

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

Development of an *in vitro* establishment protocol for selected material of cenízaro (*Samanea saman* Jacq. Merr.)

María Elena Corrales-Torres¹ • Ana Hine-Gómez²  • Laura Sánchez-Calvo²  • William Hernández-Castro² 

Recibido: 22/06/2023

Aceptado: 05/12/2023

Abstract

The Saman tree (*Samanea saman*) is a native species with a significant and economic importance in Costa Rica due to its high-quality wood and versatile range of uses. Its ability to compete with other reforestation species and suits specific niche markets increases its value. This research aimed to develop a methodology of *in vitro* culture for cenízaro, as a key tool for breeding and germplasm conservation programs in Costa Rica. Experiments were focused on using greenhouse-reproduced material, both inside and outside of a microtunnel environment. Two disinfectant agents, sodium hypochlorite (NaClO) and mercury chloride (HgCl₂), were assessed at varying concentrations and exposure durations. *In vitro* establishment success rates for material from the microtunnel greenhouse were less than 12.5 %. Conversely, material from outside the microtunnel showed remarkable *in vitro* establishment rates, surpassing 72.3 %. The most effective disinfection treatment for achieving contamination free shoots involved an incubation in 1 % v/v NaClO for 20 minutes, yielding the highest percentage of contamination-free shoots, corresponding to 85.47 %. As for apex disinfection, employing a 0.2 % (w/v) HgCl₂ for 5 minutes proved optimal, resulting in 100 % establishment of explants devoid of contaminants.

Keywords: *Samanea saman*, tissue culture, sodium hypochlorite, micro-cutting, propagation of forest species.

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

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

Resumen

El cenízaro (*Samanea saman*), es una especie nativa de Costa Rica, de reconocido valor económico por la calidad de la madera y la variedad de usos; estas características le permiten competir con otras especies usadas para reforestación, con el fin de generar productos dirigidos a mercados selectos. El objetivo de esta investigación fue desarrollar una metodología para el establecimiento *in vitro* de cenízaro como herramienta biotecnológica para un programa de mejoramiento genético y conservación de germoplasma en Costa Rica. El ensayo se estableció a partir de material reproducido en invernadero, tanto en microtúnel como fuera de este. Posteriormente, se evaluaron dos agentes desinfectantes, hipoclorito de sodio (NaClO) y cloruro de mercurio (HgCl₂), en diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Se obtuvieron porcentajes de establecimiento *in vitro* inferiores al 12,5 % al emplear material proveniente del invernadero microtúnel; mientras que, el material proveniente fuera del microtúnel, presentó porcentajes de establecimiento *in vitro* superiores a 72,3 %. La desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v durante 20 minutos presentó el mayor porcentaje de nudos libres de contaminación y correspondiente al 85,47 %. Por otro lado, la desinfección de ápices con cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,2 % p/v durante 5 minutos, presentó el mayor porcentaje de ápices libres de contaminación (100 %).

Palabras clave: *Samanea saman*, cultivo de tejidos vegetales, hipoclorito de sodio, microestacas, propagación de especies forestales.

Introducción

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

La actividad del comercio de la madera puede verse afectada por la tala ilegal y la sobre explotación de los recursos, lo que provoca impactos negativos en la economía y servicios ecosistémicos [2]. Lo anterior, ocasiona una alta erosión genética al reducir las reservas de germoplasma en los bosques. Aunado a lo anterior, Quesada [3] menciona que, a medida que transcurre el tiempo, este escenario de explotación provocará que las especies declinen en su capacidad reproductiva y en la alteración del medio en que se desarrollan; por

lo tanto, esta situación repercute directamente en el aprovechamiento, ya que la disponibilidad de material vegetal de calidad para programas de mejoramiento sería escaso o inexistente.

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

El cultivo de tejidos ha constituido una biotecnología que permite el desarrollo de plantas mejoradas en el laboratorio, ya que tejidos producidos *in vitro* pueden utilizarse en técnicas como transgénesis, edición genética, producción de soma-clones, inducción de mutaciones, entre otros para seleccionar variantes de interés y preparados para las difíciles condiciones bióticas y abióticas que se presentan en las plantaciones [5]. Para facilitar la clonación de materiales seleccionados en el corto plazo, la micropropagación se convierte en una herramienta de la biotecnología que permite la producción de individuos con características genéticas idénticas a la planta que les dio origen. Además, el establecimiento *in vitro* permite un rápido aumento en el número de plantas o la obtención de material vegetal con elevada calidad sanitaria [6]. A pesar de la importancia económica y ecológica de *Samanea saman* a nivel nacional e internacional, existe poca información en la literatura sobre el establecimiento *in vitro* del cenízaro. Esta situación limita el establecimiento de programas de uso y conservación de recursos fitogenéticos. Por lo tanto, se vuelve imperante la micropropagación a través del cultivo de tejidos mediante un sistema eficiente de propagación vegetativa. Hasta la fecha, no hay información sobre micropropagación de la especie *Samanea saman* para producir clones fieles [7].

