el medio de cultivo MS resultó ser más beneficioso para la elongación apical que el DKW (ambos en luz difusa); sin embargo, no difiere del resto de tratamientos.

En relación con la calidad de los brotes, solo se encontraron diferencias significativas (p<0.05) con el tratamiento M10 que presentó una calidad superior a los tratamientos M6, M12, M13 y M14 (**Cuadro 11**). Para las variables de defoliación y mortalidad, no se realizaron análisis estadísticos. Con respecto a la incidencia de la defoliación, los tratamientos M5, M7, M13 y M14 mostraron una tasa superior al 30%, mientras que la mortalidad se mantuvo por debajo del 15% (**Cuadro 12**).

Cuadro 11. Efecto de la composición basal de 4 medios de cultivo y 3 fotoperiodos en el desarrollo y crecimiento de brotes de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro* luego de 60 días.

Table 11. Effect of the basal composition of 4 culture media and 3 photoperiods on the development and growth of *S. saman* shoots established under *in vitro* conditions after 60 days.

Tratamiento	Fotoperiodo	Medio	Longitud (cm) p= 0.077	Calidad p= 0.016
M4	16/8	QL	1.86 ± 0.47 ^{ab}	2.08 ± 0.51 ^{ab}
M5	12/12	QL	1.75 ± 0.64 ^{ab}	2.36 ± 1.08 ^{ab}
M6	16/8 Difusa	QL	1.72 ± 0.31 ^{ab}	1.93 ± 0.26 ^b
M7	16/8	MS	1.59 ± 0.32 ^{ab}	2.00 ± 0.00 ^{ab}
M8	12/12	MS	1.81 ± 0.43 ^{ab}	2.00 ± 0.00 ^{ab}
M9	16/8 Difusa	MS	2.10 ± 0.72 ^a	2.00 ± 0.39 ^{ab}
M10	16/8	WPM	1.65 ± 0.47 ^{ab}	2.60 ± 0.74 ^a
M11	12/12	WPM	1.65 ± 0.41 ^{ab}	2.31 ± 0.48 ^{ab}
M12	16/8 Difusa	WPM	1.58 ± 0.33 ^{ab}	1.93 ± 0.48 ^b
M13	16/8	DKW	1.71 ± 0.44 ^{ab}	1.93 ± 0.46 ^b
M14	12/12	DKW	1.71 ± 0.45 ^{ab}	1.86 ± 0.36 ^b
M15	16/8 Difusa	DKW	1.41 ± 0.26 ^b	2.14 ± 0.36 ^{ab}

Medias con letra distinta para una misma variable denota diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) según Modelo Lineal General con comparaciones de Tukey con un 95% de confianza.

Cuadro 12. Comparación del porcentaje de defoliación y mortalidad de acuerdo con la composición basal de 4 medios de cultivo y 3 fotoperiodos en el desarrollo y crecimiento de brotes de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro* luego de 60 días.

Table 12. Comparison of the percentage of defoliation and mortality according to the basal composition of 4 culture media and 3 photoperiods in the development and growth of *S. saman* shoots established under *in vitro* conditions after 60 days.

Tratamiento	Fotoperiodo	Medio	Defoliación (%)	Mortalidad (%)
M4	16/8	QL	17	9
M5	12/12	QL	36	7
M6	16/8 Difusa	QL	0	7

M7	16/8	MS	30	0
M8	12/12	MS	23	0
M9	16/8 Difusa	MS	7	7
M10	16/8	WPM	20	0
M11	12/12	WPM	23	0
M12	16/8 Difusa	WPM	7	7
M13	16/8	DKW	47	0
M14	12/12	DKW	36	14
M15	16/8 Difusa	DKW	14	0

3.2.3 Ensayo comparación medios basales MS y WPM con tipo de frasco

Se determinó que los explantes cultivados en medio basal WPM en frasco, tuvieron una calidad significativamente superior en comparación a los demás tratamientos (**Cuadro 13**).

Cuadro 13. Evaluación preliminar del efecto de 2 medios de cultivo y 2 tipos frascos sobre la calidad de brotes de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro* luego de 30 días de cultivo.

Table 13. Preliminary evaluation of the effect of 2 culture media and 2 types of flasks on the quality of *S. saman* shoots established under *in vitro* conditions after 30 days of culture.

Tratamiento	Medio	Recipiente	Calidad p= 0.010
M16	WPM	Frasco	3.87 ± 1.07 ^a
M17	MS	Frasco	2.40 ± 1.24 ^b
M18	WPM	Tubo	2.67 ± 0.62 ^b
M19	MS	Tubo	2.60 ± 1.06 ^b

Medias y desviación estándar con letra distinta para una misma variable denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según Modelo Lineal General con comparaciones de Tukey con un 95% de confianza.

3.2.4 Agentes gelificantes e intercambio gaseoso

Para el análisis del agente gelificante y el intercambio gaseoso del recipiente de cultivo, no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos al aplicar un análisis de comparación de medias con un 95% de confianza. No obstante, al realizar las comparaciones entre los tratamientos con un 90% de confianza, se mostraron diferencias entre los gelificantes, entre los cuales Phytigel® fue el que contribuye a una mejor calidad de los brotes de cenízaro (**Cuadro 14**).

Cuadro 14. Efecto de 2 agentes gelificantes en 3 niveles de aireación sobre la calidad de brotes de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro* luego de 30 días de cultivo. Mediante el análisis estadístico al 95% y al 90% de confianza.

Table 14. Effect of 2 gelling agents at 3 levels of aeration on the quality of *S. saman* shoots established under *in vitro* conditions, after 30 days of cultivation. By the statistical analysis at 95% and 90% of confidence.

Variable de comparación	Factores	Calidad $\alpha=0.05$	Calidad $\alpha=0.10$
Gelificante p= 0.061	Agar	2.65 ± 0.80 ^a	2.65 ± 0.80 ^b
	Phytigel®	2.95 ± 0.91 ^a	2.95 ± 0.91 ^a
Aireación p= 0.793	Filtro	2.72 ± 0.78 ^a	2.72 ± 0.78 ^a
	Manual	2.85 ± 0.86 ^a	2.85 ± 0.86 ^a

		Sin airear	2.82 ± 0.96 ^a	2.82 ± 0.96 ^a
Gelificante * Aireación p= 0.793	M20: Agar + Filtro		2.50 ± 0.61 ^a	2.50 ± 0.61 ^a
	M21: Agar + Manual		2.75 ± 0.85 ^a	2.75 ± 0.85 ^a
	M22: Agar + Sin airear		2.70 ± 0.92 ^a	2.70 ± 0.92 ^a
	M23: Phytigel® + Filtro		2.95 ± 0.89 ^a	2.95 ± 0.89 ^a
	M24: Phytigel® + Manual		2.95 ± 0.89 ^a	2.95 ± 0.89 ^a
	M25: Phytigel® + Sin airear		2.95 ± 0.99 ^a	2.95 ± 0.99 ^a

Medias con letra distinta para una misma variable denota diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) según Modelo Lineal General con comparaciones de Tukey.

