



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO EXPERIMENTAL

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO IN VITRO DE
SWIETENIA MACROPHYLLA A TRAVÉS DE CALLOGÉNESIS
INDUCIDA PARA PROMOVER SU CONSERVACIÓN EN EL
ECUADOR**

*Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniera (o) en Biotecnología*

AUTORES

**LYA GIULIANA GUERRA SALAZAR
ISAAC GABRIEL MORÁN REYES**

TUTOR

CARINA ELIZABETH HIDALGO RAMIREZ, MSC.

GUAYAQUIL - ECUADOR

2024

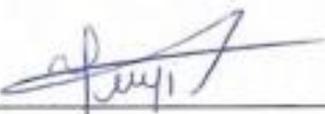
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, **Lya Giuliana Guerra Salazar** con documento de identificación N° 0923718506 e **Isaac Gabriel Morán Reyes** con documento de identificación N° 0924392939; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Lya Giuliana Guerra Salazar
CI: 0923718506



Isaac Gabriel Morán Reyes
CI: 0924392939

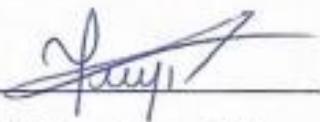
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **Lya Giuliana Guerra Salazar** con documento de identificación No. 0923718506 e **Isaac Gabriel Morán Reyes** con documento de identificación No. 0924392939, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO IN VITRO DE *SWIETENIA MACROPHYLLA* A TRAVÉS DE CALLOGÉNESIS INDUCIDA PARA PROMOVER SU CONSERVACIÓN EN EL ECUADOR”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Lya Giuliana Guerra Salazar
CI: 0923718506



Isaac Gabriel Morán Reyes
CI: 0924392939

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Carina Elizabeth Hidalgo Ramirez** con documento de identificación N° 1722163860, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO IN VITRO DE *SWIETENIA MACROPHYLLA* A TRAVÉS DE CALLOGÉNESIS INDUCIDA PARA PROMOVER SU CONSERVACIÓN EN EL ECUADOR”**, realizado por Lya Giuliana Guerra Salazar con documento de identificación N° 0923718506 y por Isaac Gabriel Morán Reyes con documento de identificación N° 0924392939, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Carina Elizabeth Hidalgo
CI: 1722163860

Dedicatoria

A la única persona que ha estado en mi lado desde el momento en que nací y que nunca ha permitido que algo me falte, que nunca dejó que yo me rindiera y si lo hacía, estaba siempre para apoyarme. Es la persona que más amo en este mundo y no me ubicaría en él sin ella. Dedico este trabajo lleno de esfuerzo y dedicación a mi madre, Lya Salazar, por ofrecerme siempre su compañía, comprensión y apoyo en mis momentos más felices y tristes, sin ella no hubiera logrado estar donde me encuentro ahora.

Agradecimiento

Principalmente agradezco a mi madre por estar en todo momento conmigo y por todo el amor que me permitió salir adelante. Le agradezco a mi tutor de tesis, la Msc. Carina Hidalgo, por ayudarnos y entendernos durante todo el proceso experimental que atravesamos y siempre darnos las más grandes esperanzas para seguir adelante. Finalmente agradezco mucho a todas aquellas personas que, a pesar de no estar involucrados en nuestro trabajo, ofrecieron su apoyo y ayuda para que podamos realizar nuestro proyecto con todos los recursos necesarios, no sé qué hubiera hecho sin su ayuda.

Giuliana Guerra

Dedicatoria

Quiero dedicarle esta tesis a mi abuela Consuelo Nath que me crio y amó con todo su corazón, aunque ya no estés conmigo todos tus consejos y regaños los llevo siempre presente, a mi mamá Gabriela Reyes por guiarme, apoyarme y a mi prometida Marcela Cedeño porque nunca me has soltado la mano y siempre cumples con tu promesa de alentarme a que siga mis sueños y mis propósitos.

Agradecimiento

En primer lugar quiero agradecerle a Dios por permitirme llegar hasta aquí, agradezco a mi mami chelo que me cuida desde el cielo por haber estado conmigo todos los días de mi vida, apoyarme y guiarme por buen camino, a mi prometida Marcela Cedeño por estar conmigo cuando más lo necesitaba, soportándome, cuidándome y que nunca dejó que me rindiera, a mis padres por apoyarme en mis estudios, a nuestra tutora la MSC Carina Hidalgo que tuvo mucha paciencia en este proyecto y todas las personas que nos apoyaron en esta tesis con sus guías y conocimientos.

Isaac Morán

Resumen

El género *Swietenia* pertenece a la familia Meliaceae, tanto en Ecuador y en gran parte de América Central se considera la especie *Swietenia macrophylla* como la más apreciada por la calidad de su madera siendo históricamente importante en la industria maderera ocasionado que la especie caiga en un estado de peligro de extinción. El objetivo de esta investigación es establecer un cultivo *in vitro* induciendo la formación de callos a partir de hojas y segmentos nodales con la ejecución de un protocolo definido de desinfección y variaciones en la adaptación del cultivo para la inducción de callos evaluando distintos parámetros en un medio Murashige & Skoog con el fin de promover alternativas para su conservación. En esta fase se determinan las concentraciones adecuadas para la evaluación de la formación de callos. Se evaluaron dos protocolos de desinfección con hipoclorito de sodio para la primera experimentación en hojas y segmentos nodales e hipoclorito de calcio para el segundo ensayo, realizado únicamente con segmentos nodales. Para la evaluación de callos se evaluaron concentraciones de sacarosa vs concentraciones de 2,4-D en fotoperíodos 16/8 y oscuridad para hojas, siendo un total de 108 y 72 para segmentos nodales. Como resultado del protocolo de desinfección hubo una alta tasa de contaminación de los explantes por presencia de hongo endófito, evitando el desarrollo de estos. En los ensayos para la inducción a callos, el 1,1% de las réplicas mostró respuesta hacia el tratamiento de 0,5 mg/l de 2,4-D de segmentos nodales en oscuridad total a los 30 días, donde se observó la formación de callos friables de baja densidad, con una morfología celular desorganizada vista bajo el microscopio.

Palabras clave: Callos, *Swietenia macrophylla*, cultivo *in vitro*, conservación

Abstract

The genus *Swietenia* belongs to the family Meliaceae, both in Ecuador and in much of Central America the species *Swietenia macrophylla* is considered the most appreciated for the quality of its wood, being historically important in the timber industry causing the species to fall into a state of endangerment. The objective of this research is to establish an *in vitro* culture inducing callus formation from leaves and nodal segments with the execution of a defined disinfection protocol and variations in the adaptation of the culture for the induction of calluses by evaluating different parameters in a Murashige & Skoog medium in order to promote alternatives for their conservation. In this phase, appropriate concentrations are determined for the evaluation of callus formation. Two disinfection protocols were evaluated with sodium hypochlorite for the first experiment on leaves and nodal segments and calcium hypochlorite for the second trial, performed only with nodal segments. For the evaluation of calluses, sucrose concentrations were evaluated vs. 2,4-D concentrations in photoperiods 16/8 and darkness for leaves, being a total of 108 and 72 for nodal segments. As a result of the disinfection protocol, there was a high rate of contamination of the explants due to the presence of endophytic fungus, preventing their development. In callus induction assays, 1.1% of replicates responded to 0.5 mg/L 2,4-D treatment of nodal segments in total darkness at 30 days, where low-density friable calluses were formed, with disorganized cell morphology seen under the microscope.

Key words: Callus, *Swietenia macrophylla*, *in vitro* culture, conservation

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 1 | 10 |
| Antecedentes | 10 |
| 1.1. Introducción | 10 |
| 1.2. Problema de investigación | 12 |
| 1.3. Delimitación | 13 |
| 1.4. Pregunta de investigación | 15 |
| 1.5. Objetivos generales y específicos | 15 |
| 1.5.1. Objetivo general | 15 |
| 1.5.2. Objetivos específicos | 15 |
| 1.6. Hipótesis | 16 |
| Capítulo 2 | 17 |
| Marco teórico | 17 |
| 2.1. <i>Swietenia macrophylla</i> (Árbol de Caoba) | 17 |
| 2.1.1. Localización | 17 |
| 2.1.2. Taxonomía | 18 |
| 2.1.3. Descripción | 18 |
| 2.1.4. Propiedades y Beneficios | 19 |
| 2.1.5. Hábitat | 19 |
| 2.1.6. Enfermedades | 20 |
| 2.1.7. Hongos endófitos y enfermedades | 20 |
| 2.1.8. Estado de conservación | 21 |
| 2.1.9. Herborización | 23 |
| 2.2. Cultivo <i>In Vitro</i> | 23 |
| 2.2.1. Medios de cultivo en especies leñosas | 24 |
| 2.2.2. Condiciones de crecimiento | 28 |
| 2.3. Fases del cultivo <i>in vitro</i> | 28 |
| 2.3.1. Fase 0: Fase preparativa | 28 |
| 2.3.2. Fase 1: Establecimiento <i>in vitro</i> | 29 |
| 2.3.3. Fase 2: Multiplicación | 29 |
| 2.4. Callogénesis | 30 |
| Capítulo 3 | 31 |

| | |
|---|-----------|
| Materiales y métodos | 31 |
| 3.1. Materiales | 31 |
| 3.2. Metodología de investigación | 31 |
| 3.3. Localización del ensayo | 31 |
| 3.4. Selección, colecta y transporte del material vegetal | 32 |
| 3.5. Herborización del árbol de Caoba | 33 |
| 3.6. Evaluación de reactivos para el cultivo <i>in vitro</i> | 34 |
| 3.7. Protocolo de desinfección | 34 |
| 3.7.1. Tratamientos | 34 |
| 3.8. Adaptación al medio de cultivo para la inducción de callos | 37 |
| 3.8.1. Factores de estudio | 40 |
| 3.8.2. Unidad experimental | 40 |
| 3.9.3 Análisis estadístico | 41 |
| 3.9.1. Formación de callos | 41 |
| 3.9.2. Número de callos por explante/tratamiento | 42 |
| Capítulo 4 | 42 |
| Resultados y discusión | 42 |
| 4.1. Descripción morfológica de las hojas y semillas de <i>S. macrophylla</i> | 42 |
| 4.2. Comparación de las muestras herborizadas | 44 |
| 4.3. Desinfección de explantes | 45 |
| 4.4. Fenolización y sobrevivencia de los explantes | 49 |
| 4.5. Formación de callos | 50 |
| Capítulo 5 | 54 |
| Conclusiones y recomendaciones | 54 |
| 5.1. Conclusiones | 54 |
| 5.2. Recomendaciones | 55 |
| Bibliografía | 56 |
| Anexos | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Taxonomía de la Caoba | 19 |
| Tabla 2. Desinfección de segmentos nodales | 36 |
| Tabla 3. Segundo protocolo de desinfección para segmentos nodales. | 37 |
| Tabla 4. Desinfección de hojas | 38 |
| Tabla 5. Tratamiento de segmentos nodales | 39 |
| Tabla 6. Tratamiento de Hojas | 39 |
| Tabla 7. Segundo experimento con segmentos nodales | 41 |

| | |
|--|----|
| Tabla 8. Descripción de la escala empleada por (Hernández et al., 2021) | 43 |
| Tabla 9. Desinfección de hojas con Hipoclorito de Sodio | 46 |
| Tabla 10. Desinfección en segmentos nodales con Hipoclorito de Sodio | 47 |
| Tabla 11. Desinfección de segmentos nodales con Hipoclorito de Calcio | 48 |
| Tabla 12. ANOVA para Contaminación por Concentración | 50 |
| Tabla 13. Desdiferenciación celular en explantes foliares a partir del séptimo día de sembrados. | 51 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|--|----|
| Ilustración 1. Ubicación geográfica de las zonas de recolección del material vegetal. | 15 |
| Ilustración 2. Ubicación geográfica de las zonas de recolección del material vegetal. | 15 |
| Ilustración 3. Mapa de la zona de la parroquia Chongón y foto del restaurante Bonanza. | 34 |
| Ilustración 4. Muestra botánica, hojas de <i>Swietenia macrophylla</i> . | 44 |
| Ilustración 5. Muestra botánica, semillas de <i>S. macrophylla</i> | 45 |
| Ilustración 6. Formación de callos en segmento nodales | 53 |
| Ilustración 7. Comparación de tejidos de segmentos nodales | 53 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Materiales utilizados en la herborización | 57 |
| Anexo 2. Materiales utilizados en el cultivo <i>in vitro</i> | 57 |
| Anexo 3. Comparación de muestras herborizadas | 58 |
| Anexo 4. Composición del Medio MS y sus modificaciones | 60 |
| Anexo 6. Resultados de los protocolos de desinfección por tratamiento | 62 |

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Introducción

Desde inicios del siglo XXI se ha estimado una pérdida de más de 3,7 millones de km cuadrados de cobertura en bosques, generando gran impacto a los bosques tropicales según mencionan Hansen et al. (2013). Un sin número de especies se han visto afectadas por los procesos de erosión genética a través de la fragmentación del hábitat (Laurance et al. 2018). Debido a ello, es que en los últimos años se han perfeccionado varias técnicas de biotecnología con el fin de mejorar el manejo y la conservación de las especies forestales más amenazadas por acciones antrópicas. (Delgado Paredes & Vásquez Díaz, 2023)

La deforestación es una de las mayores amenazas de la biodiversidad mundial (Barlow et al. 2016). La caoba, un árbol tropical distribuido en varias zonas de América, ha sido objeto de explotación intensiva debido a la calidad de su madera, utilizada para productos de gran valor. La demanda constante ha llevado a la disminución de las poblaciones naturales en diversas regiones, incluido Ecuador, donde la tala y la deforestación han amenazado la supervivencia de la especie (Sorgato, 2017). Con base en esta información, el establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* es vital para conservar la caoba en Ecuador, el cual permite la preservación genética de la especie y restaurar poblaciones en peligro y contribuir al desarrollo sostenible (Valeria Sorgato., 2017).

La caoba alcanza una longitud hasta de 70 metros con ramas gruesas ascendentes y retorcidas que solo crecen por arriba de los 25 metros (García, 2014). Exige luz, pero tolera la sombra en su

etapa juvenil, lo cual se debe a que se desarrolla en zonas con otras numerosas especies de árboles de gran tamaño. Viven por más de 50 años (Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez, 2023).