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

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Forestal del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad

Nacional, ubicado en Santa Lucía Barva, Heredia, Costa Rica. El laboratorio cuenta con un área de transferencia e incubación de material vegetal *in vitro*, así como equipo especializado para este fin.

Material vegetal

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

Un grupo de las plantas originadas a partir de semillas fueron mantenidas en un microtúnel con un régimen de riego por aspersión de 1 min tres veces al día (Figura 1a), donde la humedad promedio fue de 74,8 %. Posteriormente, el grupo de plantas fue trasladado fuera del microtúnel pero, siempre dentro del invernadero con un régimen de riegos de 1 min tres veces por día, donde la humedad promedio fue de 68 % se le aplicó Kasugamisida 5 ml/l (fungicida y bactericida) dos veces por semana (Figura 1b).



Figura 1. Plantas de *Samanea saman* producidas a partir de semillas mantenidas en un invernadero microtúnel (a) y plantas mantenidas fuera del invernadero microtúnel (b).

Figure 1. *Samanea saman* plants bred from seeds kept in a microtunnel greenhouse (a) and plants kept outside the microtunnel greenhouse (b).

Colecta de material y desinfección inicial

De las plantas madre, se colectaron ápices y segmentos nodales, tomados del último y antepenúltimo segmento nodal (Figura 2a). Tanto los ápices como los segmentos nodales de 2,5 cm de largo se colocaron bajo un flujo constante de agua durante 30 min. Seguidamente, se lavaron con agua y jabón antibacterial al 1 % durante 10 min en agitación.

Posteriormente, se evaluaron diferentes tratamientos de desinfección basadas en las metodologías para

germinación *in vitro* de semillas de *Samanea saman* establecidas por Valverde, et al. [8] y Hine, et al. [9], las cuales se detallan en el cuadro 1 y 2 (Figura 2b, 2c y 2d). Una vez aplicados los tratamientos de desinfección, se llevaron a cabo tres lavados con agua destilada estéril.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección empleados para el establecimiento en condiciones *in vitro* de nudos y ápices de *Samanea saman* procedentes del microtúnel correspondientes al primer ensayo.

Table 1. Disinfection treatments used for the establishment of *in vitro* nodes and apexes of *Samanea saman* from the microtunnel corresponding to the first trial.

Tratamiento	Factor: protocolo de desinfección
D1	El material vegetal se sumergió en una mezcla en agitación de Agrimicin® (2 g/l) y Benlate® (2 g/l) por 30 min y se desinfectó con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v i.a. por 20 min.
D2	El material vegetal se desinfectó con cloruro de mercurio (HgCl ₂) al 0,1 % p/v por 5 min en agitación.
D3	El material vegetal se sumergió en una mezcla en agitación de Agrimicin® (2 g/l) y Benlate® (2 g/l) por 30 min y se desinfectó con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5 % v/v i.a. por 15 min.
D4	El material vegetal se desinfectó con cloruro de mercurio (HgCl ₂) al 0,1 % p/v por 5 min con bomba al vacío.

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección empleados para el establecimiento en condiciones *in vitro* de nudos y ápices de *Samanea saman* procedentes de plantas fuera del microtúnel correspondientes del segundo ensayo.

Table 2. Disinfection treatments used for the *in vitro* establishment of nodes and apices of *Samanea saman* from plants outside the microtunnel corresponding to the second trial.

Tratamiento	Factor: protocolo de desinfección
D5	El material vegetal se sumergió en una mezcla en agitación de Kasugamicida (5 ml/l), 30 min por 30 min y se desinfectó con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v i.a. por 20 min.
D6	El material vegetal se desinfectó con cloruro de mercurio (HgCl ₂) al 0,2 % p/v por 5 min con bomba al vacío.