Pese a que el valor de p no mostró diferencias entre los porcentajes de confianza, en la **Figura 1** se muestra una distribución de frecuencias entre los tratamientos que catalogan las calidades 1 y 2 como no aceptables; mientras que las calidades 3, 4 y 5 son catalogadas como aceptables. Se evidenció que los tratamientos con Phytigel® (M23, M25 y M26) tienen la tendencia a desarrollar brotes con mejores calidades, lo cual responde al análisis estadístico con un 90% de confianza (**Figura 2**).

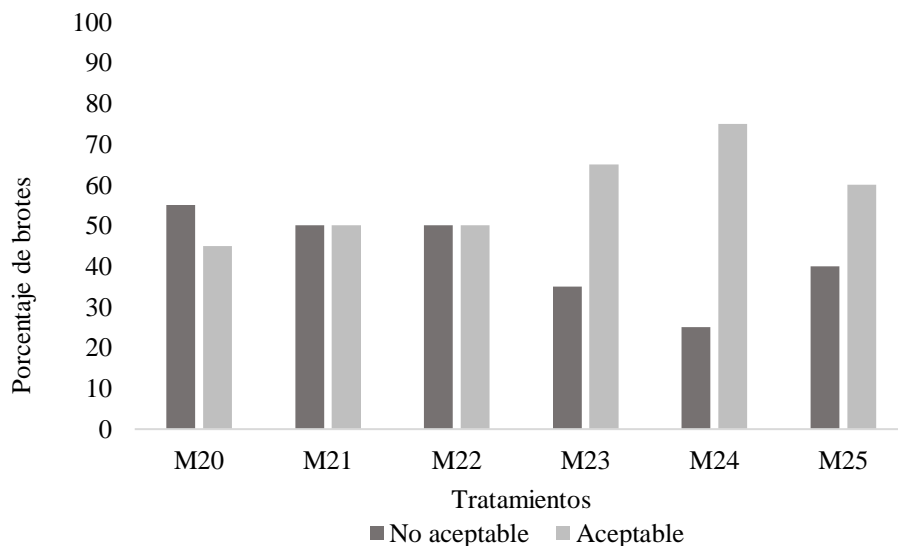


Figura 1. Distribución porcentual de los brotes de *S. saman* establecidos en condiciones in vitro según su calidad para ser Aceptable o No Aceptable para subcultivo, empleando tratamientos con 2 tipos de gelificantes y 3 niveles de aireación después de 30 días de cultivo. M20: Agar + Filtro. M21: Agar + Aireación manual. M22: Agar + Sin airear. M23: Phytigel® + Filtro. M24: Phytigel® + Aireación manual. M25: Phytigel® + Sin airear.

Figure 1. Percentage distribution of *S. saman* shoots established under in vitro conditions according to their quality to be Acceptable or Not Acceptable for subculture, using treatments with 2 types of gelling agents and 3 levels of aeration, after 30 days of culture. M20: Agar + Filter. M21: Agar + Manual aeration. M22: Agar + No aeration. M23: Phytigel® + Filter. M24: Phytigel® + Manual aeration. M25: Phytigel® + No aeration.

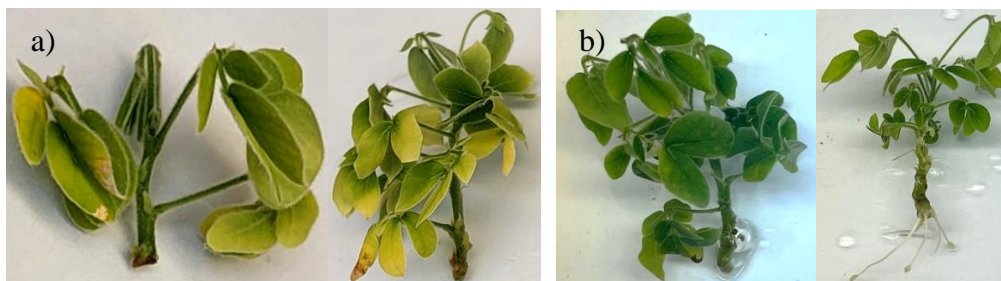


Figura 2. Evaluación cualitativa de brotes de *S. saman* considerados como aceptables después de 30 días. a) Tratamiento con agar, b) Tratamiento con Phytigel®.

Figure 2. Qualitative evaluation of *S. saman* shoots considered acceptable after 30 days. a) Agar treatment, b) Phytigel® treatment.

En las diferencias (Δ) que se obtuvieron transcurridos los 30 días de cultivo, en cuanto a la longitud y el número de hojas de los brotes, se determinó que los tratamientos con Phytigel® con las diferentes aireaciones (M23, M24 y M25) mostraron valores estadísticamente superiores que el tratamiento gelificado con agar en frascos con filtro (M20) (**Cuadro 15**).

Con respecto a la aireación, la única diferencia significativa fue el número de hojas, siendo la aireación manual y sin aireación mejores que con filtro (**Cuadro 15**). Cabe mencionar que, en los tratamientos con filtración, se observó una disminución en el volumen del medio de cultivo, principalmente el tratamiento con agar (M20) (**Figura 3a**).

Cuadro 15. Efecto de 2 agentes gelificantes en 3 niveles de aireación en la variación de la longitud, número de hojas y número de nudos de brotes de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro*, después de 30 días de cultivo.

Table 15. Effect of 2 gelling agents at 3 levels of aeration on the variation of length, number of leaves and number of nodes of *S. saman* shoots established under *in vitro* conditions, after 30 days of culture.

Factores	Δ Longitud (cm)	Δ Número de hojas	Δ Número de nudos
Gelificante	p= 0.011	p= 0.000	p= 0.955
Agar	0.16 \pm 0.26 ^b	-1.28 \pm 1.82 ^b	0.83 \pm 1.62 ^a
Phytigel®	0.30 \pm 0.32 ^a	0.55 \pm 1.64 ^a	0.82 \pm 1.64 ^a
Aireación	p= 0.133	p= 0.007	p= 0.834
Filtro	0.16 \pm 0.34 ^a	-1.02 \pm 2.17 ^b	0.78 \pm 1.83 ^a
Manual	0.29 \pm 0.29 ^a	0.18 \pm 1.71 ^a	0.95 \pm 1.78 ^a
Sin airear	0.24 \pm 0.23 ^a	-0.25 \pm 1.82 ^{ab}	0.75 \pm 1.21 ^a
Gelificante * Aireación	p= 0.126	p= 0.766	p= 0.063
M20: Agar + Filtro	0.03 \pm 0.11 ^b	-2.10 \pm 1.52 ^d	0.30 \pm 1.95 ^a
M21: Agar + Manual	0.22 \pm 0.34 ^{ab}	-0.65 \pm 1.76 ^{bc}	1.10 \pm 1.45 ^a
M22: Agar + Sin airear	0.24 \pm 0.22 ^{ab}	-1.10 \pm 1.94 ^{cd}	1.10 \pm 1.33 ^a
M23: Phytigel® + Filtro	0.30 \pm 0.44 ^a	0.05 \pm 2.21 ^{abc}	1.25 \pm 1.62 ^a
M24: Phytigel® + Manual	0.36 \pm 0.23 ^a	1.00 \pm 1.21 ^a	0.80 \pm 2.09 ^a
M25: Phytigel® + Sin airear	0.24 \pm 0.25 ^{ab}	0.60 \pm 1.23 ^{ab}	0.40 \pm 1.00 ^a

Δ con letra distinta para una misma variable denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según Modelo Lineal General con comparaciones de Tukey con un 95 % de confianza.