La tala ilegal ha provocado una drástica disminución de la caoba a nivel mundial. Se conoce como "oro rojo" en la Amazonía debido a su valioso tono rojizo y la robustez de sus troncos, la caoba se ha convertido en una de las maderas tropicales más apreciadas y demandadas, con exportaciones que superan los 99 millones de dólares anuales, según la CITES. En Ecuador, la demanda de la fiebre por este recurso y la expansión de la frontera agrícola ha llevado a la reducción de la población de caoba en un aproximado de 4000 árboles, según datos del MAE. Hasta el año 2017, los últimos remanentes se encuentran en las provincias de Pastaza y Morona Santiago, mientras que, en otras, como Orellana, Napo y Sucumbíos, se podría decir que la especie ha desaparecido debido a la explotación maderera en las décadas de los 80 y 90 (Sorgato, 2017).

Debido a esta situación, es que en los últimos años se han desarrollado y mejorado numerosas técnicas de biotecnología con el fin de mejorar el manejo y la conservación de las especies forestales más amenazadas por acciones realizadas por el hombre. (Haines, 1992)

Es importante destacar que la caoba fue incluida dentro de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre en el apéndice II, debido a su alta explotación con fines comerciales en Sudamérica (CITES, 2005). La extracción en grandes cantidades de su madera es lo que ha generado que se la catalogue como una de las especies forestales más amenazadas en el mundo (CITES, 2005). Especies de alto valor comercial y de fuerte demanda en los mercados globales, son una gran oportunidad siempre y cuando se sepa

manejarlas, se las conserve de forma adecuada y se busca la elaboración de productos de alto valor agregado derivado de sus propiedades (Franco et al., 2019)

1.2. Problema de investigación

El árbol de Caoba (*S. macrophylla*) es una especie arbórea de gran valor ecológico, cultural y económico en Ecuador. Su presencia en los ecosistemas naturales es vital para la biodiversidad y su valor cultural es significativo tanto a nivel local como nacional (Ministerio del Ambiente, 2017). Se encuentra amenazada por la deforestación, la fragmentación del hábitat y la explotación ilegal, lo que ha llevado a una disminución preocupante de sus poblaciones naturales (Sorgato, 2017). El establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* podría contribuir a la conservación de la especie y a su preservación a largo plazo (Hernández & Barrales, n.d.). En la actualidad, la conservación de la Caoba en Ecuador se enfrenta a grandes desafíos debido a la falta de métodos de conservación efectivos y reproducibles (Bacusoy & Macías, 2019). El cultivo *in vitro* representa una técnica prometedora para la preservación de especies vegetales amenazadas, pero su aplicación específica a la Caoba aún necesita ser desarrollada y validada (Bacusoy & Macías, 2019). El establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* hasta la fase de callogénesis se presenta como un paso fundamental para la reproducción controlada de la caoba (Rebaza, 2020). Este protocolo permitiría superar las limitaciones impuestas por las condiciones ambientales y las amenazas en su hábitat natural, que aseguren la preservación de la diversidad genética y la disponibilidad continua de esta especie para las generaciones futuras (Salgado, n.d.). Más allá de su impacto en la conservación, un protocolo de cultivo *in vitro* establecido se elige como un recurso preciado para la investigación científica, con paso a oportunidades para estudios detallados sobre la biología y la genética de la

caoba (TECNAL, n.d.). En el ámbito biotecnológico, la etapa de callogénesis ofrece la posibilidad de generar callos, masas celulares indiferenciadas, que pueden ser utilizados para la propagación masiva de plantas, la obtención de material genético uniforme y la exploración de vías para la mejora genética de la caoba, esto otorga nuevas perspectivas para su gestión sostenible y su uso en aplicaciones biotecnológicas avanzadas (Maldonado, 2022).

1.3. Delimitación

Ubicaciones geográficas de las zonas de recolección del material vegetal localizadas en el km 21 de la Vía a la Costa.

Ilustración 1. Ubicación geográfica de las zonas de recolección del material vegetal.



Coordenadas: -2.202041, -80.063164.

Fuente: Google Earth Maps, 2023

Ilustración 2. Ubicación geográfica de las zonas de recolección del material vegetal.



Coordenadas: -2.199813, -80.060371

Fuente Google Earth Maps, 2023

Se delimitará a todo lo que corresponde al Km 21 Vía a la Costa desde la Ciudadela Oporto hasta Valle Alto como ubicación para tomar las muestras que aporten al trabajo experimental.

El estudio estará centrado en los árboles de Caoba presentes en un terreno del Km 21, pues bien, en este entorno existen especies que han crecido naturalmente. Se realizarán protocolos de desinfección y cultivo *in vitro* de hojas y explantes del árbol de Caoba.

Se utilizará como método de contraste de protocolos una revisión sistemática en especies provenientes de la familia de las Meliaceae para establecer un protocolo para la Caoba. Los materiales para la investigación son otorgados por la Universidad Politécnica Salesiana, quienes proporcionaron uso de sus laboratorios, equipos y reactivos para realizar el experimento.

Los resultados de esta investigación servirán para futuras referencias sobre protocolos para la inducción a la calogénesis de *Swietenia macrophylla* como una línea base de estudios futuros para el desarrollo biotecnológico en la preservación de su especie.

1.4. Pregunta de investigación

¿Qué tipo de tejido vegetal y protocolo de inducción a callos son los más adecuados para el establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* a través de callogénesis inducida?

1.5. Objetivos generales y específicos

1.5.1. Objetivo general

Establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de inducción a callogénesis para la conservación de la caoba (*Swietenia macrophylla*) en el Ecuador

1.5.2. Objetivos específicos

- Describir las características morfológicas del árbol de caoba (*Swietenia macrophylla*), hábitat y estado de conservación.
- Validar protocolos de desinfección para el cultivo *in vitro* de segmentos nodales y hojas del árbol de caoba (*Swietenia macrophylla*).
- Evaluar protocolos de cultivo *in vitro* con factores de inducción a callos de la *Swietenia macrophylla*.

1.6. Hipótesis

Las condiciones de cultivo *in vitro* incluyendo la composición del medio y las técnicas de desinfección de explantes contribuyen a una respuesta positiva a la callogénesis de la caoba (*Swietenia macrophylla*).

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. *Swietenia macrophylla* (Árbol de Caoba)

2.1.1. Localización

La *Swietenia macrophylla*, conocida como caoba brasileña, caoba de Honduras o solo árbol de caoba, es un árbol tropical que se distribuye en América Central, América del Sur y ciertas partes del Caribe (Louman, 2001). Su hábitat abarca altitudes de 0 a 1500 metros sobre el nivel del mar, con condiciones climáticas que incluyen temperaturas mínimas de 25 °C y máximas de 39 °C, y niveles de precipitación que oscilan entre 2200 y 5000 milímetros (Instituto Nacional de Bosques, 2017). Este árbol prospera en suelos profundos, no drenados, con composiciones que pueden ser franco arcillosas o franco arenosas, y tiene una baja tolerancia hacia la alcalinidad con una inclinación hacia la neutralidad (CONABIO, 2004).

La caoba de Honduras es originaria de América Central, siendo países como Honduras, Nicaragua, Belice y Guatemala reconocidos por albergar bosques de caoba. Además, se encuentra presente en diversas regiones de Suramérica, cómo Perú, Colombia, Brasil, Venezuela, Ecuador y Bolivia. En el Caribe, también se puede hallar en islas como República Dominicana y Cuba (ESPOL, 2019).

2.1.2. Taxonomía

Swietenia macrophylla también llamado caoba de Honduras o caobo de hoja grande, “aguano”, “zopilote” (*NaturaLista Colombia*, 2023) presenta la clasificación taxonómica descrita en la Tabla 1.

Tabla 1.

Taxonomía de la Caoba

| | |
|-----------|---------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Sapindales |
| Familia: | Meliaceae |
| Género: | Swietenia |

Elaborado por los autores, 2024

2.1.3. Descripción

El árbol, perennifolio en cultivo debido a la disponibilidad constante de agua, alcanza alturas de 35 a 50 metros o más, es monoico, con una copa abierta y redondeada, y un tronco recto y grueso, cilíndrico, con contrafuertes (Sánchez, 2016).

Las hojas, que pueden ser alternas y tener pinnas opuestas o ocasionalmente tener pinnas impares, tienen una longitud que oscila entre los 12 y los 40 cm, incluyendo el pecíolo. Constan de 3 a 6 pares de folíolos opuestos, poco peciolados, de forma lanceolada a ovada con base asimétrica, margen entero y ápice largo acuminado. Son de textura gruesa, de color verde oscuro brillante en el haz y más claras en el envés, con 8 a 12 pares de nervios laterales (Instituto Nacional de Bosques, 2017).

Las flores, unisexuales y aromáticas, son verdoso-amarillentas, son actinomorfas, de 6 a 8 mm de diámetro, con cáliz acopado y 5 lóbulos redondeados de 1 a 1,5 mm de largo (Instituto Nacional de Bosques, 2017).

Los frutos son estructuras en forma de cápsulas leñosas, ya sea ovoides u oblongas, que se mantienen erguidas y varían en tonalidades entre marrón-grisáceo y marrón rojizo. Tienen dimensiones que oscilan entre los 12 y 18 cm de largo por 8 cm de ancho, y se abren mediante 4-5 valvas al madurar. Cada fruto contiene alrededor de 35-60 semillas planas, de color marrón castaño, de 1 cm de largo, con una prolongación en forma de ala de 6 a 7 cm de longitud (Sánchez, 2016).

2.1.4. Propiedades y Beneficios

No existen pruebas médicas sólidas sobre sus beneficios, aun así, la *Swietenia macrophylla* ha sido por tradición considerada para tratar afecciones como fiebre tifoidea, diarrea y fiebre (Grupo de Trabajo de la Dirección de Planeación y Política Ambiental et al., 2018). Investigaciones sugieren un posible potencial en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y neuroinflamatorios. Se han empleado las semillas en terapias alternativas, alegando su eficacia para el dolor de muelas, pero se ha informado de daño hepático o hepatotoxicidad asociado al consumo de semillas crudas, molidas o en forma de cápsulas (*NaturaLista Colombia*, 2023).

2.1.5. Hábitat

Se encuentra en altitudes que oscilan entre 0 y 1500 metros sobre el nivel del mar, en áreas con temperaturas que varían desde 25 °C hasta 39 °C, requiere precipitaciones anuales que van desde 2200 a 5000 mm y se adapta a suelos profundos, no drenados, donde predominan francos arcillosos o francos arenosos (Sánchez, 2016). Necesita luz, aunque puede tolerar sombra

durante su etapa juvenil y su capacidad para crecer en estas condiciones se debe a su desarrollo en áreas con abundantes especies de árboles de considerable tamaño. En los primeros años de vida, debe crecer a pesar de la limitada insolación debido a otros árboles, hasta alcanzar una altura que le permita destacarse entre ellos (Arroyo, 2021).

2.1.6. Enfermedades

Las enfermedades en especies arbóreas suelen ser comunes y en su cotidianidad no son peligrosas si son tratadas a tiempo. La mayoría de estas enfermedades suelen ser ocasionadas por plagas o microorganismos como hongos y levaduras, que depende mucho del hábitat y entorno donde se desarrolle la especie (Ajardina, 2021). En las hojas de Caoba suelen aparecer lo que se conoce como manchas foliares, que pueden ser ocasionadas por luz solar, riego, o en la mayoría de ocasiones por hongos (Cibrian & García, 2008). El proceso comienza con la esporulación de los hongos, que ocasionan las manchas cuya ubicación suele ser aleatoria y dispersa, ya que se propaga a través de las lluvias. Estas pueden aparecer al inferior de las hojas o en el interior de la planta donde hay mayor humedad. (*Caoba Cuidados (Plantando, Fertilizantes, Enfermedades)*, n.d.)

2.1.7. Hongos endófitos y enfermedades

Los hongos endófitos son organismos microscópicos que habitan en el interior de las plantas sin causarles ningún daño que establecen una relación simbiótica con sus hospedantes, la mayor parte del ciclo de vida de estos hongos se desarrolla dentro de los tejidos vegetales, donde encuentran un ambiente favorable para su crecimiento. (Sánchez et al., 2013)

En los experimentos de cultivo *in vitro* de leñosas, establecen que los hongos endófitos presentes en estas especies suelen ser hongos filamentosos, por ejemplo, *Curvularia*. (Bauer &

Francis, n.d.). En la Caoba, se han realizado estudios que muestran la presencia de Hypocreales (Trichoderma, Fusarium, Hypocrea) y Cladosporium, Alternaria, Cercospora, Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Mucor. (Arguedas, 2007)

Las enfermedades en las plantas causadas por plagas o fitopatógenos son una limitante para cualquier tipo de cultivo, que impide obtener los resultados deseados y el desarrollo integral de la planta (Muñoz et al., n.d.). Los fitopatógenos pueden ser huéspedes en la semilla, parte vegetativa, frutos y las malezas del cultivo, de tal manera se establece la importancia de aplicar formulaciones de cultivo *in vitro* con antifúngicos para evitar el crecimiento microbiano (Arnaldoa, 2017).

2.1.8. Estado de conservación

La *Swietenia macrophylla* ha sido explotada desde la época colonial y se encuentra clasificada como una especie vulnerable debido a su alta valoración como madera a nivel mundial, gracias a su durabilidad. Esta especie constituye una importante fuente de divisas para Brasil y Bolivia, ya que poseen una industria significativa centrada en este recurso natural renovable, lo que la convierte una de las más destacadas en América Latina (Arroyo, 2021).

Legislación política y conservación:

El 1 de noviembre del 2017 se presentó el Acuerdo Ministerial N° 090 respecto a la veda de la caoba, este impide la utilización y venta de esta especie que está en riesgo de desaparecer en los próximos 10 años, cito los siguientes artículos que dispone el Acuerdo ministerial N° 090:

“Art. 1.- Establecer en todo el territorio continental del Ecuador la veda de la especie *Swietenia macrophylla* (caoba/ahuano), entendiéndose como tal la prohibición de la corta de árboles y

aprovechamiento de la referida especie, sus partes o derivados que se identifiquen de manera fácil, por el plazo de diez (10) años.”

“Art. 2.- La veda de la especie *Swietenia macrophylla* (caoba/ahuano) se aplicará indistintamente para las poblaciones existentes que se encuentren en bosque natural, regeneración natural, árboles relictos y otras formaciones vegetales silvestres.”

“Art. 3.- Se excluyen de este Acuerdo Ministerial las plantaciones forestales de especies CITES, mismas que continúan bajo la aprobación de la Autoridad Ambiental Nacional.”

“Art. 4.- El incumplimiento a las disposiciones establecidas en el presente Acuerdo, será sancionado de conformidad con la normativa aplicable.”

