Thesis
P438da
c.2

45
C2

AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

A DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSGRADUADOS

Biblioteca Conmemorativa
CATIE - IICA - CATIE
17 DIC 2001
RECIBIDO
Costa Rica

DESARROLLO DE UN METODO DE MICROPROPAGACION APLICABLE A GENOTIPOS SELECTOS DE *Cedrela odorata* L.

POR

JULIAN PEREZ FLORES

Turrialba, Costa Rica
2001

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE EDUCACION PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSGRADO

Biblioteca Conmemorativa
ORTON - IICA - CATIE
17 DIC 2001
RECIBIDO
Turrialba, Costa Rica

DESARROLLO DE UN METODO DE MICROPROPAGACION APLICABLE A GENOTIPOS SELECTOS DE *Cedrela odorata* L.

Por

JULIAN PEREZ FLORES

C A T I E

Turrialba, Costa Rica
2001

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO
Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADO

DESARROLLO DE UN METODO DE MICROPROPAGACION APLICABLE A GENOTIPOS SELECTOS DE *Cedrela odorata* L.

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación, del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, como requisito parcial para optar por el grado de:

Magister Scientiae

Por

JULIAN PEREZ FLORES

Turrialba, Costa Rica
(2001)

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Francisco Mesén, Ph.D.
Profesor Consejero

María Elena Aguilar, Ph.D.
Miembro Comité Asesor

Carlos Navarro, M.Sc.
Miembro Comité Asesor

Luko Hilje, Ph.D.
Miembro Comité Asesor

Al Moslemi, Ph.D.
Director Escuela de Posgrado

Julián Pérez Flores
Candidato

DEDICATORIA

A DIOS POR GUIAR SIEMPRE MIS PASOS.

A MIS PADRES Y HERMANOS, QUIENES ESTAN SIEMPRE CONMIGO.

A MI PEQUEÑA GRAN FAMILIA: ANA MARIA Y YULIANA, POR SU COMPRENSIÓN Y CARIÑO QUE ME HACEN SEGUIR ADELANTE EN TODO MOMENTO.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al CATIE por brindarme la oportunidad de dar un paso más en la interminable travesía del conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, por el apoyo económico que hizo posible la culminación de mis estudios.

A todos los miembros de mi Comité Asesor, Ph. D. María Elena Aguilar, Francisco Mesén, Luko Hilje y M. Sc. Carlos Navarro, por su atención y observaciones constantes.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología, especialmente a Edgar y Don Guillermo, por toda la ayuda brindada.

A todos los profesores, por sus enseñanzas y tiempo ofrecidos.

Al Dr. Gilberto Páez, por la confianza y consejos brindados.

A Gustavo López, por el apoyo en los aspectos estadísticos.

A todos los compañeros estudiantes y sus familias, por el tiempo compartido.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de mis estudios.

Nuevamente A DIOS.

CONTENIDO

DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTOS iv
CONTENIDO v
RESUMEN vii
ABSTRACT viii
Lista de figuras ix
Lista de cuadros xii
Lista de anexos xii

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Objetivos 2
1.1.1. Objetivo general 2
1.1.2. Objetivos específicos 2
1.2. Hipótesis 2

2. REVISIÓN DE LITERATURA 3
2.1. Importancia de *Cedrela odorata* 3
2.2. Distribución geográfica y hábitat 3
2.3. Clasificación botánica 3
2.4. Barrenador de las meliáceas 4
2.5. Variación genética 4
2.6. Fenología y crecimiento 5
2.7. Uso de la biotecnología en la propagación de especies forestales 6
2.8. Micropropagación de especies forestales tropicales 8
2.8.1. Explantes y establecimiento de cultivos *in vitro* 8
2.8.2. Germinación *in vitro* de semillas de especies forestales para la obtención de explantes 9
2.8.3. Multiplicación 11
2.8.4. Desarrollo 13
2.8.5. Enraizamiento 13
2.8.5.1. Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microestacas 14
2.8.5.2. Efecto de auxinas en el enraizamiento de microestacas 15
2.8.5.3. Efecto de la oscuridad en el enraizamiento de microestacas 16
2.8.5.4. Efecto del medio de cultivo en el enraizamiento de microestacas 16
2.8.6. Aclimatación 17