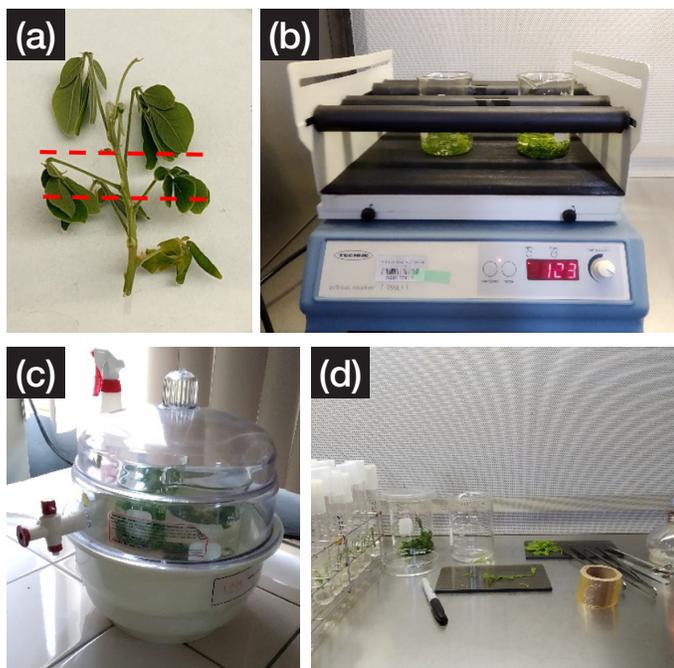


Figura 2. Proceso de desinfección de plantas de *Samanea saman*. La primera línea punteada indica un segmento de ápice introducido y la segunda línea punteada los segmentos de nudo introducidos *in vitro* (a), paso de agitación orbital (b), paso de desinfección en bomba de vacío (c) e introducción *in vitro* en cámara de flujo laminar (d).

Figure 2. Disinfection process of *Samanea saman* plants. The first dashed line indicates an introduced apex segment, and the second dashed line indicates the *in vitro* introduced node segments (a). Orbital agitation step (b), vacuum pump disinfection step (c), and *in vitro* introduction into laminar flow chamber (d).

Efecto de la composición basal del medio de cultivo semisólido sobre la brotación de *Samanea saman* en etapa de introducción

Los explantes desinfectados fueron cultivados *in vitro* evaluando el efecto del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) [10] y Woody Plant Media WPM [11].

Ambos tratamientos fueron complementados con 3 % de sacarosa, el pH del medio fue ajustado a 5,7 antes de la esterilización por autoclave (21 °C, 1,1 kg/cm² presión durante 25 min) y finalmente, se solidificaron con 3 g de Phytigel®. Cada unidad experimental consistió en un explante cultivado en un tubo de ensayo con 10 ml del medio respectivo. Se cultivaron 30 unidades experimentales por tratamiento. El material cultivado se colocó en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 30 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica. La evaluación de la contaminación se realizó cada ocho días durante un mes.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizaron dos ensayos independientes primeramente se analizó el material proveniente del microtúnel y posteriormente se evaluó el material proveniente fuera de este. Cada protocolo de desinfección fue elaborado por el Instituto de Investigación de Servicios Forestales (INISEFOR), considerando que cada protocolo descrito en el cuadro 1 y 2 es un solo factor.

En el primer ensayo, se validó el material proveniente del microtúnel, evaluando cuatro protocolos de desinfección. El segundo ensayo se validó el material procedente fuera del microtúnel evaluando dos protocolos de desinfección independientes.

Para ambos ensayos cada desinfección consistió en 30 nudos y 30 ápices introducidos en tubos de ensayo y se realizaron con dos repeticiones de cada tratamiento. Como unidad experimental, se consideró un nudo de 2,5 cm de longitud cultivado en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo. Se evaluaron las variables: porcentaje de contaminación, porcentaje de establecimiento *in vitro*, brotes por nudo desinfectado y longitud de los brotes establecidos. Asimismo, el ensayo se evaluó semanalmente durante un mes. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Minitab 2.0, en el cual, se realizaron ajustes de Modelo Lineal General con un 95 % de confianza, y las diferencias

Cuadro 3. Respuesta de nudos y ápices provenientes de plantas mantenidas en invernadero microtúnel, después de 28 días de cultivo *in vitro* de *Samanea saman*.

Table 3. Response of nodes and apices from plants grown in a microtunnel greenhouse after 28 days of *in vitro* cultivation of *Samanea saman*.