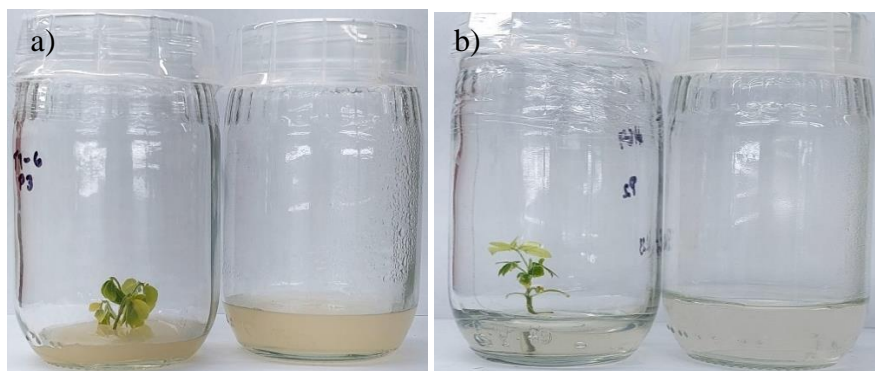


Figura 3. Efecto del uso de tapas con filtro en el medio de cultivo semisólido después de 30 días. a) Medio de cultivo WPM con agar. A la izquierda, se ubica el tratamiento con filtro. b) Medio de cultivo WPM con Phytigel®. A la izquierda, se ubica el tratamiento con filtro.

Figure 3. Effect of using filter lids on semisolid culture medium after 30 days. a) WPM culture medium with agar, filter treatment is located on the left. b) WPM culture medium with Phytigel®, filter treatment is located on the left.

3.3 Fase de multiplicación *in vitro*

Para la inducción de la brotación, no se encontraron diferencias significativas en el número de brotes al añadir alguna concentración de citoquinina al medio de cultivo con respecto al control (T1(sin hormonas)) (**Cuadro 16**). Así pues, se dio el mismo comportamiento en la longitud del brote, el número de nudos por brote y cantidad de brotes no desarrollados.

Cuadro 16. Efecto de 3 citoquininas en diferentes concentraciones sobre inducción de brotes y sus características físicas empleando nudos de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro*, además de la formación de callo después de 30 días de cultivo.

Table 16. Effect of 3 cytokinins at different concentrations on shoot induction and its physical characteristics using *S. saman* nodes established under *in vitro* conditions, in addition to callus formation after 30 days of culture.

Tratamiento	Nº de brotes p= 0.190	Longitud del brote (cm) p= 0.129	Nº de nudos del brote p= 0.064	Calidad del brote p= 0.011	Presencia de callo p= 0.002	Nº de brotes no desarrollados p= 0.341
T1	0.55 ± 0.27 ^a	0.26 ± 0.09 ^a	0.94 ± 0.11 ^a	1.50 ± 0.70 ^{ab}	0.06 ± 0.10 ^c	1.05 ± 0.26 ^a
T2	0.30 ± 0.52 ^a	0.13 ± 0.22 ^a	0.21 ± 0.37 ^a	0.30 ± 0.53 ^{ab}	1.70 ± 0.64 ^{ab}	0.79 ± 0.05 ^a
T3	0.26 ± 0.16 ^a	0.09 ± 0.08 ^a	0.21 ± 0.19 ^a	0.29 ± 0.26 ^{ab}	2.11 ± 0.67 ^{ab}	1.04 ± 0.44 ^a
T4	0.03 ± 0.05 ^a	0.03 ± 0.06 ^a	0.09 ± 0.16 ^a	0.09 ± 0.16 ^b	2.39 ± 0.15 ^a	0.74 ± 0.31 ^a
T5	0.53 ± 0.14 ^a	0.47 ± 0.26 ^a	1.43 ± 0.42 ^a	1.58 ± 0.58 ^a	1.09 ± 0.27 ^{abc}	0.62 ± 0.26 ^a
T6	0.12 ± 0.04 ^a	0.13 ± 0.04 ^a	0.38 ± 0.26 ^a	0.32 ± 0.08 ^{ab}	1.61 ± 0.75 ^{ab}	0.88 ± 0.23 ^a
T7	0.15 ± 0.26 ^a	0.14 ± 0.25 ^a	0.52 ± 0.89 ^a	0.49 ± 0.84 ^{ab}	1.59 ± 0.23 ^{abc}	0.76 ± 0.19 ^a
T8	0.33 ± 0.21 ^a	0.27 ± 0.22 ^a	0.91 ± 0.99 ^a	1.03 ± 0.75 ^{ab}	0.66 ± 0.33 ^{bc}	0.88 ± 0.14 ^a
T9	0.33 ± 0.10 ^a	0.25 ± 0.13 ^a	0.82 ± 0.18 ^a	1.09 ± 0.16 ^{ab}	1.18 ± 0.33 ^{abc}	0.73 ± 0.42 ^a
T10	0.23 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.09 ^a	0.58 ± 0.30 ^a	0.67 ± 0.07 ^{ab}	1.07 ± 1.05 ^{abc}	1.15 ± 0.06 ^a

Medias con letra distinta para una misma variable denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). T1: Control. T2: 0.5 mgL⁻¹ BAP. T3: 1.0 mgL⁻¹ BAP. T4: 1.5 mgL⁻¹ BAP. T5: 0.5 mgL⁻¹ 2-iP. T6: 1.0 mgL⁻¹ 2-iP. T7: 1.5 mgL⁻¹ 2-iP. T8: 0.5 mgL⁻¹ KIN. T9: 1.0 mgL⁻¹ KIN. T10: 1.5 mgL⁻¹ KIN.

Con respecto al uso de 0.5 mgL⁻¹ de 2-ip (T5), este resultó en una calidad de brotes significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con el uso 1.5 mgL⁻¹ de BAP (T4); asimismo, no se encontraron diferencias significativas con el control (T1). Por otro lado, la **Figura 4** muestra que los tratamientos T1 y T5 presentaron el mayor porcentaje de nudos brotados; de igual forma, la calidad de los brotes aceptables también fue superior, seguidos por los tratamientos en los que se utilizó kinetina (T8, T9 y T10).