3. MATERIALES Y MÉTODOS 20
3.1. Ubicación de la investigación 20
3.2. Fuente de explantes 20
3.3. Desinfección de semilla y germinación *in vitro* 20
3.4. Cultivo de microestacas 20
3.4.1. Fase de iniciación 20
3.4.2. Fase de multiplicación 21
3.4.3. Fase de desarrollo 21
3.4.4. Fase de enraizamiento 21
3.4.4.1. Enraizamiento *in vitro* 21
3.4.4.2. Enraizamiento *ex vitro* 22

3.4.5. Análisis estadístico 22

4. RESULTADOS 24
4.1. Obtención de explantes a partir de semilla germinada *in vitro* 24
4.2. Fase de multiplicación 24
4.2.1. Días a brotación 26
4.2.2. Porcentaje de brotación 26
4.2.3. Porcentaje de supervivencia 27
4.2.4. Número promedio de brotes por explante 27
4.2.5. Altura de brote 28
4.3. Fase de desarrollo 29
4.3.1. Altura del brote 29
4.3.2. Porcentaje de supervivencia 30
4.3.3. Porcentaje de enraizamiento 30
4.3.4. Número promedio de raíces por explante 31
4.3.5. Longitud de raíz 33
4.3.6. Raíces secundarias 34
4.4. Fase de enraizamiento 35
4.4.1. Inducción de raíces 35
4.4.1.1. Porcentaje de supervivencia 35
4.4.1.2. Porcentaje de enraizamiento 36
4.4.1.3. Número promedio de raíces por explante 37
4.4.1.4. Longitud de raíces 38
4.4.2. Expresión de raíces 39
4.4.3. Enraizamiento *ex vitro* 40

5. DISCUSIÓN 42

6. CONCLUSIONES 48

7. RECOMENDACIONES 49

8. LITERATURA CITADA 50

ANEXOS 62

Pérez, FJ. 2001. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 70 p.

Palabras claves: *Cedrela odorata*, micropropagación, citocininas, auxinas, sacarosa, carbón activado, gelificantes.

RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos e invernadero de la Unidad de Biotecnología del CATIE, de enero a noviembre de 2001. El objetivo fue contribuir con el desarrollo de una metodología de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *C. odorata*.

Los explantes de nudo cotiledonar, obtenidos de semilla germinada *in vitro*, se establecieron en medio MS al 50% suplementado con 2,2 µM de 2-iP para iniciación de brotes axilares. Para evaluar el efecto de citocininas en la multiplicación, los brotes obtenidos se subcultivaron en el mismo medio, suplementado con 2,2, 6,5, 13,3 o 20 µM de BAP, kinetina o 2-iP. Con explantes epicotiledonares, se evaluaron los medios MS y WPM (100, 75, 50 y 25%) combinados con sacarosa (10, 20, 30, 40 gl^{-1}), para obtener un medio de desarrollo que acondicionara los brotes antes del enraizamiento. Para el enraizamiento *in vitro*, se utilizaron brotes obtenidos de nudo cotiledonar establecidos en medio MS al 50% suplementado, en la fase de inducción con ANA (0,5 y 1,0 mgl^{-1}) combinada con AIB (1,0 y 1,5 mgl^{-1}), donde también se tuvo un testigo absoluto sin auxinas, mientras que para la fase de expresión se evaluó el efecto de carbón activado (0, 1,5, 2,0 y 3 gl^{-1}) combinado con sacarosa (15, 30, 45 gl^{-1}) y Agar o Phytagel como gelificante. Para el enraizamiento *ex vitro* se evaluaron altas concentraciones de ANA (11,5 y 23 mgl^{-1}) y de AIB (43,0 y 86,0 mgl^{-1}) más tiempos de oscuridad (8, 16 y 24 h) en arreglo factorial.

Los explantes sobrevivieron en todos los tratamientos de citocininas. El número máximo de brotes se obtuvo con BAP a 2,2 y 6,5 µM. Estos tratamientos también fueron estadísticamente superiores en cuanto a días a brotación, porcentaje de brotación y altura de brotes obtenidos. Las altas concentraciones de ésta y las demás citocininas produjeron callo en la base de los explantes.