En el Acuerdo Ministerial N° 090 se determinaron ciertas disposiciones generales las cuales cito textualmente al Acuerdo:

“PRIMERA.- La Autoridad Ambiental Nacional, elaborará e implementará un Plan de Acción para la conservación y alternativas de manejo integral sostenible de los recursos naturales existentes en las comunidades locales ubicadas en las zonas en las que se encuentran las poblaciones naturales de la especie *Swietenia macrophylla* (caoba/ahuano), para fomentar e impulsar en estas zonas, actividades de desarrollo sostenible como turismo ecológico, investigación, bioemprendimientos y biocomercio que permitirán aprovechar las oportunidades y potencialidades de las comunidades locales.”

“SEGUNDA. - Durante el tiempo que dure la veda, la Autoridad Ambiental Nacional implementará las acciones técnico-administrativas que permitan determinar la necesidad de reducir o ampliar su vigencia.”

La disposición transitoria conforme al Acuerdo Ministerial N° 090 se determinó lo siguiente:

“La Autoridad Ambiental Nacional priorizará la realización de estudios para conocer el estado poblacional de la especie *Swietenia macrophylla*, para determinar si existe amenaza o riesgo de extinción, Dichos estudios se realizarán en un plazo de tres (3) años, contados a parte de la suscripción el presente acuerdo ministerial.”

Si no hay estudios técnicos adecuados disponibles, este acuerdo seguirá en efecto por otros cinco (5) años. Respecto a la legislación y política de conservación según (Ministerio del Ambiente y Granizo Tamayo, 2017)

2.1.9. Herborización

Una colección biológica se refiere a un banco de datos que forma parte del patrimonio natural de un país o región. Esta información es fundamental para diversas disciplinas, como la ecología, taxonomía, conservación, entre otras (Velázquez Ramirez, 2018). Los herbarios son ejemplos de colecciones biológicas que preservan plantas o partes de ellas, deshidratadas y dispuestas en cartulinas, en representación de conjuntos de plantas vasculares con raíces, tallos y hojas reales. Incluyen estructuras como hojas, flores y frutos, las cuales permiten su identificación taxonómica. Estas colecciones se organizan según un sistema de clasificación determinado y se almacenan para su estudio y consulta (Cristín y Perrilliat, 2011; Arnelas et al., 2012).

2.2. Cultivo *In Vitro*

El cultivo de tejidos vegetales engloba técnicas que buscan aislar una porción de planta y proporcionarle condiciones físicas y químicas específicas para maximizar la expresión celular

(Roca et al., 1991). Se requiere un riguroso protocolo de sanidad para evitar la contaminación microbiana durante el proceso (SAGARPA, 2017). El resultado del cultivo dependerá de sus objetivos, donde puede generar estructuras como callos o formas más diferenciadas, tales como tallos, raíces u otros órganos (Morgan, 2011).

Esta herramienta posibilita la propagación masiva de especies vegetales, que permite adquirir plantas de alta calidad, libres de enfermedades y estables a nivel genético. Además, tiene aplicaciones en la restauración de plantas en riesgo de extinción, ingeniería genética, fitorremediación, entre otros usos, con un uso mínimo de espacio y tiempo necesarios en comparación con técnicas tradicionales de cultivo (Seguí, 2011, pág 291).

En el ámbito del cultivo *in vitro* de especies vegetales leñosas, se emplean diversas técnicas para lograr con éxito el cultivo de un explante (Alcántara et al., 2017). Sin embargo, según Perugorria, exigen técnicas complejas para este procedimiento debido a los problemas de oxidación y ambientación que sufren este tipo de especies.

La organogénesis y la embriogénesis directas son procesos que generan brotes, raíces o flores y embriones somáticos, respectivamente, a partir de tejido vegetal. En contraste, la morfogénesis indirecta, también conocida como diferenciación de órganos a partir de callos, comienza con la siembra de un explante *in vitro*, lo que conduce a la proliferación desordenada de células y la formación de callos o suspensiones celulares. (Radice, 1997).

2.2.1. Medios de cultivo en especies leñosas

Un medio de cultivo se puede definir como una combinación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos esenciales para la nutrición y manipulación de los cultivos (ArgenBio,

2004). Este medio, por lo general, debe contener macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares y gelificantes. La composición específica puede variar según el genotipo de la planta y los objetivos de la investigación.

El avance de diferentes tácticas en el cultivo de tejidos se basa en la habilidad de las células vegetales para regenerar una planta completa, que sea idéntica a la original o de acuerdo con lo deseado, la formación de callos. Esto se logra mediante la introducción de hormonas de crecimiento, tales como auxinas y citoquininas, que desencadenan una serie de respuestas en las células vegetales. Estas respuestas, a su vez, provocan cambios significativos en procesos metabólicos, genéticos y morfológicos, con el fin de obtener resultados de interés en el ámbito de la investigación (Perea, 2009).

Las especies leñosas manifiestan grandes desafíos al momento de establecer un protocolo de cultivo *in vitro* debido a una serie de factores tales como las características propias de las leñosas a las cuáles se atribuye su lento crecimiento, la complejidad de su estructura celular, su rápida oxidación y la producción de metabolitos secundarios que las hacen más susceptibles a la contaminación y dificultan su desarrollo en condiciones artificiales.

A esto se suman las limitantes del proceso *in vitro* en sí, como la necesidad de un medio de cultivo específico para cada especie, el control exacto de las condiciones ambientales y la manipulación cuidadosa de los explantes para evitar daños y necrosis (Castillo, 2004). La elección del explante adecuado, su estado fisiológico y la sanidad del material vegetal también son aspectos críticos por considerar (ArgenBio, 2004).

Los mejores medios para el desarrollo de estas especies son el medio Murashige & Skoog (MS) y el medio WPM (Wood Plant Medium). (Pérez et al., 2006)

El medio Murashige y Skoog (MS) es recomendado en investigaciones de siembra de tejidos vegetales debido a su facilidad y versatilidad, este medio se originó con el cultivo *in vitro* de tabaco como modelo, que utiliza un enfoque cuantitativo para determinar las concentraciones óptimas de nutrientes (Krikorian, 1991). Aunque es apto para la mayoría de las especies y muy utilizado, es necesario averiguar las necesidades y condiciones de la especie que se va a estudiar para poder formular de manera adecuada el medio de cultivo (Universidad Abierta y a Distancia de México, n.d.).

Las plantas no pueden subsistir solo con aire y agua; necesitan varios elementos químicos que se obtienen de las sustancias minerales en el suelo a través de su sistema radicular, aunque estos elementos representan solo una pequeña fracción del peso anhidro de la planta en el rango del 2-10%, siguen siendo vitales para el bienestar del vegetal (Pérez, 2017, pág 6). Los elementos esenciales que todas las plantas requieren y que se encuentran en los fertilizantes comunes también forman parte de los medios de cultivo (Pérez, 2017). Los componentes son: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe). Además, se incluyen los elementos menores, esenciales pero requeridos en cantidades muy pequeñas, como Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) y Yodo (I) que forman parte del medio MS (Arroyo, 2021).

En los medios, se suele emplear sacarosa en concentraciones que oscilan entre el 2% y el 5%. La utilización de una fuente de carbono es crucial, ya que los explantes no son en su

totalidad autótrofos y no pueden satisfacer sus necesidades mediante la fotosíntesis cuando se encuentran *in vitro*. (Segretín, 2013)

Es posible que sea necesario incorporar ciertas vitaminas al medio de cultivo para promover el desarrollo de los cultivos *in vitro*, es así como la tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico pueden promover el desarrollo y crecimiento de los cultivos al adicionarse en el medio (Krikorian, 1991).

Otros compuestos orgánicos utilizados por lo regular en el cultivo de tejidos incluyen inositol, adenina, sulfato de adenina, ácido cítrico y ácido ascórbico (para prevenir la oxidación de los tejidos). (Arroyo, 2021). Los antioxidantes son aquellas sustancias utilizadas dentro de un medio de cultivo *in vitro* que retarda o previene la oxidación en explantes y favorecen su desarrollo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que una alta concentración o un desequilibrio en estos, puede ser tóxico para las plantas y/o explantes. (García et al., 2001)

El ácido ascórbico disminuye el estrés oxidativo de las células del explante cultivado *in vitro* e induce su respuesta al crecimiento, de igual forma evita la fenolización de los explantes, es decir que los tejidos vegetales se tornen oscuros por la oxidación de compuestos fenólicos liberados por el daño de celular generado por el corte. (Mora, 2011)

El carbón activado tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas ya que atrapa diferentes tipos de moléculas, sustancias en exceso como los inhibidores de crecimiento, lo que favorece diferentes procesos de morfogénesis y la respuesta en el cultivo de tejidos. (Vaca et al., 2018)

Los cultivos vegetales indiferenciados se generan a partir de órganos o tejidos organizados cultivados en un medio nutritivo adecuado, ya sea sólido o líquido. En medios sólidos, se generan agrupaciones celulares más o menos densas, denominadas callos, mientras que en medios líquidos se desarrollan suspensiones celulares con células independientes o agrupadas. La elección entre cultivo líquido y sólido depende de la especie en cuestión. El agar, extraído de diversas algas marinas, es el gelificante más utilizado en el cultivo *in vitro*, con una aplicación general en concentraciones entre 0,6% y 0,8% para evitar una solidificación excesiva (ArgenBio, 2004).

2.2.2. Condiciones de crecimiento

El crecimiento de las plantas está influenciado por el pH del medio, siendo óptimo entre 5 y 6.5, aunque existe variabilidad según la especie (Kluepfel et al., 2016). Aunque el pH no afecta el desarrollo de los explantes, puede limitar el crecimiento o influir en la diferenciación celular o formación de callos. (Pelacho et al., 2005).

La temperatura ideal para un cultivo *in vitro* oscila entre los 25°C hasta los 28°C, permitiendo el desarrollo del explante (Perea, 2009). La luminosidad también juega un papel importante en el desarrollo del tejido y es importante considerar que cada especie puede tener una respuesta distinta ante el estímulo de luz para la formación de callos, algunos se forman en períodos de luz, y otros en completa oscuridad. (Rosas, 2022)

2.3. Fases del cultivo *in vitro*

El propósito del cultivo *in vitro* posibilita una variedad de cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos en la regeneración de tejidos vegetales mediante el uso de reguladores de

crecimiento, los mismos que alteran procesos metabólicos y resultan en logros significativos en el desarrollo vegetal (Perea, 2009).

2.3.1. Fase 0: Fase preparativa

Durante este período, los procesos clave que se controlan son la selección, el aislamiento y la descontaminación de los explantes (Nieto & Valdivieso, 2013). Es fundamental que las plantas seleccionadas exhiban características importantes para el proceso. Se recomienda contar con plantas sanas, vigorosas y estables para no alterar los procesos *in vitro*. Los tejidos utilizados suelen ser jóvenes y/o segmentos nodales en crecimiento activo. Una vez seleccionada la planta madre y los tejidos a utilizar, se procede con su desinfección (Castillo, 2004).

El punto crítico de un cultivo *in vitro* radica en la esterilización del explante, dado que cuando se trata de establecer los cultivos, la contaminación microbiana es muy probable. El ambiente establecido para el explante en el medio de cultivo, junto a las condiciones de incubación es adecuado para la proliferación de muchos microorganismos que provocan la destrucción de los cultivos, aunque en el mejor de los casos no destruyan el cultivo, pero sí compitan con este por los nutrientes del medio. (*Cultivo De Tejidos Vegetales*, 2012)

El protocolo de desinfección tiene como objetivo asegurar un crecimiento óptimo del material vegetal, en especial cuando proviene de áreas silvestres (García et al., 2015). Se emplean detergentes y desinfectantes para penetrar en el tejido y eliminar cualquier agente contaminante. Dado que no todos los explantes requieren el mismo proceso de desinfección, se diseñan tratamientos variados, incluidos insecticidas, fungicidas y bactericidas (Zaldua, 2024). La desinfección implica lavado con agua corriente, inmersión en etanol al 70%, concentraciones variables de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio más adición de Tween 80 para que el

hipoclorito pueda penetrar mejor en el tejido, y para finalizar un enjuague posterior con agua destilada estéril (ArgenBio, 2004).

2.3.2. Fase 1: Establecimiento *in vitro*

Después de la desinfección de explantes, se colocan en completa esterilidad, en un medio de cultivo, dando inicio al proceso de regeneración de tejidos vegetales en un ambiente controlado. Para su establecimiento completo, se ubican en una sala de incubación que mantengan las condiciones necesarias para su regeneración. (Arroyo, 2021).

2.3.3. Fase 2: Multiplicación

Esta etapa tiene como objetivo mantener y aumentar la cantidad de callos para los subcultivos sucesivos y destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. Se pueden dar dos vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, de forma directa o indirecta, siendo esta última la formación de callo, inducida por altas concentraciones de auxinas (Perea, 2009).

2.4. Callogénesis

La callogénesis es el proceso de formación de callo, es decir tejido vegetal amorfo, desorganizado, que se origina a partir de células indiferenciadas del explante ya que tiene la capacidad de dividirse y proliferar en un medio de cultivo adecuado, dando lugar a la formación de nuevas plantas (Rodríguez Bearud, 2014).

Reguladores de crecimiento para inducción de callos

Los reguladores de crecimiento conocidos como hormonas o fitohormonas son componentes clave que determinarán el tipo de respuesta morfogénica de un explante en el cultivo *in vitro*, con una regulación del metabolismo durante el crecimiento y desarrollo de la

planta (Alcántara et al., 2019). Para lograr resultados óptimos, es crucial utilizar diferentes tipos de hormonas debido a las interacciones entre ellas. Entre los principales reguladores de crecimiento para la formación de callos se incluyen auxinas y citocininas (Fichet, n.d.). La alta concentración de auxinas conduce a la formación de callo, un ejemplo de estas conocido como ácido 3-indolacético (IAA), es el compuesto más abundante y con una fisiología relevante. También existen auxinas sintéticas con actividad similar a las naturales, como el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Garay et al., 2014).

Las citocininas son derivados de la base adenina con varias sustituciones en su posición N6, donde ha mostrado un efecto hormonal cuando se inducen junto con auxinas, lo que resulta en diversos tipos de morfogénesis, el agente BAP (Bencil Amino Purina) puede utilizarse en distintas concentraciones de 0,1 mg/l hasta 10 mg/l. (Jordán & Casaretto, 2006).

Estas sustancias promueven la división celular y regulan el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales (Segretín, 2013). Se pueden usar en combinación o por separado, donde de acuerdo con cada especie se realiza un estudio para conocer la concentración más adecuada (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, 2021).