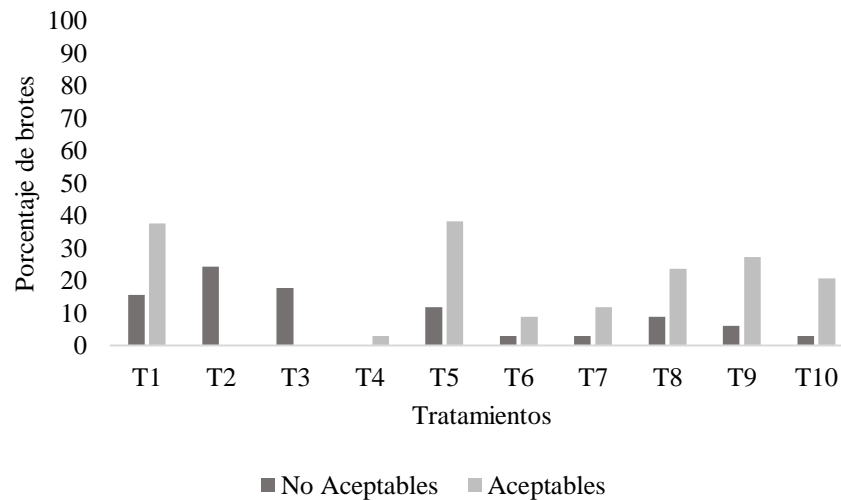


Figura 4. Distribución porcentual de los brotes de *S. saman* resultantes de los nudos establecidos en condiciones *in vitro*, según su calidad para ser Aceptable o No Aceptable para subcultivo, al emplear 3 citoquininas en diferentes concentraciones luego de 30 días de cultivo. T1: Control. T2: 0.5 mgL⁻¹ BAP. T3: 1.0 mgL⁻¹ BAP. T4: 1.5 mgL⁻¹ BAP. T5: 0.5 mgL⁻¹ 2-iP. T6: 1.0 mgL⁻¹ 2-iP. T7: 1.5 mgL⁻¹ 2-iP. T8: 0.5 mgL⁻¹ KIN. T9: 1.0 mgL⁻¹ KIN. T10: 1.5 mgL⁻¹ KIN.

Figure 4. Percentage distribution of *S. saman* shoots resulting from nodes established under *in vitro* conditions, according to their quality to be Acceptable or Not Acceptable for subculture, when using 3 cytokinins in different concentrations after 30 days of culture. T1: Control. T2: 0.5 mgL⁻¹ BAP. T3: 1.0 mgL⁻¹ BAP. T4: 1.5 mgL⁻¹ BAP. T5: 0.5 mgL⁻¹ 2-iP. T6: 1.0 mgL⁻¹ 2-iP. T7: 1.5 mgL⁻¹ 2-iP. T8: 0.5 mgL⁻¹ KIN. T9: 1.0 mgL⁻¹ KIN. T10: 1.5 mgL⁻¹ KIN.

Al emplear la concentración de 2-ip al 1.0 mgL⁻¹ y utilizar BAP en cualquiera de las 3 concentraciones (T2, T3 y T4), se indujo a una mayor formación de tejido calloso en los nudos en comparación con el tratamiento sin citoquininas (T1) (**Cuadro 16**). La presencia de callo mostró una correlación negativa con el número, longitud y calidad del brote. Pese a que esta correlación es baja en términos porcentuales, es un indicador de que el desarrollo del callo se asocia a una disminución de las otras variables (**Cuadro 17**).

Cuadro 17. Correlación de Pearson para explicar el efecto entre variable al utilizar citoquininas en nudos de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro*, luego de 30 días de cultivo.

Table 17. Pearson's correlation to explain the effect between variables when using cytokinins in *S. saman* nodes established under *in vitro* conditions, after 30 days of culture.

Variables	Nº de brotes	Longitud del brote	Calidad del brote
Longitud del brote	0.79		

Calidad del brote	0.86	0.883	
Presencia de callo	-0.228	-0.163	-0.213

Asimismo, se evidenció que, a medida que aumentó la concentración de BAP en el medio de cultivo, también aumentó la formación de callo (**Figura 5 y Figura 6**).

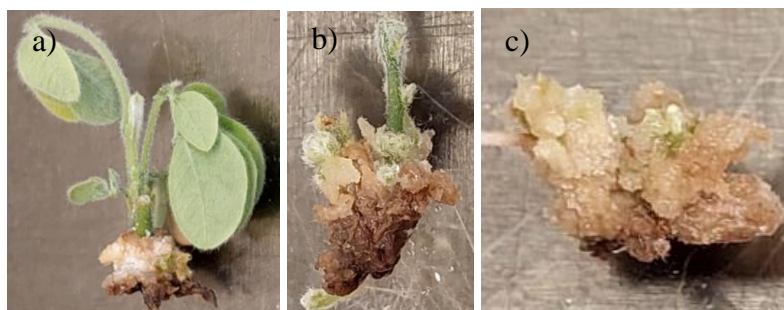


Figura 5. Evaluación cualitativa de la presencia de tejido calloso en nudos de *S. saman* después de 30 días de cultivo: a) T9 (1.0 mgL⁻¹ de KIN), presencia de callo nivel 1; b) T2 (0.5 mgL⁻¹ de BAP), presencia de callo nivel 2; c) T4 (1.5 mgL⁻¹ de BAP), presencia de callo nivel 3.

Figure 5. Qualitative evaluation of the presence of callus tissue in *S. saman* nodes after 30 days of culture: a) T9 (1.0 mgL⁻¹ KIN), presence of callus level 1; b) T2 (0.5 mgL⁻¹ BAP), presence of callus level 2; c) T4 (1.5 mgL⁻¹ BAP), presence of callus level 3.

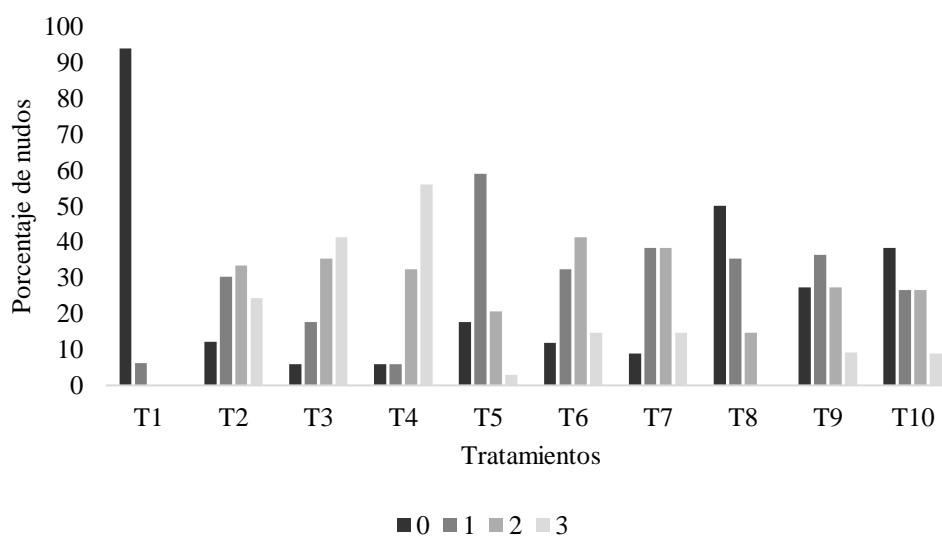


Figura 6. Escala de formación de callo presentado por nudos de *S. saman* establecidos en condiciones *in vitro*, después de la aplicación de 3 citoquininas en diferentes concentraciones, luego de 30 días de cultivo. T1: Control. T2: 0.5 mgL⁻¹ BAP. T3: 1.0 mgL⁻¹ BAP. T4: 1.5 mgL⁻¹ BAP. T5: 0.5 mgL⁻¹ 2-iP. T6: 1.0 mgL⁻¹ 2-iP. T7: 1.5 mgL⁻¹ 2-iP. T8: 0.5 mgL⁻¹ KIN. T9: 1.0 mgL⁻¹ KIN. T10: 1.5 mgL⁻¹ KIN.