Hubo efecto del medio de cultivo, pero no de las concentraciones del medio ni de sacarosa para el desarrollo de los brotes. El mejor medio fue WPM al 50% suplementado con sacarosa a 30 gl^{-1}, en base a la tendencia observada para altura de brote y porcentaje de sobrevivencia. Además, esta combinación favoreció más notoriamente el enraizamiento de los explantes.

Hubo diferencia significativa (Duncan 0,05) entre el testigo absoluto y los tratamientos de auxina en cuanto al porcentaje de enraizamiento y número promedio de raíces por explante. Se observó efecto de ANA para la inducción de raíz. Sólo hubo diferencia estadística para número de raíces, y en general las bajas concentraciones de ANA o AIB favorecieron el enraizamiento. La mejor combinación fue ANA a 0,5 mgl^{-1} más AIB a 1,0 mgl^{-1}.

No hubo efecto de la interacción entre carbón activado, sacarosa y tipo de gelificante para la expresión de raíz. El carbón activado en general, y las altas concentraciones del mismo en particular, afectaron la sobrevivencia de los brotes y el porcentaje de enraizamiento y el número y la longitud de raíces. Por el contrario, y aunque no hubo diferencias estadísticas, las altas concentraciones de sacarosa favorecieron el enraizamiento en cuanto al porcentaje y número de raíces. No hubo diferencias estadísticas entre los dos gelificantes evaluados.

Pérez, FJ. 2001. Development of a micropropagation method to select genotypes of *Cedrela odorata* L.

Key words: *Cedrela odorata*, micropropagation, cytokinins, auxins, sucrose, activated charcoal, gelling agents.

ABSTRACT

This research was carried out in the Tissue Culture Laboratory and the greenhouse of CATIE Biotechnology Unit, from January to November, 2001, in order to get a micropropagation methodology to elite cedar trees.

Cedar seeds were sawn *in vitro* and the seedlings were used as source of explants. Nodal cotiledonar explants were established on half strong MS medium which had 2-iP (2,2 μM) for axillary shoot initiation. Then the shoots gotten were sub-cultured in the same medium added with BAP, Kinetin or 2-iP at 2,2, 6,5, 13,3 or 20 μM looking for shooting. As a conditioning intermediate step for rooting, epicotiledonary explants were cultured in development media consisting of MS or WPM media at 100, 75, 50 or 25% strength combining each with sucrose at 10, 20, 30 or 40 mgl^{-1}. Other shoots from nodal cotiledonary explants were used to value auxins (NAA 0,5, 1,0 and IBA 1,0, 1,5 mgl^{-1}), active charcoal (0, 1,5, 2,0, 3,0 gl^{-1}), sucrose (15, 30,45 gl^{-1}) and gelling agent (Agar, Phytagel) effect on *in vitro* rooting system characterized by induction, expression and roots development in a half strength MS medium. There was an auxin free absolute witness in the induction phase. Also, the auxin higher concentrations (ANA 11,5, 23,0 and IBA 43, 86 mgl^{-1}) and obscurity time effects were tested as a pulse for rooting *ex vitro*.

The cytokinins allow the survivor of explants. BAP at 2,2 or 6,5 μM produced the highest number of shoots. These treatments were statistically the best for shooting percentage and time, and for shoot length. There was callus in the explant base with all the cytokinins at the higher concentrations.

In the shoot development , the kind of medium showed effect in shoot length, but neither its concentration nor the sucrose concentration did not. The WPM was better than MS medium because it promoted the development besides to cause a general rooting. A half strength WPM plus sucrose 30 gl^{-1} was the best combination to promote shoot length, survivor percentage and rooting in the explants.

In the rooting percentage and the root average number, the auxin treatments were statistically different (Duncan 0,05) from the absolute witness. The NAA meaning effect was present in the induction phase, but only in the root number there was statistic difference. The rooting was encouraged by either NAA or IBA low concentrations. So, NAA at 0,5 mgl^{-1} plus IBA at 1,0 mgl^{-1} was the best combination.

In the root expression phase the interaction among activated charcoal, sucrose and gelling agent did not have effect. In general, the activated charcoal, and specifically its higher concentrations, affected the shoot survivor, the rooting percentage and the root number and length. In contrast, the highest sucrose concentration pleased the same variables decreased by activated charcoal. However there were not statistical differences, such as between the gelling agents.