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Materiales

Se emplearon variados insumos fundamentales en el laboratorio con el fin de ejecutar de manera efectiva las diferentes actividades que se describen en los procedimientos metodológicos siguientes. En el **Anexo 1**, se presenta el inventario de materiales empleados en el proceso de herborización y posterior a ello, de cultivo *in vitro*, junto con la relación de materiales, instrumentos y reactivos esenciales para la segunda etapa de la investigación en el entorno de laboratorio (**Anexo 2**).

3.2. Metodología de investigación

La investigación de esta tesis adopta un enfoque de campo, investigativo y experimental, donde en la fase de investigación, se realiza la recopilación de datos y fundamentación teórica de manera exhaustiva de la literatura especializada que se enfocó en la consulta de papers y artículos científicos en base a nuestro tema de interés; su taxonomía y caracterización y las diversas técnicas de propagación *in vitro* de la *Swietenia macrophylla*.

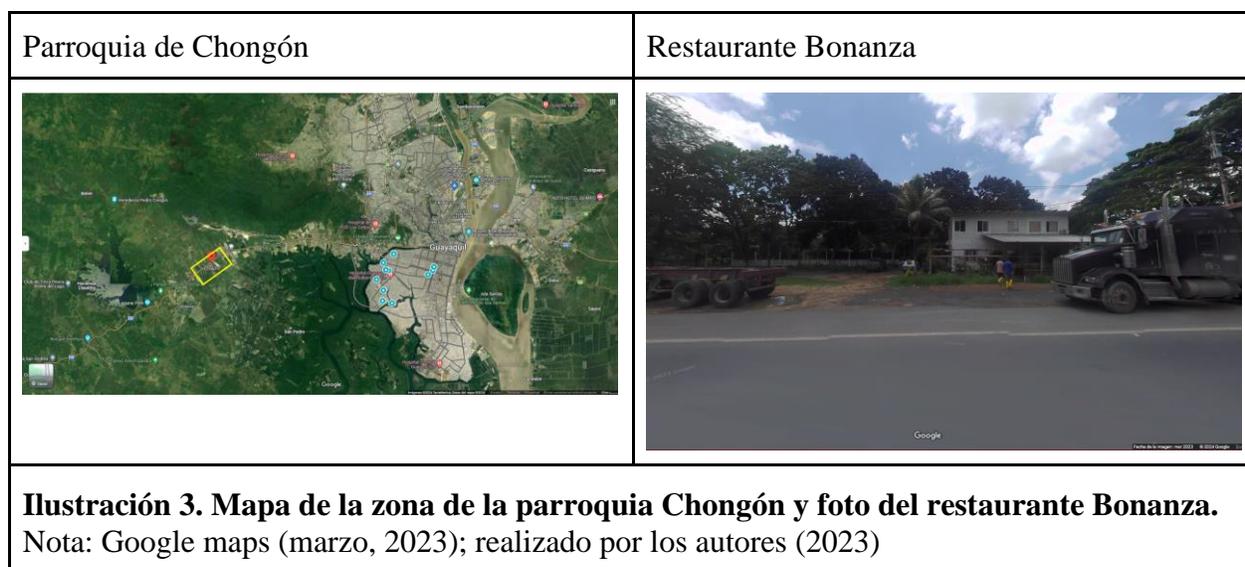
3.3. Localización del ensayo

La elección estratégica del laboratorio de Biotecnología Vegetal en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana con la finalidad de llevar a cabo este estudio sobre la propagación *in vitro* para inducir la callogénesis en la *Swietenia macrophylla* (caoba) demostró la importancia de la localización en la ejecución del experimento. La conveniencia de esta ubicación radicó en los recursos otorgados por la universidad, con un beneficio al desarrollo

de la investigación gracias a su infraestructura avanzada y los recursos especializados proporcionados por el laboratorio, que incluyen condiciones controladas de temperatura, humedad y equipos adecuados. La ubicación en el campus María Auxiliadora no solo facilitó el acceso a instalaciones especializadas, sino que también permitió la colaboración con expertos en fitopatología y biotecnología, que cuenta con un entorno propicio para el avance de la investigación en esta área específica.

3.4. Selección, colecta y transporte del material vegetal

Las muestras de *Swietenia macrophylla* (Caoba), se colectaron en la provincia del Guayas, cantón Guayaquil, parroquia Chongón, en el restaurante Bonanza ubicado en Vía a la Costa Km 21 en las siguientes coordenadas Latitud 2°11'59.4"S 80°03'37.3"W.



Se llevó a cabo un estudio en la región de Vía a la costa, desde el campus María Auxiliadora hasta el Km 21, con el fin de identificar la presencia del árbol de Caoba. Esta

evaluación permitió detectar áreas específicas que albergaban este árbol que facilitan la selección precisa del material vegetal requerido para el estudio. La selección de esta especie se basa en su valor y estado de conservación actual. Se eligió como muestra vegetal para el ensayo, brotes jóvenes en constante crecimiento ya que la edad fisiológica del árbol juega un papel importante en la formación celular y en la respuesta en el cultivo *in vitro*, mientras más joven sea el explante, más rápida será su adaptación, lo que permite obtener resultados con base al experimento a desarrollar. (Salgado, n.d.)

3.5. Herborización del árbol de Caoba

El material vegetal para la herborización de Caoba fue elegido en la época del año entre enero y febrero, se recolectaron hojas y semillas, dado que las flores crecen en los periodos de octubre a noviembre (Universidad de Simón Bolívar, 2010). Según la metodología de Velázquez Ramírez (2018), se eligió material vegetal con hojas grandes para evitar la deformación de la muestra durante el proceso de prensado y secado. Se utilizó alcohol al 70% para preservar la muestra antes del prensado, el secado del material se realizó en ambiente externo y temperatura ambiental para su posterior herborización en cartulina.

Para identificar la especie se utilizó tanto la planta herborizada como partes de planta fresca y se comparó con fuentes bibliográficas y repositorios de herbarios certificados como Herbari Virtual de Mediterrani Occidental, International Plant Names Index (IPNI), Herbario Luis Fournier Origgi.

Se añadió la ficha botánica, donde aparece toda la información taxonómica, datos de la localidad, características de la planta, colectores, fecha de colección y datos del proyecto de investigación. (*Herborización De Muestras*, 2017).

3.6. Evaluación de reactivos para el cultivo *in vitro*

En esta etapa se analizaron concentraciones y tiempos en el que los explantes están expuestos a los reactivos, antes de la evaluación de protocolos de desinfección. Los reactivos fueron analizados para asegurar la integridad del tejido vegetal y poder prevenir su muerte, con el fin de obtener tejidos viables para su establecimiento *in vitro* (Borgues et al., 2009). Los órganos vegetales evaluados en esta fase fueron hojas y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla*. Los reactivos analizados fueron: alcohol etílico al 96% - 70%, tween 80, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, fungicida, jabón neutro, en base a protocolos de desinfección ya establecidos de acuerdo con los autores (Rojas & Hines, 2019) y (Vergara, 2016) en especies leñosas.

3.7. Protocolo de desinfección

Se utilizan tres tipos de desinfectantes a diferentes concentraciones (hipoclorito de sodio, alcohol al 96% - 70% e hipoclorito de calcio) más adición de Tween 80 y se evaluaron dos protocolos de desinfección para segmentos nodales, obtenidos de los brotes del árbol de Caoba.

3.7.1. Tratamientos

Se realizaron los tratamientos de desinfección de acuerdo con los protocolos establecidos para hojas y segmentos nodales, según Rojas & Hines (2019), en un estudio realizado para la micropropagación de clones del árbol de Caoba.

Los explantes fueron sometidos a limpieza mecánica (**Tabla 2**) para quitar cualquier impureza presente en la superficie y se enjuagó con abundante agua de grifo (Rebaza, 2020).

Tabla 2.

Desinfección de segmentos nodales

| Desinfección de segmentos nodales | |
|---|---------------|
| Desinfectante | Tiempo |
| Limpieza con jabón neutro | 10 min |
| Inmersión en alcohol al 96% | 3 min |
| Inmersión en hipoclorito de sodio al 3% + 3 gotas de Tween 80 | 10 min |

Elaborado por los autores, 2024

En condiciones asépticas dentro de una cabina de flujo laminar (BioAir Aura HZ48T), se procedió a enjuagar con agua destilada estéril y se realizaron cortes de los extremos de los explantes para evitar la siembra de material vegetal con daño por acción del desinfectante (Vergara, 2016). Por último, los segmentos nodales fueron trasplantados a tubos de ensayo que contengan medio de cultivo MS con sus respectivos tratamientos, y fueron llevados al cuarto de incubación para su desarrollo y posterior evaluación (Aguilera et al., 2021).

El segundo protocolo (**Tabla 3**) inició con una inmersión en una mezcla de agua y jabón líquido neutro, se cepillaron con delicadeza para eliminar cualquier contaminante superficial. Subsecuente, se enjuagaron con abundante agua y después se roció alcohol al 70% para

desinfectar (Rojas & Hines, 2019), se sumergió en una mezcla de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ i.a + 0.1 % de tween 80 y cuatro lavados c en la cámara de flujo laminar. (Rojas & Hines, 2019)

Tabla 3.

Segundo protocolo de desinfección para segmentos nodales.

| Segunda desinfección de segmentos nodales | |
|---|---------------|
| Desinfectante | Tiempo |
| Inmersión en agua + jabón neutro en agitación | 10 min |
| Cepillado y enjuagado con agua de grifo | - |
| Inmersión en hipoclorito de calcio al 15% + 10 gotas de tween 80 en agitación | 20 min |
| 4 enjuagues con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar | 2 min c/u |

Elaborado por los autores, 2024

Posterior a esto, los segmentos nodales fueron transferidos a tubos de ensayo que contienen el medio de cultivo MS formulado con fungicida de acuerdo con el tratamiento correspondiente, serán colocados en la sala de incubación para que crezcan y sean evaluados luego de cinco días (Rojas & Hines, 2019).

Se realizó una desinfección mecánica en hojas con jabón neutro y abundante agua del grifo (**Tabla 4**). Los explantes fueron sumergidos en una solución del fungicida-bactericida comercial Citrosan. Después, se trasladaron a la cabina de flujo laminar para someterlos a inmersión en NaClO al 1%. Luego de estas etapas, se realizaron tres enjuagues con agua destilada

estéril antes de proceder a la siembra en los recipientes que contienen el medio de cultivo (Marulanda & Gutiérrez, 2023)

Tabla 4.

Desinfección de hojas

| Desinfección de hojas | |
|---|---------------|
| Desinfectante | Tiempo |
| Cepillado con jabón neutro y enjuagado con agua de grifo | - |
| Inmersión en fungicida Citrosan al 1% | 20 min |
| Inmersión en hipoclorito de sodio al 1% | 10 min |
| Enjuagues con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar | 1 min c/u |

Elaborado por los autores, 2024

3.8. Adaptación al medio de cultivo para la inducción de callos

El medio de cultivo que se usó fue el Murashige y Skoog (MS) para el establecimiento de callos (Ramos, 2012). Se evaluó la concentración de sacarosa, auxina 2,4-D y períodos de luminosidad para la formación de callos en los explantes (hojas y nudos) para seleccionar la óptima (Rosas, 2022). El pH del medio se ajustó a un pH entre 5,6 - 6,0 para luego ser enriquecido con 13 g/L de Agar y carbón activado, las fitohormonas y las distintas concentraciones de sacarosa al medio (Cárdenas et al., 2023). Después, los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave por 30 min a 121°C al igual que todos los materiales e instrumentos de laboratorio. Los tratamientos se encuentran ilustrados en las siguientes tablas 5 y 6.

Tabla 5.*Tratamiento de segmentos nodales*

| Tratamientos (Total de réplicas= 36) | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|--------|----------|---|-------------------|----------|--------|----------|
| Fotoperíodo (16/8) | | | | | Oscuridad | | | |
| Segmentos nodales | | | | | Segmentos nodales | | | |
| Sacarosa | 0% | 2% | 8% | Medio MS + 1 mg/l BAP + Carbón A. + Agar | Sacarosa | 0% | 2% | 8% |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| Total | 9 | | | | Total | 9 | | |
| 2,4-D | 0,5 mg/l | 1 mg/l | 1,5 mg/l | Medio M.S + 30 gr Sacarosa + Carbón A. + Agar | 2,4-D | 0,5 mg/l | 1 mg/l | 1,5 mg/l |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| Total | 9 | | | | Total | 9 | | |

Elaborado por los autores, 2024

Tabla 6.*Tratamiento de Hojas*

| Tratamientos (Total de réplicas= 36) | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----|----|----|-------------------------|-----------------|----|----|----|
| Fotoperíodo (16/8) | | | | | Oscuridad | | | |
| Hojas | | | | | Hojas | | | |
| Sacarosa | 0% | 2% | 8% | Medio MS + 1 mg/l | Sacarosa | 0% | 2% | 8% |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | | |
|--------------|----------|--------|----------|--|--------------|-------------|--------|----------|
| | 1 | 1 | 1 | BAP + Carbón A. + Agar | | 1 | 1 | 1 |
| Total | 9 | | | | Total | 9 | | |
| 2,4-D | 0,5 mg/l | 1 mg/l | 1,5 mg/l | Medio MS + 30 gr Sacarosa + Carbón A. + Agar | 2,4-D | 0,5 mg/l | 1 mg/l | 1,5 mg/l |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 |
| Total | 9 | | | | Total | 9 | | |

Elaborado por los autores, 2024

Se evaluó la sacarosa a concentraciones de 0%, 2% y 8% para determinar la concentración óptima en segmentos nodales y hojas de brotes de Caoba. Se adicionó la citoquinina BAP a concentración de 1 mg/L como inductor de callos. (Barbón, 2006)

En el tratamiento con la auxina 2,4-D no fue adicionada la citoquinina BAP, al medio MS le fue añadido 30 gr de sacarosa y distintas concentraciones de la auxina a 0,5 mg/L - 1 mg/L - 1,5 mg/L. (Hernández, 2021)

Para el segundo experimento, donde fueron evaluados los segmentos nodales se formuló un medio con fungicida comercial (Phyton) y sulfato de estreptomycin presente en varios fungicidas agrícolas. El resto de los componentes siguen siendo los mismos evaluados en el primer experimento (Medio MS formulado con carbón activado y de acuerdo con cada

tratamiento, sacarosa y 2,4-D). Se llevaron los explantes a cabina de flujo laminar y se sembraron en cada tratamiento, de acuerdo con sacarosa, 2,4-D y tiempos de luz (Rojas & Hines, 2019).

Tabla 7.