Figure 6. The scale of callus formation presented by knots of *S. saman* established under *in vitro* conditions, after the application of 3 cytokinins in different concentrations after 30 days of culture. T1: Control. T2: 0.5 mgL⁻¹ BAP. T3: 1.0 mgL⁻¹ BAP. T4: 1.5 mgL⁻¹ BAP. T5: 0.5 mgL⁻¹ 2-iP. T6: 1.0 mgL⁻¹ 2-iP. T7: 1.5 mgL⁻¹ 2-iP. T8: 0.5 mgL⁻¹ KIN. T9: 1.0 mgL⁻¹ KIN. T10: 1.5 mgL⁻¹ KIN.

4. Discusión

4.1 Fase de establecimiento *in vitro*

Durante la época lluviosa, el establecimiento *in vitro* de explantes de cenízaro sin contaminación tuvo un porcentaje de entre 13% y 21%. De esta manera, diversos estudios han utilizado NaClO como agente desinfectante en especies forestales, lo que dio resultados similares a los obtenidos en esta investigación al aplicar concentraciones más altas de NaClO y diferentes tiempos de exposición; por ejemplo, Campos *et al.* (2020) obtuvo una sobrevivencia del 26.67% en segmentos nodales de *Switenia macrophylla* con tratamiento de NaClO al 3% durante 10 min. Asimismo, se observó una contaminación del 60% por hongos y una 13.3% por bacterias. Por otro lado, en segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus*, Díaz *et al.* (2020), al aplicar un tratamiento de NaClO al 10% durante 5 min, logró una desinfección inferior al 30%. Por lo tanto, el éxito en una metodología de una desinfección varía según a la especie en cuestión.

Ahora bien, el uso de NaClO para la desinfección en material vegetal es ampliamente utilizado de especies forestales y su efectividad en el establecimiento *in vitro* depende de la concentración y el tiempo de exposición. A pesar de que Kasthuriengan *et al.* (2013) lograron establecer segmentos de cenízaro para la multiplicación *in vitro* utilizando NaClO al 5.25% durante 15 minutos, para el caso de la presente investigación no se encontraron diferencias significativas en relación con la desinfección de HgCl₂, especialmente durante la época lluviosa (**Cuadro 8**). Por lo tanto, el análisis por lotes en cenízaro reveló que el lote 5 tuvo mejores resultados al utilizar HgCl₂ como agente desinfectante, lo que sugiere una mayor eficacia en la desinfección y un mejor establecimiento de los explantes. De esta manera, se valida esta metodología para la introducción de explantes de cenízaro de forma *in vitro*.

Otros estudios también han reportado diferencias en la efectividad de estos agentes desinfectantes. Méndez-Álvarez y Abdelnour-Esquivel (2014) afirman que la doble desinfección con NaClO fue más eficiente en *Terminalia amazonia* con un 56.25% de asepsia y una mortalidad del 50% por oxidación; por otro lado, Hine *et al.* (2014) obtuvieron para la misma especie una sobrevivencia del 76% al utilizar HgCl₂ al 0.1% durante 5 min. De igual manera, en *Vochyseya allenii*, donde la desinfección fue de un 47.5% con una sobrevivencia del 10 %. Asimismo, en *Aspidosperma polyneuron*, García *et al.* (2015) también encontraron mejores resultados (superior 80 % de asepsia) al utilizar desinfecciones con HgCl₂ en diferentes concentraciones y tiempo al emplear 0.125% durante 5 min en segmentos nodales, 0.125% por 10 minutos en láminas foliares, así como una doble desinfección con 0.3% por 10 min y 0.1% por 1 min en ápices.

Las diferencias encontradas entre los dos agentes desinfectantes son explicadas a partir de su grado de efectividad. Por un lado, al utilizar NaClO en bajas concentraciones, este resulta ser menos agresivo con el tejido vegetal, pero ataca la membrana celular de los agentes micobacterianos induciendo a su destrucción; mientras que, en altas concentraciones, puede afectar la permeabilidad de la membrana de la célula vegetal (Ramírez *et al.*, 2014). Por otro lado, de acuerdo con Beltrán y Mesa (2014) y Jiménez y Abdelnour (2016), el HgCl₂ se utiliza para controlar la contaminación por hongos y bacterias endógenas, principalmente cuando los compuestos menos tóxicos tienen poca eficiencia de desinfección en materiales vegetales con una carga microbiana alta o en especies

forestales donde el proceso de asepsia tiene un efecto limitado. En el caso del cenízaro, el uso de HgCl_2 durante la época seca ha demostrado ser más efectiva, con una desinfección superior al 87% en comparación con la metodología de NaClO durante la época lluviosa, la cual dio un porcentaje inferior al 37 %.

Con respecto a la época seca, la tasa de mortalidad fue del 3% en segmentos nodales, pero en ápices alcanzó el 46%, lo cual ocurre por el daño al tejido en el proceso de asepsia, resultando en clorosis y posterior muerte. No obstante, un comportamiento diferente reporta Méndez-Álvarez y Abdelnour-Esquivel (2014) con segmentos nodales de *Terminalia amazonia* al emplear HgCl_2 al 0.25% durante 10 min, ya que se obtuvo un 67% de desinfección, pero una mortalidad del 78.5%. De igual forma, García *et al.* (2015), en segmentos nodales de *Aspidosperma polyneuron*, obtuvieron una desinfección del 80% al usar HgCl_2 0.2 % por 10 min, pero con la oxidación más alta (60%); mientras que, al usar una concentración de 0.125% por 5 min, el porcentaje de desinfección fue menor al igual que la mortalidad.

Seguidamente, los segmentos nodales presentan una sobrevivencia significativamente superior en comparación con los ápices. Esta diferencia en la intensidad del daño ocasionado por el HgCl_2 puede explicarse a que el tejido de los ápices es más tierno y susceptible a sufrir daños físicos. Según explican Rojas (2015) y Park (2021), la efectividad de una metodología de desinfección se basa en la concentración de los agentes químicos y el tiempo de exposición en el material vegetal; por lo tanto, estos factores determinan el control de la contaminación sin afectar la estructura fisiológica de los explantes. De esta forma, algunas combinaciones logran altos porcentajes de desinfección, pero también causan daño al material vegetal, provocando su muerte o interrumpiendo su adecuado desarrollo, como ocurre en los ápices de cenízaro al usar 0.2% HgCl_2 por 5 min. Esto demuestra la dificultad de establecer material de cenízaro libre de hongos y bacterias en condiciones *in vitro*.