Explante	Desinfección*	Contaminación			Mortalidad (%) p=0,000	Explantos establecidos (%) p=0,003
		Hongo (%) p=0,002	Bacteria (%) p=0,021	Ambos (%)* p=0,003		
Nudos	D1	8,33 ^b	81,67 ^{ab}	3,33 ^b	0,00 ^b	6,66 ^{ab} c
	D2	11,67 ^b	80,00 ^{ab}	1,67 ^b	0,00 ^b	6,66 ^{ab} c
	D3	10,00 ^b	71,67 ^{ab}	15,00 ^a	3,33 ^b	0,00 ^c
	D4	40,32 ^a	43,55 ^c	14,52 ^a	0,00 ^b	1,61 ^b c
Ápices	D1	3,33 ^b	86,67 ^a	1,11 ^b	0,00 ^b	8,88 ^{ab}
	D2	8,86 ^b	74,68 ^{ab}	1,27 ^b	2,53 ^b	12,65 ^a
	D3	3,17 ^b	87,30 ^a	0,00 ^b	9,52 ^a	0,00 ^c
	D4	12,50 ^b	65,63 ^b	20,31 ^a	0,00 ^b	1,56 ^c

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$, de acuerdo con el test LSD de Fisher. D1: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v i.a. por 20 min, D2: cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,1 % p/v por 5 min en agitación, D3: Hipoclorito de sodio (NaClO) 2,5 % v/v i.a. por 15 min y D4: cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,1 % p/v por 5 min con bomba de vacío. * En la variable ambos se deben considerar los explantes contaminados tanto por bacteria como por hongo.

entre los tratamientos se determinaron con la prueba exacta de Fisher con una confianza del 95 %.

Resultados y discusión

Al evaluar el efecto de cada una de las metodologías de desinfección sobre los ápices y nudos provenientes de invernadero tipo túnel en el primer ensayo, se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en cada una de las variables evaluadas ($p \leq 0,05$) y porcentajes de contaminación mayores al 70 %.

Sin embargo, se destaca que no se observó diferencia estadísticamente significativa entre las metodologías de desinfección D1 y D2 en cuanto al porcentaje de explantes establecidos tanto para los segmentos nodales como para los ápices, obteniendo un promedio de 7 % y 11 % de explantes establecidos en condiciones *in vitro*, respectivamente (Cuadro 3).

Además, los resultados demuestran que, independientemente del tipo de explante, la metodología de desinfección D3 no logró el establecimiento de explantes en condiciones *in vitro*. Adicionalmente, es importante mencionar que, aunque la metodología de desinfección D4 logró el menor porcentaje de contaminación bacteriana, independientemente del tipo de explante, el porcentaje promedio de explantes

establecidos en condiciones *in vitro* no sobrepasa el 1,5 %.

Estos resultados confirman lo investigado por otros autores, los cuales reportan que las plantas de tallo leñoso poseen más dificultad para ser introducir las *in vitro* [12], el establecimiento del cultivo es a menudo limitado debido a las tasas de contaminación más elevadas en comparación con las plantas sin tallo leñoso [13]. Las complicaciones en el inicio *in vitro* de especies leñosas se atribuyen principalmente a la presencia de contaminación microbiana en los explantes provenientes del invernadero [14] [15]. Además, debido a su crecimiento más lento, estas plantas son más susceptibles durante períodos prolongados a diversos tipos de bacterias y hongos difíciles de erradicar externamente [16], [17].

La humedad elevada en los microtúneles es un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos. En países tropicales, las condiciones de temperatura y humedad son propicias para el desarrollo de un sinnúmero de organismos, como es el caso de los hongos [18]. Por lo general, se desarrollan en ambientes con humedad relativa de 74 % a 80 % y temperaturas que van de los 23 °C a los 28 °C [19], los cuales, se encuentran dentro del rango de humedad identificado en el invernadero microtúnel de 74,8 % y 26 °C en promedio. Lo anterior evidenció que el manejo fitosanitario de las plantas madre antes de realizar los ensayos de establecimiento *in vitro* es de suma importancia.

Cuadro 4. Respuesta de nudos y ápices provenientes de plantas mantenidas fuera microtúnel, luego de 35 días de cultivo *in vitro* de *Samanea saman*.