Lista de figuras

Figura 1. Fase de multiplicación de cedro a partir de explantes nodales obtenidos de semilla germinada *in vitro*. A. Plántulas albinas que disminuyeron la disponibilidad de material como fuente de explantes. B. Producción de callo y raíz, observada en altas concentraciones de citocinina. C. Producción de explantes nodales. D. Multiplicación de explantes nodales..... 25

Figura 2. Efecto de diferentes citocininas sobre el porcentaje de brotación de explantes nodales de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP..... 27

Figura 3. Efecto de diferentes citocininas sobre el porcentaje de supervivencia de explantes nodales de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP..... 27

Figura 4. Efecto de diferentes citocininas sobre el número promedio de brotes por explante nodal de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP..... 28

Figura 5. Efecto de diferentes citocininas sobre la altura de brotes obtenidos en explantes nodales de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP..... 29

Figura 6. Efecto de diferentes factores sobre la altura de brotes de cedro. A. Concentración del medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa..... 29

Figura 7. Efecto de la interacción entre la concentración del medio WPM y la concentración de sacarosa, sobre la altura de brotes de cedro..... 30

Figura 8. Efecto de diferentes factores sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa..... 31

Figura 9. Efecto de la interacción entre la concentración de medio WPM y de sacarosa en el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro..... 31

Figura 10. Efecto de diferentes factores sobre el número de raíces de brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa..... 32

Figura 11. Efecto de la interacción entre concentración de medio medio de cultivo WPM y de sacarosa en el número de raíces en brotes de cedro..... 32

Figura 12. Efecto de diferentes factores sobre la longitud de raíz en brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa..... 33

Figura 13. Efecto de la interacción entre la concentración del medio de cultivo y de sacarosa, en la longitud de raíces de brotes cedro..... 34

Figura 14. Efecto de diferentes factores sobre el número de raíces secundarias de brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa..... 34

Figura 15. Efecto de la interacción entre la concentración de medio de cultivo WPM y de sacarosa, en el número de raíces secundarias en brotes de cedro..... 35

Figura 16 . Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de supervivencia de brotes de cedro. A. Combinaciones de ANA y AIB y testigo absoluto. B. Efecto individual de ANA..... 36

Figura 17. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de supervivencia de brotes de cedro. A. Efecto individual de AIB. B. Efecto de la interacción entre ANA y AIB..... 36

Figura 18. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro. A. Combinaciones de ANA y AIB y testigo absoluto. B. Efecto individual de ANA..... 37

Figura 19. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro. A. Efecto individual de AIB. B. Efecto de la interacción entre ANA y AIB..... 37

Figura 20. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el número promedio de raíces en brotes de cedro. A. Combinaciones de ANA y AIB y testigo absoluto. B. Efecto individual de AIB..... 38

Figura 21. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el número promedio de raíces en brotes de cedro. A. Efecto individual de ANA. B. Efecto de la interacción entre ANA y AIB..... 38

Figura 22. Efecto de tratamientos de auxinas sobre la longitud de raíz en brotes de cedro. A. Combinaciones de ANA y AIB y testigo absoluto. B. Efecto individual de ANA..... 39

Figura 23. Efecto de tratamientos de auxinas sobre la longitud de raíz en brotes de cedro. A. Efecto individual de AIB. B. Efecto de la interacción entre ANA y AIB..... 39

Figura 24. Producción de raíces en micropropagación de cedro a partir de explantes nodales. A. Fase de enraizamiento. B. Enraizamiento espontáneo en fase de desarrollo. C. Plantas aclimatadas..... 41

Lista de cuadros

Cuadro 1. Efecto de diferentes citocininas en la fase de multiplicación de explantes nodales de cedro..... 26

Cuadro 2. Efecto de carbón activado, azúcar y tipo de gelificante en la fase de expresión de raíces de cedro..... 40

Lista de Anexos

Anexo 1. Composición química (mgl^{-1}) de los medios de cultivo básicos, empleados en las diferentes etapas de la micropropagación de cedro..... 63

Anexo 2. Efecto de diferentes citocininas y concentraciones sobre porcentaje de brotación, número promedio de brotes por explante y altura de brotes en tres ensayos (E1, E2, E3) de multiplicación de cedro..... 64