Segundo experimento con segmentos nodales

| Tratamientos (Total de réplicas= 36) | | | | | | | | | |
|---|----------|--------|----------|---|--------------------------|----------|--------|----------|--|
| Fotoperíodo (16/8) | | | | | Oscuridad | | | | |
| Segmentos nodales | | | | | Segmentos nodales | | | | |
| Sacarosa | 0% | 2% | 8% | Medio MS + 1 mg/l BAP + Carbón A.+ Sulfato de estreptomicina + Fungicida Phyton + Agar | Sacarosa | 0% | 2% | 8% | |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | |
| Total | 9 | | | | Total | 9 | | | |
| 2,4-D | 0,5 mg/l | 1 mg/l | 1,5 mg/l | Medio MS + 10 gr Sacarosa + Carbón A. + Sulfato de estreptomicina + Fungicida Phyton + Agar | 2,4-D | 0,5 mg/l | 1 mg/l | 1,5 mg/l | |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | |
| | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | |
| Total | 9 | | | | Total | 9 | | | |

Elaborado por los autores, 2024

Luego de la desinfección, en cabina de flujo laminar se cortaron los explantes (segmentos nodales y hojas) en fragmentos de una longitud entre 2 a 5 cm y se colocaron 3 fragmentos de hojas en cada caja petri, de igual manera 1 segmento nodal en cada tubo de ensayo (Vergara, 2016). De manera inmediata, los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo e incubados a una temperatura entre 25°C a 28°C, a oscuridad constante y fotoperíodos 16/8 horas para identificar la condición de luminosidad óptima en el proceso de inducción a callo. (Rosas, 2022)

3.8.1. Factores de estudio

Primera evaluación (Hojas y segmentos nodales)

- a) **Concentraciones de sacarosa:** 0% - 2% - 8%
- b) **Concentraciones de 2,4-D:** 0,5 - 1 - 1,5 mg/L
- c) **Tiempos de luz:** Oscuridad total - Fotoperíodos 16h luz - 8h oscuridad

Segunda evaluación (Segmentos nodales)

- a) **Concentraciones de sacarosa:** 0% - 2% - 8%
- b) **Concentraciones de 2,4-D:** 0,5 - 1 - 1,5 mg/L
- c) **Tiempos de luz:** Oscuridad total - Fotoperíodos 16h luz - 8h oscuridad

3.8.2. Unidad experimental

Para los nudos y hojas, la unidad experimental está conformada por 36 cajas petri con 20 ml de medio para hojas con 3 fragmentos de hoja por caja, y 36 tubos de ensayo para segmentos nodales con 1 fragmento por cada tubo de Caoba de acuerdo con cada tratamiento.

La segunda siembra respecto al segundo experimento, solo se realizó con segmentos nodales, la unidad experimental fue conformada por 12 tubos de ensayo con 25 ml de medio para fotoperiodo 16/8 y 12 tubos de ensayo para oscuridad total de acuerdo con cada tratamiento.

3.9.3 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando el programa StatGraphics Centurion, usando como herramientas el análisis de varianza simple (ANOVA) con una significancia del 95%. El análisis no paramétrico para K de muestras independientes (Kruskar Wallis) con una significancia del 95%.

3.9. Variables y métodos de evaluación sobre la inducción a callos

3.9.1. Formación de callos

Se realizó mediante observación visual cada 7 días durante 5 semanas. Se calificó la ausencia y la formación de callos de acuerdo con la escala detallada en la siguiente tabla.

Tabla 8. Descripción de la escala empleada por (Hernández et al., 2021)

| Grado | Inducción de callos | Observación |
|--------------|-------------------------------|---|
| 0 | El callo no se formó | - |
| 1 | Formación ligera del callo | Débil proliferación |
| 2 | Formación del callo | Proliferación de células por todos los bordes del explante sin llegar a formar una masa |
| 3 | Abundante formación del callo | Formación de una masa voluminosa de callos |

Elaborado por los autores, 2024

3.9.2. Número de callos por explante/tratamiento

El número total de callos formados fueron contabilizados cada 7 días mediante observación visual por 5 semanas. Se calificó la ausencia de callos con el valor 0 y de presencia con el valor numérico 1.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Descripción morfológica de las hojas y semillas de *S. macrophylla*

Se realizó una descripción morfológica de las hojas y semillas de caoba, según los parámetros botánicos que corresponden a una publicación del Instituto Nacional de Bosques de Guatemala (Instituto Nacional de Bosques, 2017). Se observó hojas compuestas, paripinnadas, que contienen entre 3 a 5 pares de folíolos con un diámetro de longitud que varía entre los 8 a 15 cm. Se pudo determinar que la textura de las hojas es coriácea en ambas superficies, es decir, que mantiene una textura similar al cuero, dura y resistente, lisa al tacto y gruesa (Sánchez, 2016). El margen de las hojas es entero y poco curvado hacia arriba. La nervadura de las hojas es pinnada, con el nervio central prominente y el pecíolo de las hojas mide entre 2 y 5 cm de largo, glabro (que carece de vellosidad en la superficie). En la ilustración 4 se aprecia la descripción realizada.

Ilustración 4. Muestra botánica, hojas de *Swietenia macrophylla*.



Elaborado por autores, 2024

También se logró determinar las características del fruto de *S. macrophylla*, en donde se observó una cápsula leñosa, dura, de forma ovoide, con un tamaño que varía entre 12 y 22 cm de largo y 6 a 10 cm de ancho según medición con regla, esto concuerda con investigaciones realizadas por los autores (Flores, 2010). Su color es marrón rojizo, y se abre desde la base en válvulas, que coincide con la descripción en la publicación del Instituto Nacional de Bosques (Instituto Nacional de Bosques, 2017). Las semillas se ubican en su interior, que son de forma irregular y alargadas, de color canela de 1 cm de largo aproximadamente y con un ala que mide entre 6 y 7 cm como se observa en la siguiente ilustración.

Ilustración 5. Muestra botánica, semillas de *S. macrophylla*



Elaborado por autores, 2024

4.2. Comparación de las muestras herborizadas

Se revisaron datos de herbarios en línea para comparar las características morfológicas de la especie en estudio con otras especies similares. Esto se hizo con el fin de identificar y

confirmar las características de la especie en cuestión. Para determinar que las hojas poseían la forma correspondiente a la especie *Swietenia macrophylla* se realizaron comparaciones en distintos repositorios digitales que conserven la muestra vegetal. Se determinó que la distribución paripinnada de los folíolos concordaba con la distribución foliar, incluyendo la nervadura de la especie de las muestras de la colección de datos (**Anexo 3**) de la Red de Herbarios del Noroeste de México, con una especie proveniente de Florida (University of Florida Herbarium (FLAS), 2014) y de Puerto Rico (Arizona State University Vascular Plant Herbarium, 2008).

Para el fruto y semillas de la especie (**Anexo 3**) se realizó la misma revisión bibliográfica basada en la observación de las muestras conservadas. Se logró observar la similitud en el fruto y semillas de acuerdo con el repositorio digital Field Museum Botanical Collection, con una muestra herborizada proveniente de Perú.

4.3. Desinfección de explantes

Tabla 9.

Desinfección de hojas con Hipoclorito de Sodio

| Tratamientos | Réplicas (unidades) | Resultados (unidades) | | |
|---------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|
| | | Contaminación fúngica | Explantes muertos | Explantes vivos |
| Sacarosa (%) | | | | |
| 0 | 6 | 5 | 0 | 6 |
| 2 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 8 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 2,4-D (mg/l) | | | | |
| 0,5 | 6 | 5 | 0 | 6 |

| | | | | |
|-----|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 1,5 | 6 | 6 | 0 | 6 |

Elaborado por los autores, 2024

Tabla 10.

Desinfección en segmentos nodales con Hipoclorito de Sodio

| Tratamientos | Réplicas (unidades) | Resultados (unidades) | | |
|---------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------|
| Sacarosa (%) | | Contaminación fúngica | Explantos muertos | Explantos vivos |
| 0 | 6 | 5 | 0 | 6 |
| 2 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 8 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 2,4-D (mg/l) | | | | |
| 0,5 | 6 | 5 | 0 | 6 |
| 1 | 6 | 5 | 0 | 6 |
| 1,5 | 6 | 6 | 0 | 6 |

Elaborado por los autores, 2024

De acuerdo al primer protocolo de desinfección realizado en hojas y segmentos nodales, a partir del quinto día de siembra se presentó contaminación fúngica como se evidencia en las tablas 9 y 10. Se determinó la presencia de hongos filamentosos en el tratamiento de fotoperiodo, donde de las 36 réplicas 10 presentaron contaminación mayoritaria desde un inicio, de igual forma se pudo evidenciar la presencia de la contaminación en proporciones altas en el

tratamiento de sacarosa comparado con el tratamiento de 2,4-D. Según el estudio realizado por Arroyo en 2021, las plantas que se desarrollan *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica, no pueden producir todo el azúcar que necesitan, por lo que se añaden altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo, pero puede resultar contraproducente debido a que es una fuente de carbono directo para hongos endófitos (Sánchez et al., 2013).

En el **Anexo 4** se encuentran los resultados de la desinfección por cada tratamiento. En condiciones de oscuridad, al quinto día solo 8 explantes se encontraban contaminados. Al séptimo día 69 de las 72 réplicas ya se encontraban contaminadas en su totalidad, siendo las únicas réplicas libres de contaminación, aquellas correspondientes a los tratamientos de 0,5 a 1 de 2,4-D y 0% sacarosa después de los 30 días de evaluación en segmentos nodales.

Tabla 11.

Desinfección de segmentos nodales con Hipoclorito de Calcio

| Tratamientos | Réplicas (unidades) | Resultados (unidades) | | |
|---------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Sacarosa (%) | | Contaminación fúngica | Explantes muertos | Explantes vivos |
| 0 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 2 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 8 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 2,4-D (mg/l) | | | | |
| 0,5 | 6 | 6 | 0 | 6 |
| 1 | 6 | 6 | 0 | 6 |

1,5

6

6

0

6

Elaborado por los autores, 2024

El tratamiento con hipoclorito de calcio evaluado en segmentos nodales presentó el mismo resultado. A partir del quinto día se presencié contaminación fúngica en todos los explantes, notándose la presencia del mismo hongo que proliferó en el tratamiento con hipoclorito de sodio. En el estudio de Rojas & Hines (2019), demostraron que el tratamiento con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ obtuvo el porcentaje más bajo de explantes muertos y contaminación en el cultivo *in vitro* para *S. macrophylla*, a comparación de los tratamientos realizados con NaCl, los cuáles presentaron una alta tasa de contaminación.

A pesar de haber realizado protocolos de desinfección basados en revisión bibliográfica, y haber tenido un comportamiento estricto al momento de manipular los explantes antes de ser sembrados, no fue suficiente para evitar el crecimiento microbiano. La presencia de agentes contaminantes en los cultivos *in vitro* se debe a varios factores, entre los que destacan la relación del explante con el medio, las condiciones de siembra y la fuente origen del material, donde radica la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo de explante (Gamarra Reinoso, 2014). Se considera la presencia de fitopatógenos u hongos endófitos provenientes de la planta que proporcionó los explantes debido a su crecimiento en jardín al aire libre sin control de contaminantes, y según Gamboa (2006), las condiciones de invernadero posibilitan una asepsia más controlada de las plantas donadoras de explantes para ser tratadas con agentes que puedan eliminar patógenos y microorganismos endófitos.

La mayoría de los estudios e investigaciones para el establecimiento de un cultivo *in vitro*, proponen elaborar medios de cultivo formulado con fungicidas y antibióticos, o una combinación de ambos, que resultó en la disminución de contaminación *in vitro*, según (Guevara, 2016) al adicionar fungicida sistémico Carbendazim, se logró reducir la contaminación por hongo en sus ensayos. Echenique & Huanca, (2022) indican que el uso del antibiótico Eritromicina en combinación con el fungicida Cuprocol en el cultivo *in vitro* del banano, permite reducir las pérdidas por contaminación bacteriana y fúngica.

El árbol de Caoba, como especie leñosa, es susceptible a contaminación por hongos (Villamizar, 2005, Hernández y González, 2010), donde han sido reportados en investigaciones realizadas por (Arguedas, 2007) y (Perez, 2009) hongos filamentosos tales como; *Alternaria*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Pestalotia* y *Aspergillus*.

Después de evaluar el rendimiento de los cultivos y sus respectivos protocolos, hemos observado que no se detectó contaminación ambiental por bacterias, pero sí encontramos presencia de hongos. A pesar de la sugerencia de Rebaza (2020) de que el uso de NaClO podría prevenir la contaminación por microorganismos, en nuestros experimentos no fue suficiente para eliminar de forma completa los contaminantes. Basándonos en Gaitan (2005), asumimos que estos hongos eran endófitos.

Tabla 12.*ANOVA para Contaminación por Concentración*

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 10,3333 | 5 | 2,06667 | 0,79 | 0,5695 |
| Intra grupos | 47,0 | 18 | 2,61111 | | |
| Total (Corr.) | 57,3333 | 23 | | | |

No hay una diferencia significativa entre la media de contaminación entre dos niveles de concentración, con un 95% de confianza.

El valor-P de la razón-F es mayor o igual a 0.05, lo que significa que no podemos rechazar la hipótesis nula de que no hay diferencia entre las medias.

No hay suficiente evidencia para concluir que la concentración tiene un efecto significativo en la contaminación.

4.4. Fenolización y sobrevivencia de los explantes

A partir del quinto día se observó la respuesta de explantes con tratamientos de desinfección realizados, se verificó la aparición de manchas cafés en los extremos de cada explante. No hubo una oxidación grave en los tejidos.

4.5. Formación de callos

Del total de 180 explantes solo el 1,1 % presentaron formación de callos, por el contrario, el 98,9 % presentaron contaminación fúngica que impidió evidenciar el desarrollo de modificaciones en el tejido vegetal. El tratamiento para generar callos en explantes foliares en caoba se logró apreciar desde el 7mo día en los tratamientos que contenían 0,50 y 1 mg l⁻¹ de 2,4-D con una ligera formación de desdiferenciación celular. Los tratamientos adicionados con sacarosa al 0, 2 y 8% también presentaron una desdiferenciación celular. Sin embargo, no pudieron desarrollarse debido a la contaminación fúngica.

Tabla 13.

Desdiferenciación celular en explantes foliares a partir del séptimo día de sembrados.