Table 4. *In vitro* establishment of nodes and apices from plants maintained outside in a micro-tunnel greenhouse, after 35 days of *in vitro* culture of *Samanea saman*.

Explante	Desinfección*	Contaminación			Mortalidad (%) p=0,0721	Explantos establecidos (%) p=0,050
		Hongo (%) p=0,029	Bacteria (%) p=0,623	Ambos (%)** p=0,135		
Nudos	D5	3,42 b	5,98 a	2,56 b	2,56 a	85,47 b
	D6	13,00 a	4,07 ab	8,94 a	1,63a	72,36 c
Ápices	D5	1,67 b	0,00 b	0,00 b	0,00 a	98,33 a
	D6	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 a	100 a

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$, de acuerdo con el test LSD de Fisher. *D5: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v i.a. por 20 min, D6: cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,2 % p/v por 5 min con bomba. Prueba Fisher con un 95% de confianza.

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

Establecimiento *in vitro* de nudos y ápices tomados de plantas mantenidas fuera del microtúnel

Después de identificar los resultados del ensayo del material vegetal del invernadero microtúnel, se aplicó un manejo fitosanitario y se mantuvo las plantas a temperatura ambiente, este proceso demostró mejoras significativas en el establecimiento del protocolo.

Al evaluar el efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v i.a. + tween al 0,1 % v/v durante 20 min (D5) y cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,2 % p/v por 5 min con bomba de vacío (D6) sobre los explantes (ápices o nudos) mantenidas fuera del invernadero microtúnel, se obtuvo una diferencia estadística significativa en cada una de las variables evaluadas ($P \leq 0,05$) (Cuadro 4). Ambas metodologías mostraron ser eficientes en la eliminación de patógenos, obteniéndose porcentajes de contaminación, inferiores al 13 % (Cuadro 4). Se determinó que el uso de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v i.a de concentración durante 20 min, fue más eficiente para la desinfección de nudos de cenízaro, con un 85 % de explantes libres de contaminación (Figura 3B). Para el caso de los ápices, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambas metodologías respecto al porcentaje de establecimiento, los cuales fueron de 98 % y 100 % para los tratamientos D5 y D6 respectivamente (Cuadro 4), sin embargo, se observó que los ápices tratados con la metodología de desinfección que incluía cloruro de mercurio (HgCl₂) (Figura 3a), presentaron mejor apariencia.

Según lo expuesto por los autores Kasthuriengan et al [7], se logró una introducción exitosa de cenízaro con nudos provenientes de una planta madre de 20 años de edad, aplicando el hipoclorito de sodio (NaClO) al 5,25 % v/v i.a durante 15 min. Por otra parte, Valverde et al [8], lograron un establecimiento usando como material semillas e

hipoclorito de sodio al 5,5 % v/v i.a. Lo anterior confirma los resultados obtenidos, ya que se ha demostrado en trabajos previos, que el hipoclorito de sodio (NaClO) funciona exitosamente en el establecimiento *in vitro* de la especie de *Samanea saman*, probablemente debido a ser un material de bajo costo y alta efectividad. Además, uno de los hallazgos de esta investigación, es que se demostró que el uso de cloruro de mercurio (HgCl₂) es un método novedoso para la especie.

Asimismo, en el presente estudio se observó una mayor contaminación por nudos en comparación con los ápices. Araya [20], encontró resultados similares para *Alnus acuminata* Kunth (jaúl), donde los ápices obtuvieron una menor contaminación, cuyo porcentaje de contaminación no fue mayor al 45 %. En su estudio utilizó 4 concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO): 0,5 %, 1,0 %, 2,5 % y 5,0 % v/v i.a.

De esta manera, considerando que los ápices son estructuras juveniles y de crecimiento continuo, se dificulta a los agentes contaminantes almacenarse en el interior de dichos tejidos. Tal y como lo indica Araya [20], los ápices son zonas de crecimiento activo, lo que hace que tanto los hongos como las bacterias se localizan en los primordios externos, que son precisamente los que se eliminan durante los procesos de desinfección y disección. En consecuencia, los explantes tomados a partir del tejido más joven, como los ápices suelen tener niveles más bajos de microorganismos detectables en condiciones *in vitro* [21], [22].