De igual manera, el clima desempeña un papel crucial en la proliferación de patógenos en las plantas donadoras dentro del invernadero, lo que lo convierte en un factor determinante en las desinfecciones. Durante condiciones secas, el nivel de inóculo de agentes contaminantes se reduce; mientras que, en condiciones de humedad relativamente alta, la presencia de estos agentes aumenta, lo que conduce a una mayor contaminación *in vitro*, incluso alcanzando un 100% de contaminación (Abdelnour *et al.*, 2012; Indacochea, 2017; Park 2021). Como consecuencia, al introducir cenízaro del invernadero en época de lluvia, se observa mayor incidencia de hongos. En cambio, al utilizar HgCl_2 durante la época seca, la contaminación por hongos no supera el 9% (**Cuadro 9**); así pues, el uso de HgCl_2 para el establecimiento de nudos de cenízaro resulta más eficiente durante la época seca.

4.2 Fase de desarrollo *in vitro*

Con respecto a esta fase, el desarrollo y crecimiento de los brotes de cenízaro en condición *in vitro* mostraron deficiencias. Para mejorar estas cualidades, se añadieron suplementos (sequestrene, carbón activo) al medio de cultivo MS; sin embargo, esta modificación no generó diferencias significativas en su desarrollo (**Cuadro 10**). Ante esta situación, se decidió analizar las sales inorgánicas del medio de cultivo y la cantidad de luz proporcionada.

Los resultados del ensayo de composición basal y fotoperiodo evidenciaron pocas diferencias estadísticas en la longitud y calidad de los brotes entre los tratamientos (**Cuadro 11**) al revelar una mortalidad inferior al 15 % (**Cuadro 12**), lo que indica que los brotes no mueren, pero su desarrollo se ve afectado. Esta situación sugiere que el problema en el desarrollo de los brotes de cenízaro en

condiciones *in vitro* no está relacionado con la iluminación, pero sí muestran algunos cambios fisiológicos con la composición de sales del medio de cultivo. Por esta razón, se procedió a seleccionar los medios WPM y MS para su estudio, pues el primero mostró buenos resultados en cuanto a la calidad de los explantes, pero no superó al MS.

Ahora bien, el progreso para un protocolo de multiplicación *in vitro* está vinculado al desarrollo y la calidad del material vegetal obtenido en el laboratorio. En este estudio, se evidenció que al cultivar brotes de cenízaro en frascos de vidrio con medio de cultivo WPM, hubo una mejora significativa en su desarrollo (**Cuadro 13**). En una investigación previa con cenízaro, Kasthuriengan *et al.* (2013) lograron el alargamiento de los brotes hasta los 3 cm mediante el uso de MS como medio de cultivo, pero lo suplementaron con 0.25 mgL^{-1} de BA y 0.75 mgL^{-1} de GA3, además de emplear recipientes de mayor volumen, específicamente, Phytatray II (Sigma); de esta manera, se concluye que el uso de hormonas en los medios de cultivo, puede cambiar el patrón de crecimiento y generar mejoras significativas en el desarrollo de brotes de cenízaro.

Asimismo, se ha observado que el uso de frascos de mayor volumen beneficia la calidad de los brotes debido a una mayor disponibilidad de medio de cultivo y un incremento en el gradiente de humedad relativa, lo que favorece la transpiración y el transporte de nutrientes (García *et al.*, 2011). Dicha situación podría explicar el desarrollo óptimo de los brotes de cenízaro en los frascos en comparación con los tubos de ensayo. Así pues, al basarse en estos resultados, se decidió implementar en el protocolo el cultivo de brotes de cenízaro en frascos con medio WPM.

Debido a que el medio de cultivo WPM ha sido ampliamente utilizado para el cultivo *in vitro* de especies forestales gracias a su composición baja en concentración de sales, se considera que estas son mejor toleradas en comparación con el medio MS (Park, 2021). Estudios previos respaldan esta diferencia; por ejemplo, Campos *et al.* (2020) encontraron que en el medio WPM, los brotes de caoba presentan mayor longitud y hojas más grandes, lo que lo convierte en el medio más eficiente para cultivo *in vitro* de la especie. Por otro lado, el MS, al tener una mayor cantidad de sales, disminuye el poder osmótico del medio, afectando la hidratación de los brotes y la absorción de nutrientes y agua. Otro ejemplo es el estudio de Hine *et al.* (2014) donde estos logran el desarrollo *in vitro* de *Terminalia amazonia* y *Vochysia allenii* empleando WPM al 100% y al 50% de sales respectivamente. También, Jiménez *et al.* (2020) observaron un mejor desarrollo de la longitud y número de nudos en brotes de *Buddleja incana*, cuando los cultivaron en el medio WPM.

Sin embargo, existen casos en los que el medio MS ha demostrado ser más favorable. Quintero-García *et al.* (2012) encontraron que al utilizar embriones inmaduros de *Junglans neotropica* para el desarrollo de plántulas, el medio MS promovía un crecimiento en altura y una proporción tallo/raíz significativamente mayor que al utilizar DKW y WPM. Además, García *et al.* (2011) al estudiar la necrosis apical en brotes *Pistacia vera*, encontraron que en el medio DKW la incidencia era menor que en el MS y WPM, lo que podría deberse a una mayor concentración de calcio en el medio. De esta manera, el crecimiento *in vitro* de especies forestales va a depender de los nutrientes proporcionados en el medio de cultivo, por lo que estas necesidades varían según las respuestas que genera cada especie a las condiciones *in vitro* y la etapa de desarrollo en la que se encuentre.

En este estudio, se observó un aumento en la calidad de los brotes de cenízaro al agregar Phytigel® como agente gelificante al medio WPM (**Cuadro 14 y 15**). Asimismo, se reportan resultados diferentes en *Vaccinium corymbosum*; no obstante, el agar y el Phytigel® no muestran diferencias significativas en el porcentaje de establecimiento. Además, ambos agentes fueron superiores al tercer gelificante usado, MacConkey agar (Toapanta, 2022). El agar es un polisacárido natural

extraído de las algas marinas y por su grado de pureza puede contener cadenas largas de ácidos grasos que pueden actuar como inhibidores de crecimiento (Thorpe *et al.*, 2008); por ello, es posible que tenga una influencia sobre los brotes de cenízaro y afecte su desarrollo. Por lo tanto, se seleccionó el Phytigel® como agente gelificante en este protocolo.

Finalmente, al evaluar el efecto de la aireación en el desarrollo de brotes de cenízaro, se encontró que no hay diferencias significativas entre la aireación manual y sin aireación (**Cuadro 14 y 15**). Por esta razón, para el protocolo se estableció trabajar sin aireación, ya que representa menos trabajo.