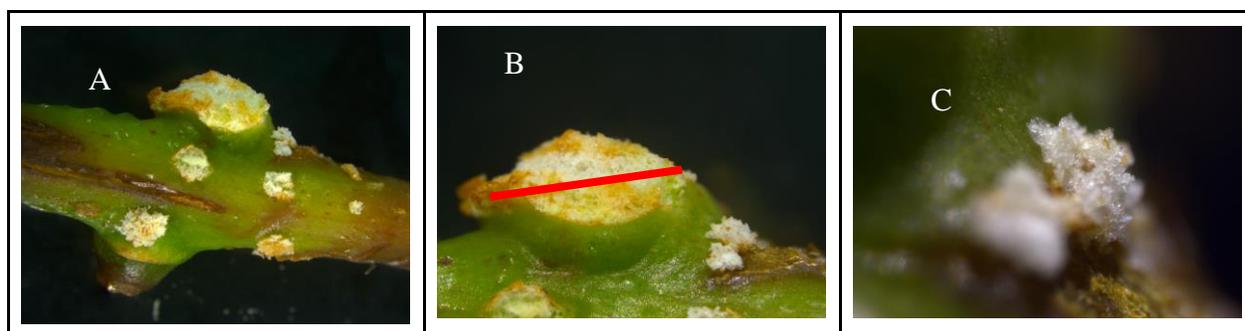
| Sacarosa 0% | Sacarosa 2% | Sacarosa 8% | 2,4-D 0.5 mg l ⁻¹ | 2,4-D 1 mg l ⁻¹ |
|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| A | B | C | D | E |

Todas las figuras (A-E) pertenecen a los tratamientos realizados para segmentos nodales en condición de fotoperíodos. Las figuras muestran la capacidad de los explantes para formar tejido desdiferenciado, el cual no se pudo desarrollar debido a la contaminación presente al quinto día después de la siembra.

En los distintos tratamientos de sacarosa, se observa que al aplicar una fuente de carbono los explantes mantienen una respuesta rápida ante la formación celular. Esto se debe a que la fuente de carbono es necesaria en los tejidos vegetales para el crecimiento de sus células, lo que, a su vez, estimularía la formación de callos. (Rojas, 2019)

Transcurrido los 35 días, el medio de cultivo MS adicionado con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 2,4-D, en oscuridad que permanecía libre de contaminación, presentó los mayores porcentajes de formación de callos de grado 2 en segmentos nodales de caoba (**Ilustración 6**).

Ilustración 6. Formación de callos en segmento nodales



Fotos tomadas en el Estereomicroscopio Leica M60 con el programa LAS X

Elaborado por autores, 2024

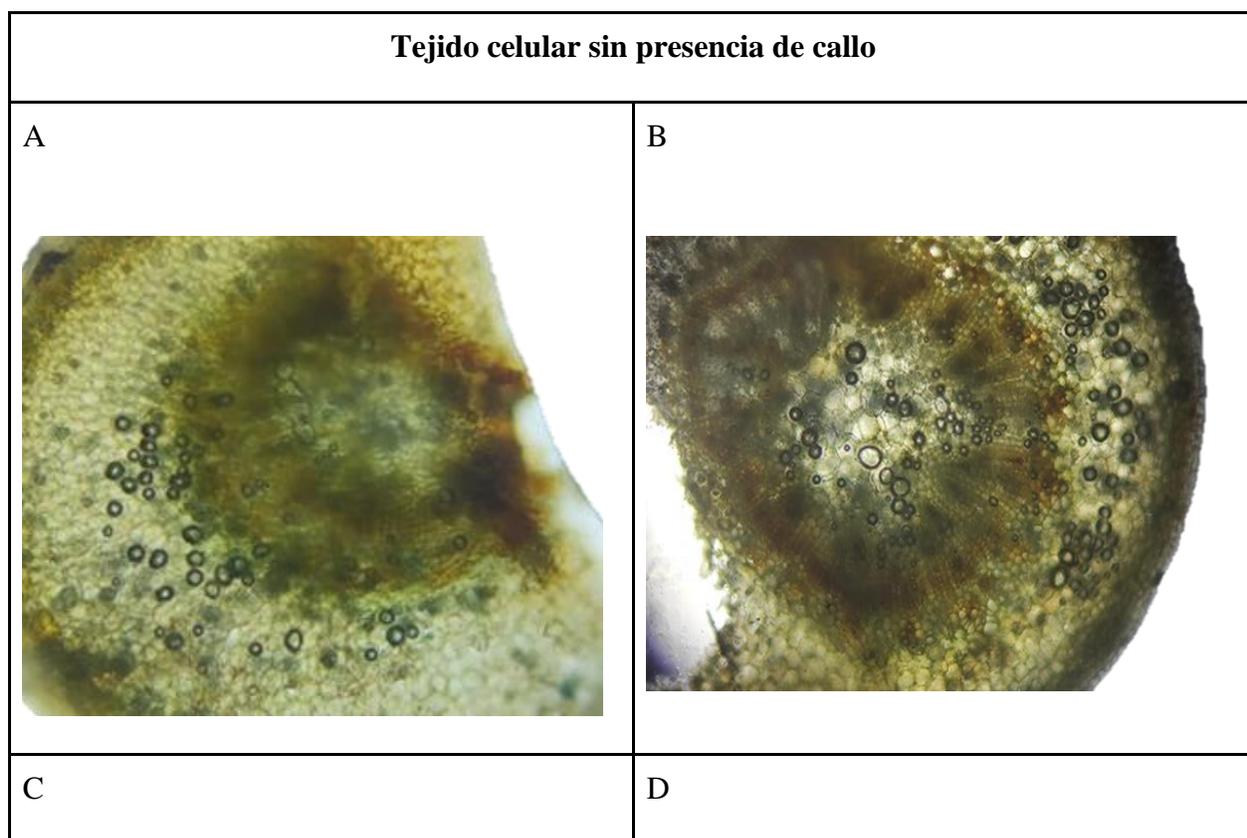
Las imágenes muestran la aparición de 8 callos de distintos tamaños, La figura A y C muestran los callos con un diámetro aproximado de 2 mm en los más pequeños y la figura B de 4 mm en el callo más grande, en su mayoría son de coloración blanca y uno color amarillo intenso. Los callos son friables, es decir que son de fácil disgregación al momento de su manipulación. (Sánchez, 2015). Según (Rodríguez et al, 2015), estos callos se denominan de baja frecuencia, es decir, embriones somáticos en diferentes etapas: globular de forma redondeada, color blanco y translúcidos como se muestra en las imágenes. En experimentos, se observó que un alto nivel de

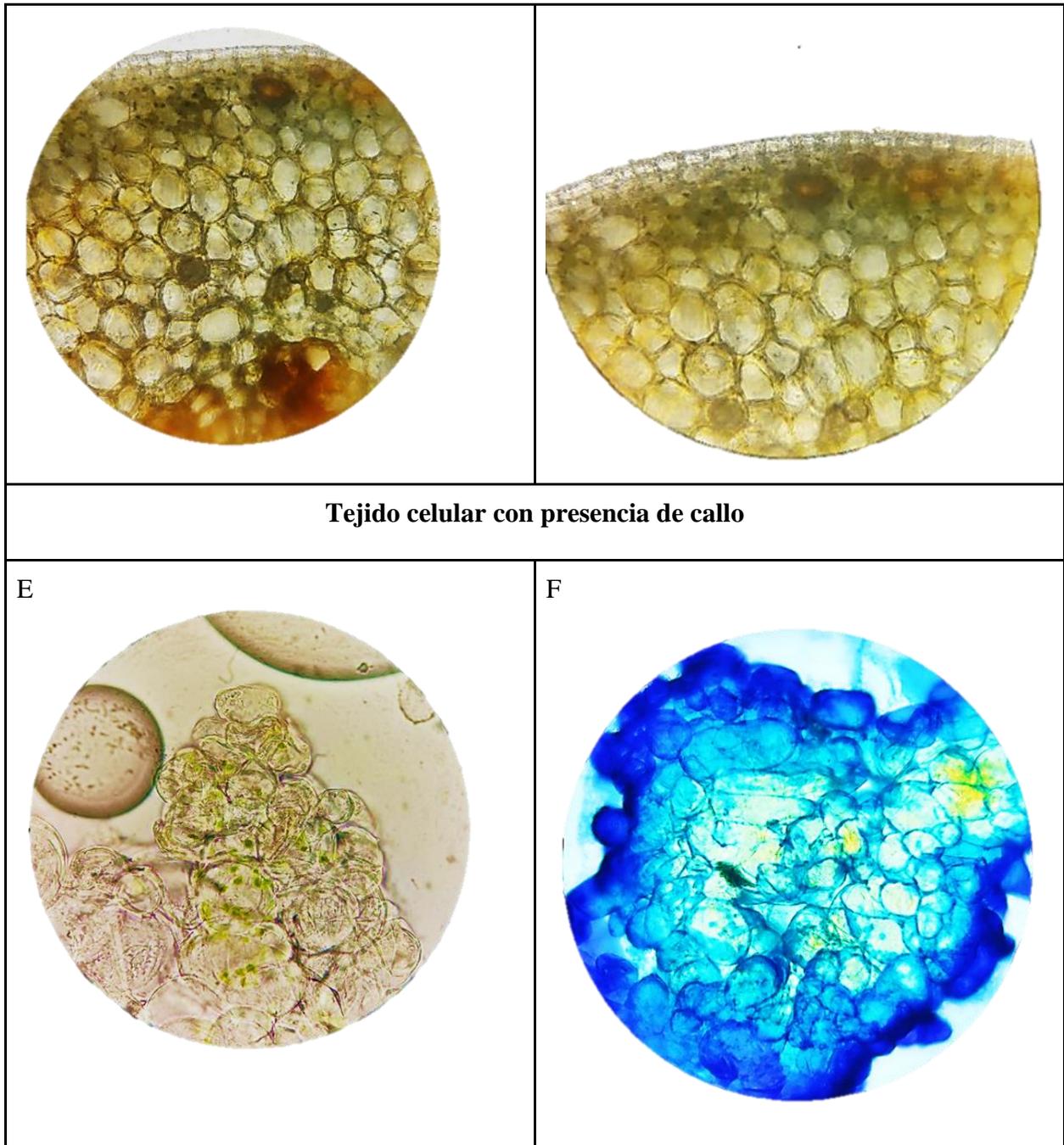
citocinina en comparación con auxina inducía la formación de brotes en tejidos derivados de explantes de médula, mientras que niveles bajos de citocininas y/o altos niveles de auxina conducían a la formación de masas celulares no organizadas (callos) y la generación de raíces con gradientes más altos de auxina (Skoog y Miller, 1965)

Los callos de baja frecuencia pueden ser trasladados a un medio líquido en suspensión, de manera que se formen estructuras celulares embriogénicas que puedan ser utilizados para la micropropagación masiva de especies. (Freire et al., 2006)

En la siguiente ilustración se observan las diferencias entre los tejidos con callos y tejidos en condición normal.

Ilustración 7. Comparación de tejidos de segmentos nodales





Tejido celular con presencia de callo

A-B. Tejido celular vegetal diferenciado (epidermis - células parenquimáticas - tejidos conductores). C-D. Epidermis y células parenquimáticas. E-F. Callos - tejido indiferenciado

(Elaborado por los autores, 2024)

Las figuras A-D muestran claramente una estructura celular organizada, formada por pared celular, células parenquimáticas y tejidos conductores en base al Manual de Histología Vegetal (Peña & Ramón, 2011), que explican a detalle la morfología celular de los tejidos.

En las figuras E y F se observa una estructura celular desorganizada, representativa de los callos formados en los tejidos celulares. Las células muestran un aspecto morfogénico diverso, unas alargadas y otras redondeadas con presencia de gránulos pigmentados de coloración verde que podrían estar relacionados con la presencia de cloroplastos. (Sánchez, 2015)

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

El estudio llevado a cabo proporcionó una visión detallada sobre la influencia de diferentes tipos de desinfectantes en el desarrollo de explantes de Caoba bajo condiciones controladas. A través de protocolos experimentales de desinfección meticulosos, se observó la presencia de contaminación fúngica desde el quinto día en todas las muestras, lo que señala la necesidad de medidas de control más efectivas en la preparación del medio de cultivo *in vitro* con relación a la preferencia de hongos endófitos simbiotes o fitopatógenos.

La consistencia de los resultados obtenidos con altas tasas de contaminación fúngica y fenolización de las muestras, destaca la resistencia de los patógenos a los antimicrobianos adicionados en el medio de cultivo y subraya la importancia de mejorar el tratamiento de desinfección y control de los explantes. Los resultados enfatizan la relevancia de las condiciones ambientales, como la iluminación y ausencia de luz, y su interacción con los tratamientos

químicos, ofreciendo un camino para futuras investigaciones que podrían explorar alternativas para mitigar la contaminación fúngica de tipo endófito. Esto puede incluir el ajuste de las concentraciones de los componentes del medio MS o la introducción de agentes antimicrobianos adicionales.

En base a la formación de callos el 1,1 de los tratamientos obtuvo resultado en el medio formulado con 2,4-D con una concentración de 0,5 mg/l. Este resultado indica que esta concentración de auxina en caoba puede ser la óptima para estimular la formación de callos en segmentos nodales de caoba en un medio MS con 30 gr de sacarosa. Sin embargo, es relevante resaltar que el resto de los tratamientos siguen siendo evaluables, dado a que la contaminación no permitió que se desarrollen los explantes.

Este estudio aporta de manera significativa al cuerpo de conocimiento en el campo del cultivo de tejidos vegetales, el cual proporciona evidencia empírica sobre los desafíos de la contaminación y ofreciendo un punto de partida sólido para futuras investigaciones dirigidas a mejorar la eficiencia de los protocolos de cultivo *in vitro*.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda iniciar el proceso con semillas cultivadas en laboratorio, para evitar la presencia de hongos en las células que se van a utilizar y desarrollar un protocolo específico para la formación de callos a partir de las células de las semillas.
- Evaluar la influencia de otros factores como la edad del material vegetal, la estación del año y la fuente de los explantes.

- Hacer ensayos preliminares donde se utilicen distintos tipos de desinfectantes para poder evaluar la respuesta de los explantes antes de realizar el experimento para evitar posible contaminación.
- Probar con distintos medios de cultivo que puedan facilitar los nutrientes esenciales para los explantes de caoba y la formación de callos.
- Considerar los tiempos destinados a cada experimentación, teniendo en cuenta que antes de realizarlos se debe tener preparado todo el material necesario (material estéril, cálculos y formulaciones para el medio, aditivos que se van a utilizar, de donde se van a obtener las muestras o explantes).
- Realizar los ensayos con los parámetros de estudio (sacarosa y 2,4-D) para confirmar su efectividad.
- Realizar una cantidad mayor de réplicas que permita mantener un número de explantes necesario para evaluar la eficiencia de un protocolo de desinfección.
- Conocer la trazabilidad de la planta y sus condiciones de crecimiento.

Bibliografía

Aguilera, G. A., Puentes, C. L., & Rodriguez, E. (2021, 12 28). *Métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de dos variedades de yuca para uso agroindustrial*. Métodos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de dos variedades de yuca para uso agroindustrial.