Evaluación de efecto de medio de cultivo y su inducción de brotes en segmentos nodales

De acuerdo con el Cuadro 5, se observó una diferencia significativa entre los dos medios de cultivo, demostrando

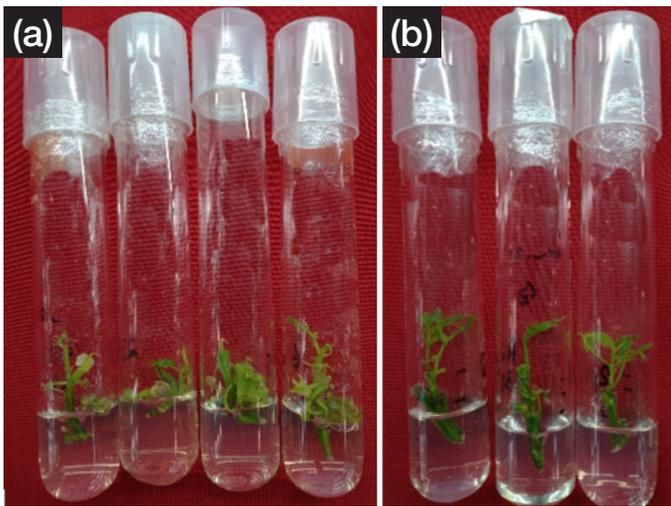


Figura 3. Explantes de *Samanea saman* establecidos *in vitro* (a) ápices desinfectados con cloruro de mercurio (HgCl₂) 0,2 % p/v durante 5 minutos y (b) nudos desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % v/v i.a de concentración durante 20 min

Figure 3. *Samanea saman in vitro* explants (a) apex disinfected with 0.2 % w/v mercuric chloride (HgCl₂) for 5 minutes, and (b) nodes disinfected with 1 % v/v active ingredient concentration sodium hypochlorite (NaClO) for 20 minutes.

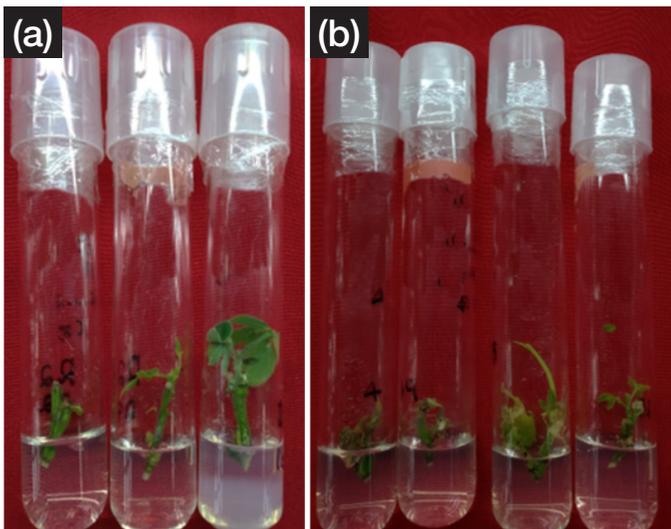


Figura 4. Explantes de *Samanea saman* establecidos *in vitro* sembrados en medio de cultivo semisólido (a) medio de cultivo MS (b) medio de cultivo WPM, establecidos en condiciones *in vitro*.

Figure 4. *Samanea saman in vitro* explants planted in semi-solid culture medium (a) MS culture medium (b) WPM culture

un mejor desarrollo de los explantes cultivados en medio MS tanto para la variable brotación de nudos (51,67 %) como para la longitud del brote (0,32 cm). De manera cualitativa, los explantes cultivados en medio WPM

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

Table 5. Effect of culture medium on shoot induction from nodal explants of *Samanea saman* established under *in vitro* conditions, after 35 days of culture.

Medio de cultivo	Brotación (%) p=0,001	Longitud del brote (cm) p=0,00
MS	51,67 ^a	0,32 a ± 0,03808
WPM	34,17 ^b	0,16 b ± 0,2640

Letras distintas indican diferencias significativas p<0,05, de acuerdo con el test LSD de Fisher.

presentaron mayor oxidación en comparación con aquellos cultivados en medio MS (Figura 4a y Figura 4b). Según los autores Azofeifa [23] y Vílchez, et al. [24], el oscurecimiento de tejidos es con frecuencia más pronunciado en un tipo de medio de cultivo que en otro, lo cual puede ser causado por el uso inapropiado de alguno de los nutrientes empleados en el medio. Además, se señala que, en ocasiones, a pesar de lograr una eliminación efectiva de microorganismos, los explantes pueden experimentar muerte en los primeros días de cultivo. Esto se debe a la liberación de compuestos fenólicos, cuya oxidación posterior ocasiona la coloración más oscura del medio y del explante, obstaculizando así el transporte de nutrientes en los tejidos vegetales [25].