Anexo 3. Análisis de varianza para las diferentes variables evaluadas en la etapa de multiplicación *in vitro* de cedro..... 65

Anexo 4. Efecto de la benzilaminopurina (BAP) en la brotación de explantes nodales de cedro..... 66

Anexo 5. Análisis de varianza para las variables evaluadas en la etapa de desarrollo *in vitro* de cedro..... 67

Anexo 6. Valores promedio para las variables y factores evaluados en la etapa de desarrollo de brotes de cedro..... 68

Anexo 7. Interacción entre medio-concentración de medio-concentración de azúcar en altura de brote..... 69

Anexo 8. Valores promedio, para los tratamientos con WPM, en las diferentes variables evaluadas en la fase de desarrollo de cedro..... 70

Anexo 9. Valores promedio, para los niveles de medio WPM y de azúcar, en las diferentes variables evaluadas en la fase de desarrollo de cedro..... 71

Anexo 10. Prueba de medias de cuadrados mínimos (LSMEANS) para la interacción entre concentración de medio WPM y concentración de azúcar, evaluada en la fase de desarrollo de brotes de cedro..... 72

Anexo 11. Tratamientos evaluados para la fase de inducción de raíz de brotes de cedro..... 74

Anexo 12. Comparación de medias para los tratamientos evaluados en la fase de inducción de raíz en brotes de cedro..... 75

Anexo 13. Análisis de varianza para las diferentes variables evaluadas en la fase de inducción de raíz de brotes de cedro..... 76

Anexo 14. Promedios para las diferentes variables y factores evaluados en la etapa de inducción de raíz de brotes de cedro..... 77

Anexo 15. Prueba de medias de cuadrados mínimos (LSMEANS) para la interacción entre ANA y AIB sobre las diferentes variables evaluadas en inducción de raíz de cedro..... 78

Anexo 16. Tratamientos evaluados en la fase de expresión de raíz en brotes de cedro..... 79

Anexo 17. Análisis de varianza para las diferentes variables evaluadas en la fase de expresión de raíz en brotes de cedro..... 80

Anexo 18. Tratamientos evaluados para el enraizamiento *ex vitro* de microestacas de cedro..... 81

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la vegetación arbórea se ha visto seriamente alterada principalmente en los bosques tropicales, donde la explotación forestal, la agricultura, ganadería y otros usos de la tierra, en constante aumento, ocasionan un desequilibrio ecológico, así como la desaparición de un gran número de fenotipos superiores de especies arbóreas (Sol *et al.* 1998).

El cedro (*Cedrela odorata* L.) es una de las especies de la familia Meliaceae citada entre las más valiosas del mundo; sin embargo, debido a las talas selectivas y la falta de tecnologías para su reproducción, ha sufrido una sobreexplotación no compensada con programas para su reproducción, sus poblaciones naturales se reducen rápidamente (Albert *et al.* 1995), y es cada vez más difícil localizar árboles con diámetros de valor comercial (Alvarez 1999). Aunado a lo anterior, la gran mayoría de las especies forestales de clima tropical permanecen poco estudiadas y una muestra de ello es que la Asociación Internacional para Análisis de Semillas (ISTA) no informa las condiciones en que deben realizarse las pruebas de germinación para muchas especies comercialmente importantes, como *C. odorata* y *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) entre otras (Peña y Montalvo 1986).

Por otro lado, existe el problema que a nivel continental presenta esta especie con el barrenador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae), el cual ha impedido el establecimiento de plantaciones extensas a escala comercial (Newton *et al.* 1993). Afortunadamente aún es posible encontrar una gran variabilidad genética de la especie (Navarro y Vásquez 1986), la cual es muy útil en programas de mejoramiento genético, así como en ensayos de propagación vegetativa utilizando técnicas de cultivo de tejidos, en busca de nuevas posibilidades para resolver los problemas planteados.