Retrieved February 26, 2024, from

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182021000300021

Ajardina. (2021, November 25). *Principales enfermedades y plagas arbóreas*. Ajardina. Retrieved February 28, 2024, from <https://www.ajardina.es/principales-enfermedades-y-plagas-arboreas/>

Alcántara, J., Acero, J., Alcantara, J., & Sanchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Artículo de revisión*.

Alcántara, J., Castilla, M., & Sanchez, R. (2017). *Importancia de los cultivos vegetales In vitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación*.

ArgenBio. (2004, - -). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6

Arguedas, M. (2007). PLAGAS Y ENFERMEDADES FORESTALES EN COSTA RICA. *Revista Forestal (Costa Rica)*, (4).

Arizona State University Vascular Plant Herbarium. (2008, 08 12). Retrieved February 26, 2024, from <https://herbanwmex.net/portal/collections/individual/index.php?occid=29220495>

Arnaldoa. (2017, November 9). *Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas*. Scielo. Retrieved February 12, 2024, from <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>

Arroyo, M. (2021, Septiembre -). *CONCEPTOS BASICOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES*. Google Content. https://books.googleusercontent.com/books/content?req=AKW5QafLFxtiPspDJ9CU5y_icTDpHDg3yv8Quff2rZhTUICjeglsIIF7RKxMs07L0I1G3HjNfjDc_V9SXR2gdpwg_NYKQi3jyOsNXbZMYPpzOAjG_SsyUpV-

8yO5a_arJIRb1AtKY1YuL7pklNh2NPKJJ5C0LEtnVqdJoQ4w356Fgt4z2_fhR4rUMnBeEeVcu
ZLtGP2plh

Arroyo, M. (2021, September 22). *Micropropagación*. Enciclopedia libre. Retrieved December 31, 2023, from

<https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Micropropagaci%C3%B3n&oldid=144581675>

Bacusoy, J., & Macías, G. (2019). *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ. Retrieved February 28, 2024, from <http://repositorio.utm.edu.ec:3000/server/api/core/bitstreams/faf34cd0-c355-48d8-ab83-7659d717150c/content>

Barbón, R. (2006, Abril). *Taller leñosa / Biología de las Plantas / Biotecnología Vegetal*. Biotecnología Vegetal. Retrieved February 26, 2024, from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/469/855>

Bauer, G., & Francis, J. K. (n.d.). *Swietenia macrophylla*.

Caoba Cuidados (Plantando, Fertilizantes, Enfermedades). (n.d.). PictureThis. Retrieved February 11, 2024, from https://www.picturethisai.com/es/care/Swietenia_mahagoni.html

Borgues, M., Abeal, E., Perez, I., & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Colombia Biotecnología*, 11, 9.

Caoba (Swietenia macrophylla) · NaturaLista Colombia. (2023, August 21). NaturaLista Colombia. Retrieved January 1, 2024, from <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/169442-Swietenia-macrophylla>

Cárdenas, C. A., Romero, J. E., & Echeverri, L. A. (2023). *PROPAGACIÓN DE FLORA NATIVA: Experiencias desde el Jardín Botánico de Bogotá*. Jardín Botánico de Bogotá.

Retrieved February 29, 2024, from https://jbb.gov.co/documentos/publicaciones/Cardenas-Burgos_2023-Propagacion_de_flora_nativa-Experienciasdes_de_el_Jardin_Botanico_de_Bogota.pdf

Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo* Ing.Agr. Alicia Castil. INIA. Retrieved February 28, 2024, from <http://inia.uy/en/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. (2021). *Manual de Prácticas de Laboratorio para la Micropropagación de Plantas*.

Cibrian, D., & García, S. (2008). Identificación y manejo de plagas y enfermedades en viveros forestales. <http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/09%20Manuales%20técnicos/Manual%20de%20identificación%20y%20manejo%20de%20plagas%20y%20enfermedades%20en%20viveros%20forestales.pdf>

CONABIO. (2004). *Swietenia macrophylla* King. *Icones Plantarum Indiae Orientalis*. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/37-melia5m.pdf

Cultivo de tejidos vegetales. (2012, November 25). Apuntes de Fisiología Vegetal. Retrieved February 11, 2024, from <https://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/11/cultivo-de-tejidos-vegetales.html>

Delgado Paredes, G., & Vásquez Díaz, C. (2023). *Germinación de semillas, micropropagación y conservación de germoplasma in vitro de Cedrela odorata (Meliaceae) en el norte d*. SciELO Chile. Retrieved February 28, 2024, from <https://www.scielo.cl/pdf/bosque/v44n1/0717-9200-bosque-44-01-97.pdf>

Echenique, M., & Huanca, W. (2022). *Vista de Evaluación de antibióticos y fungicidas, en la introducción in vitro de banano (Musa acuminata) en la Estación Experimental Sapecho.*

Apthapi. Retrieved February 27, 2024, from

<https://apthapi.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/245/233>

ESPOL. (2019). *Bosque Prosperina.*

<http://www.bosqueprotector.espol.edu.ec/biodiversidad/caoba/#:~:text=La%20especie%20es%20nativa%20de,las%20regiones%20Costa%20y%20Amaz%C3%B3nica.&text=La%20madera%20es%20de%20excelente,tiene%20propiedades%20astringentes%20y%20t%C3%B3nicas.>

Fichet, T. (n.d.). *Fitohormonas y Reguladores del Crecimiento Vegetal.* Intagri. Retrieved February 29, 2024, from <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/biosintesis-de-las-fitohormonas-y-reguladores-de-crecimiento>

Flores, Y. (2010). *Caoba.* Repositorio INIA. Retrieved February 28, 2024, from <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/835>

Franco, N., Clavijo, C., Rojas, J., & Talero, C. A. (2019, diciembre). Plan de Manejo y Conservación de la caoba (*Swietenia macrophylla* King) para la jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR. *CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DE CUNDINAMARCA CAR*, 57.

Freire, M., Kosky, R. G., Herrera, I., & Reyes, M. (2006). Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de caña de azúcar a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Bioteología Vegetal*, 6.

Gaitan, G. A. (2005). *EFFECTS OF FUNGICIDES ON ENDOPHYTIC FUNGI AND PHOTOSYNTHESIS IN SEEDLINGS OF A TROPICAL TREE, Guarea guidonia (Meliaceae).*

SciELO Colombia. Retrieved February 27, 2024, from

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2005000200003

Gamarra Reinoso, L. (2014). *REGENERACIÓN IN VITRO VÍA ORGANOGÉNESIS Y AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE Gmelina arborea A PARTIR DE PLANTAS IN VITRO*.

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/15436/GamarraReinosoLiesel2014.pdf>

Gamboa, M. A. (2006). *HONGOS ENDÓFITOS TROPICALES: CONOCIMIENTO ACTUAL Y PERSPECTIVAS*. Redalyc. Retrieved February 26, 2024, from

<https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028580001.pdf>

Garay, A., De la Paz, M., García, B., Álvarez, E., & Gutierrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(1), 22.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003&lng=es&tlng=es.

García, D. L., Mesa López, N., & Ocampo, M. L. (2015, December 2). *Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de Aspidosperma polyneuron*. SciELO Colombia. Retrieved February 29, 2024, from http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v17n2/es_0123-3475-biote-17-02-75.pdf

García, N. (2014). UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI. repositorio@unu.edu.pe. Retrieved February 29, 2024, from <http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/2020/000001192T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

García, L., García, V., Rojo, D., & Sanchez, E. (2001). *Plantas con propiedades antioxidantes*. SciELO Cuba. Retrieved February 1, 2024, from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002001000300011

Grupo de Trabajo de la Dirección de Planeación y Política Ambiental, Abundes, M., Loredó, R., Cano, J., & Cervantes, H. (2018). *Catálogo de especies arbóreas nativas recomendadas para el Municipio de Benito Juárez*. Ayuntamiento de Benito Juárez. Retrieved February 28, 2024, from <https://cancun.gob.mx/assets/pdf/palacium/PALETAVEGETALBJ.pdf>

Guevara, L. (2016). *Establecimiento in vitro del portainjertos híbrido 'Garfi x Nemared' para durazno | Guevara Salguero | Biotecnología Vegetal*. Biotecnología Vegetal. Retrieved February 27, 2024, from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/512/html>

Haines, R. (1992). *EL PAPEL DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL MEJORAMIENTO DE LAS ESPECIES FORESTALES*. Wikipedia. Retrieved February 28, 2024, from https://www.researchgate.net/profile/Mariano-Toribio/publication/237587735_EL_USO_DE_LA_BIOTECNOLOGIA_EN_LA_CONSERVACION_DE_RECURSOS_GENTICOS_FORESTALES/links/54d796bc0cf2970e4e74800f/EL-USO-DE-LA-BIOTECNOLOGIA-EN-LA-CONSERVACION-DE-RECURSOS-GENTICOS-FORESTALE

Herborización de muestras. (2017, November 9). YouTube: Home. Retrieved February 2, 2024, from https://www.udea.edu.co/wps/portal/udea/web/inicio/unidades-academicas/ciencias-exactas-naturales/herbario!/ut/p/z0/04_Sj9CPykyssy0xPLMnMz0vMAfIjo8zi_QJNXQ2NnA18DHzcXQ0CzYK8XMIMLQ2c_Yz0C7IdFQGZ7LHQ/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/PortalUdeA/asPortalUdeA/asHomeUde

Hernández, A. (2021, Diciembre). *INDUCCIÓN IN VITRO DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES EN ROCOTO (Capsicum pubescens Ruiz & Pav.)*. Scielo. Retrieved February 26, 2024, from http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-85962021000200131

Hernández, A., & Barrales, H. J. (n.d.). *Micropropagación: Al rescate de plantas en riesgo de extinción*. Revista Saber Más. Retrieved February 28, 2024, from <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/507-numero-57/986-micropropagacion-al-rescate-de-plantas-en-riesgo-de-extincion.html>

Hernandez, A., Curaca, A., Cortez, A., & Díaz, H. (2021, 12). *INDUCCIÓN IN VITRO DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES EN ROCOTO (Capsicum pubescens Ruiz & Pav.)*. Scielo. Retrieved February 22, 2024, from http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-85962021000200131

HISTOLOGÍA VEGETAL. (n.d.). profebioygeo. Retrieved February 28, 2024, from <https://profebioygeo.es/wp-content/uploads/2021/05/Los-tejidos-vegetales.pdf>

Instituto Nacional de Bosques. (2017). *Caoba Swietenia macrophylla; paquete tecnológico forestal*.

Jordán, M., & Casaretto, J. (2006, Ene 15). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. Universidad de la Serena. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

Kluepfel, M., Lippert, B., & Williamson, J. (2016, October 16). *Cambiando el pH del Suelo | Home & Garden Information Center*. Clemson HGIC. Retrieved February 29, 2024, from <https://hgic.clemson.edu/factsheet/cambiando-el-ph-del-suelo/>

Krikorian, A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*.

W.M Roca, Luis A. Mroginski. https://books.google.com.co/books/p/pub-2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&pg=PA41&printsec=frontcover&dq=Cultivo+de+tejidos+en+la+agricultura&cd=1&redir_esc=y#v=onepage&q=Cultivo%20de%20tejidos%20en%20la%20agricultura&f=false

Louman, B. (2001). *Silvicultura de bosques latifoliados húmedos con énfasis en América Central*. CATIE.
https://books.google.es/books?hl=es&lr=lang_es&id=e88HhetPW4QC&oi=fnd&pg=PA19&dq=swietenia+macrophylla+geografia&ots=Z58vFFJy0h&sig=rxnORNbhdM9w_UcZPUfB1SiapYQ#v=onepage&q&f=false

Maldonado, H. (2022). *Implementación de un protocolo para la obtención de callo in vitro a partir de hojas de rosas de corte (Rosa hybrida L.)*. Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Retrieved February 28, 2024, from <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/32264>

Marulanda, M., & Gutiérrez, L. (2023, July 31). (PDF) *Micropropagación de Guandua Angustifolia Kunth*. ResearchGate. Retrieved February 26, 2024, from https://www.researchgate.net/publication/366858607_Micropropagacion_de_Guandua_Angustifolia_Kunth

Ministerio del Ambiente. (2017, November 1). *Ecuador prohíbe la tala de caoba durante los próximos 10 años – Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica*. Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. Retrieved February 28, 2024, from <https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-prohibe-la-tala-de-caoba-durante-los-proximos-10-anos/>

Ministerio del Ambiente & Granizo Tamayo, T. (2017, octubre 5). *Untitled*. Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. Retrieved December 29, 2023, from <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/03/ACUERDO-90-VEDA-CAOBA.pdf>

Mora, M. (2011). *Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa en plantas de crisantemo*. SciELO México. Retrieved February 1, 2024, from https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000500008

Morgan, D.W. (2011). *Cultivo de tejido vegetal*. International Plant Laboratories. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/CultivoTejidos.pdf>

Muñoz, V., Cisterna, V., & France, A. (n.d.). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos*. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6945/NR42411.pdf?sequence=10&isAllowed=y#:~:text=Las%20enfermedades%20en%20plantas%20constituyen,la%20post%20cosecha%20del%2010%25>.

(PDF) *Micropropagación de Guandua Angustifolia Kunth*. (2023, July 31). ResearchGate. Retrieved February 26, 2024, from https://www.researchgate.net/publication/366858607_Micropropagacion_de_Guandua_Angustifolia_Kunth

Nieto, V., & Valdivieso, M. (2013). UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA. Repositorio UPS. Retrieved February 29, 2024, from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4275/1/UPS-QT03595.pdf>

Pelacho, A., Closas, L., & Sanfeliu, J. (2005, - -). *Medios de cultivo*. Universidad de Lleida. <http://cv.udl.cat/cursos/76304/t5/t5.htm>

Peña, A., & Ramón, J. (2011). *Manual de Histología vegetal*. Mundi Prens.

Perea, M. (2009). *Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro*.

Pérez, F. (2017). Nutrición mineral parte III. In *Fisiología Vegetal* (p. 6). -.

<http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3201/000026082L.pdf>

Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L., & Aguilar, M. E. (2006, 04). *Método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de Cedrela odorata: fases de desarrollo y enraizamiento*.

Repositorio CATIE. Retrieved February 19, 2024, from

<https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/10062>

Perez, M. (2009, abril). *Micobiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento in vitro de cinco especies forestales*. Biotecnología Vegetal.

Retrieved February 27, 2024, from

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/312/286>

Radice, S. (1997). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*.