La media de brotes por explante sin la incorporación de ninguna concentración hormonal al medio de cultivo, fue del 51,67 % para el mejor de los casos. Mientras, Kasthuriengan et al. [7] informaron mejores resultados por brote usando varias concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido giberélico (GA3) en medio MS en comparación con WPM después de cinco semanas. Estos autores también confirmaron que la especie tuvo un desarrollo óptimo en medio MS.

Por el contrario, Campos et al [26], reportaron que el medio WPM fue más eficiente que el MS para el cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (caoba), para las variables número de hojas, longitud y número de brotes. Además, Vílchez, et al. [24], obtuvo una mejor respuesta de medio WPM en comparación con MS en las variables evaluadas: número de nudos, número de brotes y longitud de brotes, para la especie *Psidium guajava* L (guayaba).

El presente estudio evidenció, un mejor desarrollo de la especie para el medio MS. Esto podría deberse a concentraciones más altas NH₄⁺ y CaCl₂ en el medio en comparación con WPM, asimismo, Vengadesan et al. [27] mencionan que la concentración iónica es relativamente baja para el medio WPM por lo que, puede afectar en la formación y crecimiento de brotes. Resultados similares

fueron obtenidos en otras especies leguminosas *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. [27] y *Pterocarpus marsupium* Roxb [28]. Lo anterior, sugiere que el medio MS favorece en la brotación de especies arbóreas leguminosas.

Conclusiones

En la presente investigación sobre la especie *Samanea saman*, los resultados indicaron que el material vegetal mantenido fuera del microtúnel (D5 y D6) presentó un menor porcentaje de contaminación en comparación con el material mantenido en el microtúnel (D1-D4), en relación con los tratamientos evaluados. Esto demuestra la importancia del manejo y las condiciones ambientales del material vegetal.

Para el establecimiento *in vitro* de la especie el uso de hipoclorito de sodio (NaClO) 1 % v/v i.a.+ tween al 0,1 % v/v por 20 minutos como agente desinfectante generó el mayor porcentaje de nudos establecidos en condiciones *in vitro* (85 %). En el caso de los ápices, no hubo diferencias significativas entre los desinfectantes evaluados, sin embargo, cualitativamente aquellos tratados con cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,2 % p/v durante 5 minutos con bomba de vacío mostraron menor oxidación.

Asimismo, la composición basal del medio de cultivo influyó en el número y longitud de brotes de *Samanea saman*, mostrando mejores resultados el medio MS en comparación con el WPM.

Referencias

[1] J. Reed, J. van Vianen, S. Foli, J. Clendenning, K. Yang, M. MacDonald, G. Petrokofsky, C. Padoch, y T. Sunderland, "Trees for life: The ecosystem service contribution of trees to food production and livelihoods in the tropics", *Forest Policy and Economics*, vol. 84, pp. 62–71, 2017.

[2] E. Moravi, *Cuidemos nuestra propiedad y el valor de nuestros bosques con buenas prácticas en los contratos madereros. Manual de herramientas II*, CATIE, 2014.

[3] R. Quesada, "Consideraciones silviculturales de ocho especies forestales con poblaciones reducidas o en peligro de extinción en la provincia de Guanacaste", *Revista Foresta Mesoamericana Kúru*, vol. 1, no. 1, pp. 1-15, 2004. h[4] O. Murillo y V. Guevara, "Estado de los recursos genéticos forestales de Costa Rica", MINAET/FAO/CONAGEBIO, 2012. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-be886s.pdf>

[5] V. Loyola y N. Ochoa, *Plant Cell Culture Protocols*, New York: Humana Press, 2018. [6] J. Scherer, L. Silveira, B. Gomes, C. Peiche y A. Vasconcelos, "Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.)

Taub)", *Ciencias Forestales*, Santa Maria, vol.16, no.4, pp. 381-390, 2006.

[7] S. Kasthuriengan, Y.K. Fong, Y. Hong, L. Xie, y C.H. Li, "In vitro propagation and assessment of genetic stability of micropropagated *Samanea saman* (rain tree) using microsatellite markers", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 35, no.8, pp. 2467–2474, 2013.