En general, los árboles poseen una serie de características, como su larga vida y gran tamaño, además de ser silvestres (no domesticados), y genéticamente muy variables, lo que hace que los procedimientos y métodos del mejoramiento genético forestal sean muy diferentes de los programas de mejoramiento de cultivos anuales (Cornelius 1995). Afortunadamente, la micropropagación tiene un uso práctico en la producción en masa de cruces de alto valor combinatorio específico o de progenies de árboles élite que producen poca semilla (germinación de semilla seguida por clonación). Asimismo, el cultivo *in vitro* facilita la clonación de individuos maduros de especies que no rebrotan o de especies difíciles de injertar y favorece la clonación rápida de los individuos en jardines de multiplicación clonal (Mihaljevic *et al.* 1996).

En meliáceas se están realizando algunos estudios en poblaciones naturales para caracterizar diversidad genética (Patiño 1997). Particularmente, dentro del proyecto de "Mejoramiento genético de meliáceas" en el CATIE, se están evaluando 380 procedencias de *C. odorata* de las cuales se han identificado algunas por su buen desarrollo y por presentar diferentes grados de tolerancia a *Hypsipyla grandella*, a un año de su establecimiento en campo (Navarro 2000, com. pers.). La germinación *in vitro* de este material, así como su posterior micropropagación y aclimatación de las plántulas obtenidas, es importante para conocer el comportamiento de esta especie en cultivo *in vitro* y apoyar la multiplicación de genotipos superiores en programas de mejoramiento genético.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general. Contribuir con el desarrollo de un método de micropropagación de cedro (*Cedrela odorata* L.), que sirva como herramienta a los programas de mejoramiento genético forestal.

1.1.2. Objetivos específicos

- Optimizar la fase de multiplicación *in vitro* a partir de explantes nodales obtenidos de plántula de semilla germinada *in vitro*.
- Determinar las condiciones óptimas para el enraizamiento de los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación.

1.2. Hipótesis

- Los explantes nodales permiten la multiplicación exitosa de *C. odorata*.
- Un enraizamiento óptimo de explantes nodales de *C. odorata* se obtiene tanto *in vitro* como *ex vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de *Cedrela odorata*

Cedrela significa pequeño cedro y deriva de *Cedrus*, el cual hace referencia a la corteza aromática. *Cedrela odorata* se conoce como cedro hembra, cedro español, cedro real, cedro rojo, cedro cebolla, cedro bateo, cedro cóbano, cedro amargo o cedro (Jiménez 1999). Es la especie más importante y ampliamente distribuida del género *Cedrela*. Su madera tiene alta demanda en los trópicos y ha abastecido el mercado internacional en los últimos 200 años, bajo los nombres de Spanish cedar o West Indian cedar (FUNDECOR 2001). Se utiliza en la construcción de edificios (puertas talladas, marcos para puertas y ventanas, base, pisos, cielo raso, cornisas, rodapiés, paneles, enchapes, contrachapados, escaleras y paredes), construcción general, construcción de embarcaciones, ebanistería (piezas de madera tallada y torneada), esculturas, piezas para instrumentos musicales, cigarreras, joyeros, piezas para raquetas de tenis y cajas para embalaje (Patiño 1997).

2.2. Distribución geográfica y hábitat

C. odorata se distribuye desde los 26º N hasta los 28º S, es decir, desde el norte de México, y las islas del Caribe, hasta Argentina y la desembocadura del río Amazonas en Brasil; no se reporta en Chile ni en Paraguay (Rodríguez 1980, Patiño 1997).

En Centro y Sur América, en áreas con menos de 2000 mm de precipitación anual y suelos calizos, el cedro puede llegar a ser la especie dominante; sin embargo, en bosques semi-deciduos los árboles de cedro se encuentran aislados. No tolera tierras pantanosas, crece bien en suelos fértiles y bien drenados, en bosques secos o húmedos, y desde el nivel del mar hasta los 1200 m de elevación (Holdridge 1973, Combe y Nico 1979).

2.3. Clasificación botánica

La clasificación botánica del género se estableció en 1756 por Browne, para un árbol de *C. odorata* hallado en Jamaica y publicado por Linnaeus en 1759. Sin embargo, esta clasificación no ayuda a identificar las procedencias de América Central, del Sur de México ni de las Antillas (Rosero 1976).