4.3 Fase de multiplicación *in vitro*

En los procesos de inducción de la brotación, las citoquinas y auxinas son empleadas como hormonas reguladoras del ciclo celular y liberar las yemas laterales del letargo. En el caso del cenízaro, el medio de cultivo WPM se complementó con BAP, KIN y 2-ip en concentraciones de 0.5, 1.0 o 1.5 mgL⁻¹, sin observar diferencias significativas en el aumento de brotes en los nudos en comparación con el cultivo sin hormonas después de 30 días (**Cuadro 16**). Estos resultados coinciden con lo reportado por Hine *et al.*, (2014) en *Terminalia amazonia* y *Vochysia allenii*, quienes lograron 1 brote por explante al usar medio de cultivo WPM con 6-BAP o tidiazuron (TDZ) en 5 concentraciones, alcanzado después de 60 días de cultivo.

Otros estudios han reportado un comportamiento similar con la caoba. Rojas y Hine (2019) lograron 1 brote por nudo al término de 60 días, al cultivar los nudos en medio MS con 5 concentraciones de 6-BAP. Campos *et al.* (2020) obtuvieron un promedio menor 1.20 brotes por nudo a los 50 días, utilizando concentraciones de BAP (0.1, 0.5 y 1 mg/L) en combinación con ANA (0.1 y 0.5 mgL⁻¹) en medio WPM; sin embargo, el tratamiento con la concentración de 1 mgL⁻¹ de BAP resultó en la mayor longitud del brote (8 mm). En el caso de los nudos de *Aniba perutilis*, Delgado y Hoyos (2016) estudiaron el efecto de los reguladores de crecimiento BAP y KIN en medio WPM sin encontrar diferencias significativas, pero al emplear 3 mgL⁻¹ de BAP más 1 mgL⁻¹ de AG3, la brotación aumentó de 0.6 (con BAP al 3 mgL⁻¹) a 1.2 por explante.

Los resultados de estos estudios indican que el promedio de brotes por nudo es mayor que el obtenido en la presente investigación, lo que puede responder al tiempo del cultivo, el cual fue mayor a 30 días e incluso llegó a duplicarse en algunos casos. En concordancia, la cantidad de brotes no desarrollados fue superior a la cantidad de brotes desarrollados, lo cual sugiere que podrían producirse más brotes viables para el subcultivo en un periodo mayor de tiempo del empleado en este ensayo.

De esta manera, al adicionar BAP al medio WPM para estimular la brotación del cenízaro, se observó formación de tejido calloso, el cual aumentó proporcionalmente con la concentración de la hormona. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por García *et al.* (2015), ya que al utilizar BAP (0, 0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) junto con la auxina AIB en nudos de *Nothofagus alpina*, consiguieron en promedio 1 brote por nudo después de 40 días; sin embargo, el uso de esta citoquinina resultó en la formación de más del 50% de tejido calloso. Por lo tanto, la presencia de esta citoquinina puede promover la división celular no diferenciada que se manifiesta a través del tejido calloso, tal como ocurrió en los nudos de cenízaro.

Ahora bien, la adición de hormonas al medio de cultivo de tejidos vegetales puede generar interacciones positivas, negativas o neutras con las hormonas endógenas de la especie en estudio (Staden *et al.*, 2008). Esto sugiere que la regulación hormonal endógena del cenízaro posiblemente

presenta concentraciones similares a las estudiadas, las cuales ya están involucradas en el proceso de brotación, así como que la incorporación adicional de estas hormonas no genera un aumento significativo de la brotación. No obstante, se ha demostrado que, en el cenízaro, la combinación de hormonas puede mejorar la brotación. Tal y como lo demuestran Kasthuriengan *et al.* (2013) al obtener un promedio de 5 brotes por nudo después de 3 semanas de cultivo al utilizar 2.0 mgL^{-1} de 6-benciladenina (BA) y 0.1 mgL^{-1} de ácido giberélico (AG3) en medio MS. Lo anterior indica que la utilización de citoquininas en conjunto con otras hormonas puede potenciar el proceso de brotación en esta especie.

En la primera etapa de este proyecto, Corrales-Torres (2022) encontró que el porcentaje de explantes brotados sin adición de hormonas fue mayor en el medio MS (51.67%) en comparación con el WPM (34.17 %), con longitudes de los brotes de 0.32 y 0.16 cm respectivamente. En el trabajo actual, se consiguieron resultados similares al cultivar en el medio WPM sin adición de citoquininas, logrando una brotación superior al 50% del total de los nudos; asimismo, aproximadamente el 70% de los brotes presentaron una calidad aceptable para ser subcultivados al término de 30 días (**Figura 2**).

Esta investigación se enfocó en profundizar en las necesidades específicas de la especie para obtener brotes de mejor calidad; por lo tanto, se emplearon nudos de brotes ya establecidos en condiciones *in vitro* que pasaron por más de 2 subcultivos. Este comportamiento coincide con lo observado por Kasthuriengan *et al.* (2013) donde el número de brotaciones por nudo aumentó después de la primera brotación y, posteriormente, al transferir los brotes a un medio de cultivo fresco.

5. Conclusión

El establecimiento *in vitro* del cenízaro alcanzó el mayor porcentaje de éxito al utilizar para la introducción segmentos nodales empleando la desinfección de HgCl_2 durante la época seca, debido a que resulta en una menor exposición a patógenos para las plantas donadoras en el invernadero. Asimismo, el cultivo de los brotes en frascos de mayor volumen con medio de cultivo semisólido WPM suplementado con Phytigel® como agente gelificante, demostró ser altamente beneficioso para su desarrollo *in vitro*.

Con relación a las pruebas realizadas con las citoquininas BAP, KIN y 2-ip, estas no representaron una mayor proliferación de brotes en los nudos de cenízaro. De esta manera, para futuros estudios, se recomienda explorar la inducción de la brotación, mediante la combinación de las citoquininas KIN en las 3 concentraciones y 2-ip en la concentración de 0.5 mgL^{-1} con otras hormonas, ya que esta estrategia podría mostrar resultados más prometedores.

Finalmente, es esencial continuar investigando el desarrollo en condiciones *in vitro* de brotes de cenízaro para identificar las necesidades específicas de la especie en cada etapa. Esta tarea resultó ser una dificultad durante la investigación; no obstante, abordar estas necesidades permitiría obtener más material para llevar a cabo ensayos y avanzar en el estudio de la especie. En conjunto, estos avances contribuirán al establecimiento de un protocolo efectivo para la propagación *in vitro* del cenízaro, fundamental para su conservación y uso en programas de mejora genética y silvicultura.

6. Agradecimientos

Se expresa el agradecimiento a los participantes del proyecto “Bases para el Mejoramiento Genético y Conservación de germoplasma de Cenízaro (*Samanea saman*) en Costa Rica”, adscrito al Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (INISEFOR), por proveer el material vegetal que dio inicio a esta investigación, así como al instituto en sí mismo, por brindar el espacio, el equipo y los recursos para la realización del estudio. Finalmente, también se agradece a las diversas personas anónimas que colaboraron de alguna manera para cumplir con los objetivos del trabajo.