Ramos, J. (2012, Noviembre). *AVANCES DE LA MICROPROPAGACIÓN in vitro DE PLANTAS LEÑOSAS*. Repositorio Universitario. Retrieved February 26, 2024, from

<https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2515/17127974.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rebaza, C. (2020). *Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de "caoba" Swietenia macrophylla King (Meliaceae)*. SciELO Perú. Retrieved February 28, 2024, from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992020000100141

Rebaza, C. (2020, Abril). *Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de "caoba" Swietenia macrophylla King (Meliaceae)*. SciELO Perú.

Retrieved February 22, 2024, from

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992020000100141

Roca, W., Mroginski, L. A., & Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf

Rodríguez Bearud, M. (2014). *Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en Ugni molinae*. SciELO Chile.

Retrieved February 29, 2024, from

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002014000100011

Rojas, A., & Hines, A. (2019, July 1). *Vista de Micropropagación de clones superiores de caoba (Swietenia macrophylla King) a partir de segmentos nodales* / *Revista de Ciencias Ambientales*. revistas. una. ac. cr. Retrieved February 19, 2024, from

<https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/ambientales/article/view/12080/16769>

Rojas, J. A. (2019). *Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica y citosólica: Importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas*. Dialnet. Retrieved February 28, 2024, from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=247484>

Rosas, F. (2022, August 30). *Influencia de la luz en la generación de callos y el cultivo in vitro de plantas*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Retrieved February 19, 2024, from <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/3156>

Rosas, F. (2022, Agosto 15). *Vista de Influencia de la luz en la generación de callos y el cultivo in vitro de plantas*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Retrieved February 26, 2024, from <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/3156/5220>

SAGARPA. (2017, Junio). *Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV): Implementación y puesta en marcha*. SAGARPA.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264918/Reporte_de_Proyecto_1_Laboratorio.pdf

Salgado, R. (n.d.). *LA PROPAGACIÓN DE PLANTAS IN VITRO, UN ÉXITO BIOTECNOLÓGICO*. Revista Saber Más. Retrieved February 26, 2024, from
<https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html>

Sánchez, J. M. (2016). *SWIETENIA MACROPHYLLA*. Árboles ornamentales. Retrieved January 1, 2024, from <https://www.arbolesornamentales.es/Swieteniamacrophylla.htm>

Sánchez, L. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*, 28, 106.
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v28n1/0379-3982-tem-28-01-00105.pdf>

Sánchez, M., & Salaverría, L. (n.d.). Control de la oxidación y contaminación del cultivo *in vitro* de fresa. <file:///C:/Users/lyagi/Downloads/Dialnet-ControlDeLaOxidacionYLaContaminacionEnElCultivoInV-2221549.pdf>

Sánchez, R., Sánchez, B., Sandoval, Y., Ulloa, Á., Armendariz, B., & García, M. (2013). *Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina*. SciELO México. Retrieved February 11, 2024, from
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006

Sánchez, R., Sánchez, B., Sandoval, Y., Ulloa, Á., Armendariz, B., García, M., & Macías, M. (2013, Diciembre). *Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos*

con utilidad en agricultura y medicina. SciELO México. Retrieved February 29, 2024, from https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006

Segretín, M. E. (2013, Enero 11). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)*. ArgenBio.

file:///C:/Users/lyagi/Downloads/Los_cultivos_celulares_y_sus_aplicacione.pdf

Seguí, J. M. (2011). *BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LAS PLANTAS*. Universidad Politecnica de Valencia.

<https://www.lalibreria.upv.es/portaEd/UpvGESStore/control/product>

Sorgato, V. (2017, November 1). *Ecuador prohíbe la tala de caoba durante los próximos 10 años – Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica*. Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. Retrieved February 28, 2024, from

<https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-prohibe-la-tala-de-caoba-durante-los-proximos-10-anos/>

Sorgato, V. (2017, November 29). Ecuador: tala ilegal amenaza la veda de caoba decretada por el gobierno. *Mongabay Latam*. <https://es.mongabay.com/2017/11/ecuador-tala-ilegal-amenaza-la-veda-caoba-decretada-gobierno/>

TECNAL. (n.d.). - *Biología vegetal y cultivo de plantas in vitro*. Tecnal Equipamentos Científicos. Retrieved February 28, 2024, from https://tecnal.com.br/es/blog/327_biotecnologia_vegetal_y_cultivo_de_plantas_in_vitro

Universidad Abierta y a Distancia de México. (n.d.). *Cultivo de tejidos vegetales I*. https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/BI/06/BCTV1/unidad_02/descargables/BCTV1_U2_Contenido.pdf

Universidad Andina Néstor Cáceres Velasquez. (2023, April 26). *Caracterización del departamento de Madre de Dios y descripción de algunas especies de flora nativa | PDF | Coco |*

Plantas. Scribd. Retrieved February 28, 2024, from

<https://es.scribd.com/document/423016201/Flora-y-Fauna-Del-Peru>

Universidad de Simón Bolívar. (2010). *Caoba (Swietenia macrophylla) | Guardabosques Voluntarios de la Universidad Simón Bolívar*. Guardabosques Voluntarios de la Universidad Simón Bolívar. Retrieved February 29, 2024, from

<https://guardabosqueusb.wordpress.com/conoce-nuestras-plantas/caoba-swietenia-macrophylla/>

University of Florida Herbarium (FLAS). (2014). *Red de Herbarios del Noroeste de México*. Retrieved February 26, 2024, from

<https://herbanwmex.net/portal/collections/misc/collprofiles.php?collid=249&acronym=FLAS>

Vaca, I., Marulanda, M., Verdesoto, I., Nuñez, A., Acurio, R., & Chiluisa, V. (2018, August 4). *2018.03.03.5 - Bionatura*. revista Bionatura. Retrieved February 1, 2024, from <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2018.03.03.5>

Velázquez Ramirez, L. (2018). *Herborización de Plantas Vasculares para la Conformación de una Colección Biológica*. UNAM | UAPA. Retrieved February 28, 2024, from <https://uapa.cuaieed.unam.mx/sites/default/files/minisite/static/c9fd42a9-06a3-4b54-a95c-6735dc5d92ba/contenido/index.html>

Vergara, L. (2016, Junio). *Establecimiento in vitro del portainjertos híbrido 'Garfi x Nemared' para durazno | Guevara Salguero | Biotecnología Vegetal*. Biotecnología Vegetal. Retrieved February 26, 2024, from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/512/html>

Zaldua, R. (2024, February 26). *Comparación de protocolos de desinfección y propagación para la especie vegetal Baccharis latifolia (Ruiz & Pav.) con el*. Repositorio UPS. Retrieved February 29, 2024, from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/26940/1/UPS-CT011161.pdf>

Anexos

Anexo 1. Materiales utilizados en la herborización

- Muestra vegetal (hojas, fruto y semillas)
- Tijeras
- Cinta adhesiva
- Hilo
- Cartulina A3
- Etiqueta de herborización

Anexo 2. Materiales utilizados en el cultivo *in vitro*

| Materiales utilizados en el cultivo <i>in vitro</i> | | |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| Equipos | Instrumentos De Laboratorio | Reactivos |
| Cámara De Flujo Laminar | - | Alcohol al 70% |
| Microondas | - | Alcohol al 96% |
| Placa De Calentamiento | - | Reactivos para el medio MS |
| Estufa | - | Fungicida phyton |
| - | Frascos De 1 Lt | Sulfato de estreptomicina |
| - | Frascos De 500 MI | |
| - | Pinzas | |
| - | Bisturí | |
| - | Cucharas/Espatulas | |
| - | Mecheros | |

| | | |
|---|----------------------------------|--|
| - | Probetas 250 MI | |
| - | Probetas 50 MI | |
| - | Probetas 100 MI | |
| - | Vasos Precipitados 500 MI | |
| - | Vasos Precipitados 250 MI | |
| - | Vasos Precipitados 100 MI | |
| - | - | |
| - | - | |
| - | - | |
| - | - | |
| - | - | |
| - | - | |

Elaborado por los autores, 2024

Anexo 3. Comparación de muestras herborizadas



Hojas de *S. Macrophylla*
(Field museum of natural history)



Hojas de *S. Macrophylla*
(Guerra y Morán)



Fruto y semilla de *S. Macrophylla*
(Field museum of natural history)



Fruto y semilla de *S. Macrophylla*

| | |
|--|------------------|
| | (Guerra y Morán) |
|--|------------------|

Anexo 4. Composición del Medio MS y sus modificaciones

| Componente | Concentración (mg/L) |
|---|----------------------|
| Macroelementos | |
| Nitrato de potasio (KNO ₃) | 1900 |
| Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) | 170 |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 370 |
| Calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O) | 440 |
| Sulfato de amonio (NH ₄ NO ₃) | 1650 |
| Microelementos | |
| Hierro (FeSO ₄ ·7H ₂ O) | 27.8 |
| EDTA de sodio (Na ₂ EDTA) | 37.3 |
| Boro (H ₃ BO ₃) | 6.2 |
| Manganeso (MnSO ₄ ·H ₂ O) | 22.3 |
| Zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O) | 8.6 |
| Cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O) | 0.025 |
| Molibdeno (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O) | 0.25 |
| Cobalto (CoCl ₂ ·6H ₂ O) | 0.025 |
| Vitaminas | |
| Tiamina (Vitamina B1) | 0.4 |

| | |
|----------------------------|-------------------|
| Ácido nicotínico (Niacina) | 0.5 |
| Piridoxina (Vitamina B6) | 0.5 |
| Otros aditivos | |
| Carbón activado | 500 mg / litro |
| Sacarosa | 30 gr |
| Agar | 14 gr |
| Fungicida agrícola | 16,66 mu / 500 ml |
| Sulfato de estreptomicina | 5 gr / 500 ml |

Elaborado por los autores, 2024

Composición del Medio para el tratamiento de sacarosa

| | |
|-----------------|---------------|
| Medio MS | 500 ml |
| Sacarosa 0% | 0 gr/150 mL |
| Sacarosa 2% | 3 gr/150 mL |
| Sacarosa 8% | 12 gr/150 mL |
| Agar | 7 gr/500 mL |
| 6-BAP | 500 mu/500 mL |

Elaborado por los autores, 2024

Composición del Medio para el tratamiento de 2,4-D

| | |
|-----------------|--------|
| Medio MS | 500 ml |
|-----------------|--------|

| | |
|--------------|---------------|
| 2,4-D al 1,5 | 225 mu/150 ml |
| 2,4-D al 1,0 | 150 mu/150 ml |
| 2,4-D al 1,5 | 75 mu/150 ml |
| Agar | 7 gr/500 mL |
| Sacarosa | 10 gr /500 mL |

Elaborado por los autores, 2024

Anexo 6. Resultados de los protocolos de desinfección por tratamiento

Indicadores de Tablas

100% = Todas las réplicas mostraron contaminación

99% = Una de las tres réplicas no mostró contaminación

50% = Solo una réplica mostró contaminación

0% = No hubo contaminación

+ = Positivo para callogénesis

- = No se pudo evidenciar callogénesis

| Resultados de la contaminación de explantes sembrados. Oscuridad, 24-D y Sacarosa | | | | | | |
|--|------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Hojas | | | | | | |
| Variables de evaluación | | | | | | |
| Fecha de sembrado | Tratamiento | Repetición | Cont. Bacteriana | Cont. Fúngica | Fenolización | Callogénesis |
| 22/1/2024 | 2,4-D 0,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |

| | | | | | | |
|-----------|-------------------|----------------|----|------|-----|---|
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |
| 22/1/2024 | Sacarosa 8% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |
| 22/1/2024 | Sacarosa 2% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |
| 22/1/2024 | Sacarosa 0% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |

Elaborado por los autores, 2024

| Resultados de la contaminación de explantes sembrados. Oscuridad, 24-D y Sacarosa. Segmentos nodales | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| VARIABLES DE EVALUACIÓN | | | | | | |
| Fecha | Tratamiento | Repetición | Cont. Bacteriana | Cont. Fúngica | Fenolización | Calogénesis |
| 22/1/2024 | Sacarosa 0% | Por triplicado | 0% | 99% | 90% | + |
| 22/1/2024 | Sacarosa 2% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |
| 22/1/2024 | Sacarosa 8% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |
| 22/1/2024 | 2,4-D 0,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | - |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1 mg/l | Por triplicado | 0% | 99% | 90% | - |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 99% | 90% | - |

Elaborado por los autores, 2024

| Resultados de la contaminación de explantes sembrados. Luz, 24-D y Sacarosa. | | | | | | |
|--|-------------------|----------------|------------------|---------------|--------------|-------------|
| Hojas | | | | | | |
| Variables de evaluación | | | | | | |
| Fecha | Tratamiento | Repetición | Cont. Bacteriana | Cont. Fúngica | Fenolización | Calogénesis |
| 22/1/2024 | Sacarosa 0% | Por triplicado | 0% | 99% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 2% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 8% | Por triplicado | 0% | 70% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D 0,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 99% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |

Elaborado por los autores, 2024

| Resultados de la contaminación de explantes sembrados. Luz, 24-D y Sacarosa. | | | | | | |
|--|-------------|------------|------------------|---------------|--------------|-------------|
| Segmentos nodales | | | | | | |
| Variables de evaluación | | | | | | |
| Fecha | Tratamiento | Repetición | Cont. Bacteriana | Cont. Fúngica | Fenolización | Calogénesis |

| | | | | | | |
|-----------|-------------------|----------------|----|------|-----|----|
| 22/1/2024 | Sacarosa 0% | Por triplicado | 0% | 99% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 2% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 8% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D 0,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 99% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |

Elaborado por los autores, 2024

Segundo experimento

| Resultados de la contaminación de explantes sembrados. Oscuridad, 24-D y Sacarosa. Segmentos nodales | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Variables de evaluación | | | | | | |
| Fecha | Tratamiento | Repetición | Cont. Bacteriana | Cont. Fúngica | Fenolización | Callogénesis |
| 22/1/2024 | Sacarosa 0% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 2% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 8% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |

| | | | | | | |
|-----------|-------------------|----------------|----|------|-----|----|
| 22/1/2024 | 2,4-D 0,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |

Elaborado por los autores, 2024

| Resultados de la contaminación de explantes sembrados. Luz, 24-D y Sacarosa. | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| Segmentos nodales | | | | | | |
| VARIABLES DE EVALUACIÓN | | | | | | |
| Fecha | Tratamiento | Repetición | Cont. Bacteriana | Cont. Fúngica | Fenolización | Calogénesis |
| 22/1/2024 | Sacarosa 0% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 2% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | Sacarosa 8% | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D 0,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |
| 22/1/2024 | 2,4-D al 1,5 mg/l | Por triplicado | 0% | 100% | 90% | 0% |

Elaborado por los autores, 2024