El género *Cedrela* pertenece a la familia Meliaceae del orden Meliales, que está entre las Rutales y Sapindales. *Cedrela odorata* se caracteriza por árboles de hasta 40 m de altura y 1 m de diámetro; ramas a partir de 8 a 15 m del fuste principal, forman una copa redondeada achatada o ligeramente oblonga y foliada en temporada de lluvias, hasta la seminación. Presenta hojas compuestas paripinnadas, con 5 a 12 pares de folíolos, opuestos o aparentemente alternos, ligeramente peciolados, oblongos o elípticos y de base inclinada u oblicua, glabras y coriáceas cuando maduran. Las inflorescencias son racimos que producen numerosas flores pequeñas, simétricas y blanco-verdosas. El fruto es una cápsula leñosa, dehiscente, que nace en las puntas de las ramas, consta de cinco valvas que abren de arriba hacia abajo y tira las semillas cuando todavía está unido al árbol. Produce semillas aladas en abundancia, característica de muchos árboles invasores (Acosta 1970, Holdridge 1973, Jiménez 1999, Lowe 1999).

2.4. Barrenador de las meliáceas

La madera de cedro posee excelentes propiedades estructurales y resistencia a insectos y a la putrefacción, lo que le da gran valor y aceptación en el comercio y ha llevado a estudiarla y conocer sus características silviculturales y tecnológicas; no obstante, no se han podido establecer plantaciones comerciales, debido a los daños causados por el barrenador, *Hypsipyla grandella*, que ataca los brotes jóvenes, especialmente. El ataque es de tal magnitud, que por sí mismo ha merecido atención en innumerables trabajos de investigación, donde se ha visto la necesidad de encontrar métodos de combate adecuado, sin resultados positivos hasta ahora (Grijpma 1976, Newton *et al.* 1998). Además, existe poca información relativa al uso de meliáceas resistentes a *H. grandella*, como una posible solución al problema (López *et al.* 1997).

Como ejemplos, Dourojeanni (1963) observó un 60% de árboles de cedro atacados en los primeros cuatro meses de establecimiento en Perú, Martorell (1943) reportó 1000000 de árboles destruidos en Puerto Rico y Newton *et al.* (1999) reportan ataque de *H. grandella* de más del 94% de los árboles en los primeros 36 meses en Costa Rica, lo cual es similar al 98% de ataque reportado por Yamasaki *et al.* (1990) en los primeros 16 meses en Perú.

2.5. Variación genética

Dada la amplia distribución natural de la especie, es posible encontrar gran variabilidad genética dentro de ella, pues se encuentra en una extensa gama de condiciones edáficas y climáticas, lo cual es un

indicador de diversidad, debido a que especies con una área de presencia mayor tienden a ser genéticamente más variables que las de menor ocurrencia (Navarro y Vásquez 1986).

Como está actualmente distribuida, es una especie que muestra gran variación poblacional. Recientes ensayos de procedencias han demostrado la existencia de muchas razas ecológicas (Chaplin 1980). Smith (1960), sugirió que las especies de cedro ampliamente distribuidas, como C. *odorata*, C. *fissilis* y C. *angustifolia* (Meliaceae) hibridan libremente y esos híbridos pueden explicar la gran variabilidad fenotípica en esos taxa.

2.6. Fenología y crecimiento

Newton *et al.* (1998) encontraron que, en Turrialba, C. R., la tasa de crecimiento promedio de C. *odorata* fue de 2 cm por semana, con una variación temporal pronunciada en la fenología foliar. Señalan también que más del 90% de árboles tuvieron hojas entre las semanas 10 y 32, disminuyendo a 51% a la semana 48, pero con una nueva producción que llegó al 95% a la semana 60, para disminuir nuevamente a la semana 84, con un 89%. Respecto al crecimiento, estos mismos autores mencionan que el incremento en altura fue relativamente leve entre las semanas 26 y 52, coincidiendo con el período de precipitación más baja; sin embargo, la tasa de crecimiento aumentó hasta 1,8 cm por semana entre las semanas 56 y 58, y a la semana 141 el promedio de altura de árboles fue de 287 cm, con una tasa de 2 cm por semana. En cuanto al diámetro, Whitmore (1971) estima que el crecimiento promedio para C. *odorata* es 1,1 cm por año (crecimiento rápido), siendo el óptimo de 1,5 cm.