7. Referencias bibliográficas

- Abdelnour, A., Sánchez, L. y Jiménez, K. (2012). *Micropropagación de especies forestales. Terminalia amazonia y validación y afinamiento del protocolo desarrollado para Vochysia spp.* Instituto Tecnológico de Costa Rica. <http://hdl.handle.net/2238/3146>
- Barquero, A. I. y Hernández, G. (2015). Bosques y Pago de Servicios Ambientales en Costa Rica. *Ambientico*, 253(2), 12-16. https://www.ambientico.una.ac.cr/revista-ambientico/bosques-y-pago-de-servicios-ambientales-en-costa-rica/?order=ASC&orderby=date&perpage=12&search=253&pos=1&source_list=collection&ref=%2Fmenu-principal%2Farticulos%2F
- Beltrán, D. y Mesa, N. (2014). El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Aniba perutilis* Hemsley). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 203-209. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77631180023.pdf>
- Campos, J., Arteaga, M., Campos, S., Chico, J. y Cerna, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141-156. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2413-32992020000100141&script=sci_arttext
- Corrales-Torres, M. E. (2022). *Desarrollo de un protocolo de establecimiento in vitro de material seleccionado de cenízaro (Samanea Saman Jacq,Merr.)* [Tesis de Licenciatura no publicada]. Universidad Nacional de Costa Rica.
- Delgado, L. M. y Hoyos, R. A. (2016). Multiplicación clonal in vivo e in vitro de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl. *Acta Agronómica*, 65(2), 190-196. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n2.42808>
- Díaz, A., Rodas, J., González, L. y Vera, M. (2020). Establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. *Biotecnología Vegetal*, 20(3), 203-210. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472020000300203
- Driver, J. A. y Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*. 19(4), 507-509.
- García, D., Mesa, N. y Ocampo, M. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76-84. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277>
- García, E., Lorente, P., Marín, J. A., Andreu, P. y Arbeloa, A. (2011). Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados in vitro. *ITEA*, 107(4), 315-323. <https://www.aida-itea.org/index.php/revista-itea/contenidos?idArt=166&lang=esp>
- García, L., Carrasco, J., Morante, J., Luna, R., Gonzáles, B. y Castro, J. (2015). Micropropagación in vitro de *Nothofagus alpina* utilizando fitohormonas. *Revista Cincia y Tecnología*, 8(1), 1-10. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5319278>

- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G. J. Roberts, A y George, E. F. (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. En E. F. George, M. A. Hall y G. De Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (3ª ed.) (pp. 115-174). Springer.
- Hine-Gómez, A., Rojas-Vargas, A. y Daquinta-Gradaille, M. (2014). Establecimiento *in vitro* de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) y *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 180-186. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47240>
- Indacochea, B. (2017). Las técnicas de cultivo *in vitro* y *ex vitro* de células y tejidos vegetales. En B. Indacochea, J. Gabriel y J. Parrales (Eds.). *Contribuciones de la UNESUM a la biotecnología vegetal*. Grupo COMPAS. https://www.researchgate.net/publication/322900900_UNESUM_Aporta_a_la_Biotecnologia_de_Plantas
- Jiménez, P., Barrera, P., Huachi, L. E., Vera, A. y Caicedo, C. (2020). Propagación *in vitro* de Quishuar (*Buddleja incana* Ruiz & Pav). La Granja, revista de ciencias de la vida, 31(1), 71-81. <https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.05>
- Jiménez, V. y Abdelnour, A. (2016). Establecimiento *in vitro* de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 29(2), 77-84. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v29i2.2692>
- Kasthuriengan, S., Xie, L., Hong Li, C., King Fong, Y. y Hong, Y. (2013). *In vitro* propagation and assessment of genetic stability of micropropagated *Samanea saman* (rain tree) using microsatellite markers. *Acta Physiol Plant*, 35, 2467–2474. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1281-2>
- Lloyd, G. y McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int Plant Prop Soc. Proc.* 30, 421- 427.
- Méndez-Álvarez, D., y Abdelnour-Esquivel, A. (2014). Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11(27), 7–21. <https://doi.org/10.18845/rfmk.v11i27.1774>
- Minitab, Inc. (2019). Minitab (versión 19) [Software]. <https://www.minitab.com/es-mx/>
- Molina, S. (2018). Reforestación y producción comercial de madera con especies nativas. *Ambientico*, 267, 2-3. <https://www.ambientico.una.ac.cr/revista-ambientico/reforestacion-y-produccion-comercial-de-madera-con-especies-nativas/>
- Murashige, T y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497
- Murillo Gamboa, O. (2018). ¿Cuáles especies forestales nativas debemos priorizar en el país? *Ambientico*, 267, 4-9. <https://www.ambientico.una.ac.cr/revista-ambientico/cuales-especies-forestales-nativas-debemos-priorizar-en-el-pais/>
- Murillo, O. y Guevara, V. (2013). *Estado de los recursos genéticos forestales de Costa Rica*, Informe Nacional. MINAET/FAO/CONAGEBIO. <http://www.fao.org/3/i3825e/i3825e16.pdf>
- Park, S. (2021). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments* (4ª ed.). Academic Press.
- Quintero-García, O. D. y Jaramillo-Villegas, S. (2012). Rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels). *Acta Agronómica*, 61(1), 52-60. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122012000100007&lng=en&tlng=es
- Quoirin, M., y Lepoivre, P. (1977). Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.

- Ramírez, L., Granados, J. y Carreño, N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo *in vitro*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5(1), 155-159. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5344976>
- Rayas, A., López, J., Medero, V., Basail, M., Santos, A. y Gutiérrez, Y. (2019). Conservación *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam por crecimiento mínimo con el uso de manitol. *Biotecnología Vegetal*, 19(1), 43-51. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/600/pdf>
- Rojas, V. (2015). *Protocolo para la multiplicación in vitro e inducciones de mutaciones en Polyscias scutellaria cv. "Fabián"* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica]. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3854/1/39002.pdf>
- Rojas-Vargas, A. y Hine-Gómez, A. (2019). Micropropagación de clones superiores de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de segmentos nodales. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(2), 47-59. <https://dx.doi.org/10.15359/rca.53-2.3>
- Solano, G., Aguilar, L. y Lizano, M. (2018). *Zonificación forestal de Costa Rica y estado Poblacional de especies forestales, basado en el Inventario Nacional Forestal e instrumentos de monitoreo y manejo de bosques naturales*. Consultor: Asociación Comisión de Desarrollo Forestal de San Carlos (CODEFORSA). https://www.sirefor.go.cr/pdfs/Documento-final-de-la-consultoria-14-06-18_3.pdf
- Staden, J., Zazimalova, E. y George, E. F. (2008). Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En E. F. George, M. A. Hall y G. De Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (3ª ed.) (pp. 205-226). Springer.
- Topanta, M. V. (2022). *Establecimiento in vitro de plantas de arándanos variedad Biloxi (Vaccinium corymbosum L.) en el medio WPM* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/36064>
- Valverde, L., Dufour, M. y Villalobos, V. (1997). In vitro Propagation of *Pithecellobium saman* (ceñizaro). *In Vitro cellular & Developmental Biology. Plant*, 3(1): 38-42
- Zamora, N. (2004). Fabaceae. En B. Hammel, M. Grayum, C. Herrera y N. Zamora (Eds.), *Manual de plantas de Costa Rica* (Vol. 5, p. 702). Missouri Botanical Garden Press.