[8] L. Valverde, M. Dufour, y V. Villalobos, "In vitro Propagation of *Pithecellobium saman* (cenízaro)", *In Vitro cellular & Developmental Biology. Plant*, vol. 33, no.1, pp. 38-42, 1997.

[9] A. Hine, A. Rojas y M. Daquinta, "Establecimiento in vitro de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (amarillón) y *Vochysia allenii* (botarrama blanco)", *Revista Colombiana Biotecnología*, vol.15, no. 2, pp.180-186, 2014.

[10] T. Murashige y F. Skoog, "Un medio revisado para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivo de tejido de tabaco. *Physiologia plantarum*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.

[11] L. G. and B. H. McCown, "Woody Plant Medium (WPM)-A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species," *HortScience*, vol. 15, no. 3, pp. 417-418, 1980.

[12] B.M. Panda, U.J. Mehta, y S. Hazra, "Micropropagation of *Semecarpus anacardium* L. from mature tree-derived nodal explants", *Plant Biosystems*, vol. 150, no.5, pp. 942–952, 2016.

[13] J. Kanwar, S. Godara, M.K. Kaul y A.K. Srivastava, "Micro Propagation of Carrizo (Citrus Carrizo) through Mature Bud Culture", *Agricultural Science Digest*, vol.33, no.2, pp. 109–113, 2013.

[14] M. Carranza, A. Escobar, H. Reyes, J. Morante, J. Nieto, M. Cadme, O. Cevallos y W. Mora. "Propagación clonal in vitro de *Swietenia macrophylla* King (caoba)", *Ciencia y Tecnología*, vol. 6, no. 2, pp. 1–8, 2014.

[15] B. Indacochea, J.Parrales, A.Hernández, C.Castro, M.Vera, A.Zhindón y J.Gabriel, "Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador", *Agronomía Costarricense*, vol.42, no1, pp.63-89, 2018.

[16] A. Villegas, *Métodos asépticos. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. FAO, 1990. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/258835207_Fundamentos_Teorico-Practicos_del_Cultivo_de_Tejidos_Vegetales

[17] A. Hine y A. Abdelnour, "Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L)", *Revista Tecnología en marcha*, vol.26, no.4, pp. 64-71, 2013.

[18] G. Araque, "Evaluación in vitro de cepas nativas de hongos filamentosos como agentes controladores de *Phytophthora infestans*", Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2014.

[19] H. Benaouali, N.Hamini, A.Bouras, S.Benichou, M.Kihal y J.Henni, "Isolation, pathogenicity test and

- physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*”, *Advances in Environmental Biology*, vol.8, no.10, pp.36-49, 2017.
- [20] E. Araya, “Establecimiento y multiplicación in vitro de jaúl (*Alnus acuminata*)”, Tesis de bachillerato, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2000.
- [21] A. Cassells. “Pathogen and biological contamination management in plant tissues culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests”, *Methods in Molecular Biology*, vol 877, pp.57-80,2012.
- [22] M. Murillo,” Establecimiento in vitro de tacaco [*Sechium tacaco* (Pittier) C. Jeffrey syn. *Frantzia tacaco*]”, Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José, 2019.
- [23] A. Azofeifa, “Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro”, *Agronomía Mesoamericana*, vol.20, no.1, pp.153-175, 2009.
- [24] J. Vílchez, L. Martínez, C. Álvarez, A. Albornoz, N. Albany, M. Molina y L. García, “Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación in vitro *Psidium guajava*”, *Biotecnología Vegetal*, vol.14, no.1, pp. 15-20, 2014.
- [25] N. Tytarenko , N. Tesliuk ,V. Ivanytsia, “Optimization of the protocol for the in vitro establishment of *Paulownia tomentosa* steud.” *South-Western Journal of Horticulture Biology & Environment*, vol.14, no. 1, pp. 1–13, 2023.
- [26] J. Campos, M. Arteaga, S. Campos, J. Chico y L. Cerna, “Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de “caoba” *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae)”, *Arnaldoa*, vol. 27, no.1, pp. e86-e94, 2020. [27] G. Vengadesan, A. Ganapathi, R. Pream Anand y N. Salvaraj. “In vitro propagation of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. From nodal segments of a 10 years old tree”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, vol 39, no.4, pp 409-414, 2003.
- [28] M.K. Husain, M. Anis y A. Shahzad. “In vitro propagation of multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants”, *Acta Physiologiae Plantarum*”, vol 30, no.3, pp 353-359, 2008.