La floración se inicia cuando las hojas nuevas están creciendo. Los árboles son monoicos, las flores masculinas y femeninas nacen en la misma inflorescencia, pero la especie es proterogina (las flores femeninas abren primero). El fruto es una cápsula cuyo desarrollo toma de 9 a 10 meses, y madura durante la siguiente estación seca. Los árboles empiezan a fructificar a los 10-12 años de edad (Lowe 1999). En general, la regeneración natural del cedro se presenta espontáneamente en áreas abandonadas por la agricultura o se asocia a los cultivos agrícolas y pastos (Guevara 1988).

2.7. Uso de la biotecnología en la propagación de especies forestales

Los árboles, a diferencia de los cultivos agrícolas, han sido difíciles de mejorar genéticamente debido a sus largos ciclos de vida y a la prevalencia de alogamia (Leakey y Mesén 1994), así como a los largos intervalos de generación y su gran tamaño (Coleman y Ernst 1989).

La biotecnología tiene varias ventajas sobre el mejoramiento genético clásico en el mejoramiento de árboles forestales (Ostry y Michler 1993). Esta tecnología puede reducir el tiempo necesario para introducir nuevas líneas dentro de especies deseables y puede disminuir los largos períodos de generación típicos de árboles forestales, para producir genotipos mejorados. Además, las técnicas *in vitro* ofrecen la posibilidad de propagación clonal rápida de plantas élite que implique la producción de progenies genéticamente estables e idénticas al progenitor (Mascareñas *et al.* 1993, Selvakumar *et al.* 2001). Asimismo, ganancias genéticas pueden ser obtenidas mediante micropropagación, usando semilla mejorada y plántulas germinadas asépticamente como fuente de explantes (Hutzell y Durzan 1993).

La biotecnología constituye un conjunto de técnicas (cultivo de tejidos, genética molecular e ingeniería genética) que pueden complementar y apoyar los programas de mejoramiento genético, por ejemplo con la multiplicación clonal masiva de árboles élite. La biotecnología forestal ha dado énfasis al cultivo de tejidos con la regeneración de plantas a partir de callos, órganos, embriones, cultivo de células y protoplastos (Cheliak y Rogers 1990). También, se ha incrementado el uso de técnicas moleculares para estudiar la diversidad genética, la sistemática y la genética de poblaciones y especies a nivel de ADN (ácido desoxirribonucléico) y de las proteínas (Patiño 1997).

Los principales avances en la propagación masiva de plantas leñosas se han obtenido en el últimos decenio y el número de especies leñosas que han sido propagadas clonalmente por medio del cultivo de tejidos está aumentando a una tasa rápida (Lineberger 2000b). Más de 1000 especies vegetales han sido micropropagadas, incluyendo más de 100 especies forestales (Haynes 1994) pero, en general, los taxa leñosos son difíciles de regenerar bajo condiciones *in vitro* (Mittal 1989, Rout y Das 1993). El desarrollo de la biotecnología en el sector forestal para las especies tropicales ha sido mínimo (Badilla *et al.* 1992), si se compara las investigaciones realizadas en micropropagación de árboles en especies de clima templado (Berrios *et al.* 1991). No obstante, el impacto económico potencial de una aplicación mucho más amplia de propagación clonal a especies leñosas es particularmente grande en países tropicales y subtropicales (Roy

et al. 1996), si se considera que en estas regiones existe mayor urgencia por buscar nuevas alternativas que permitan multiplicar y mantener el acervo genético de especies amenazadas (Valverde *et al.* 1998).

La micropropagación de especies arbóreas ofrece una vía rápida de producir a nivel industrial o semiindustrial plantas clonales para reforestación, producción de biomasa leñosa y conservación de germoplasma élite y raro (Rout y Das 1993). Asimismo, es una alternativa para la preservación de especies, pues se consigue aumentar las tasas de multiplicación de plántulas para suplir la demanda comercial (Pinto *et al.* 1995). Por ejemplo, Quraishi y Mishra (1997) señalan que en seis meses pueden obtenerse alrededor de 1000 plantas a partir de un solo explante nodal de un árbol adulto de *Cleistanthus collinus* (Euphorbiaceae) mientras que Eeswara *et al.* (1997) citan que a partir de un explante foliar de 1 cm^2 de nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae) se pueden obtener aproximadamente 80 brotes en 32 semanas, con un porcentaje de enraizamiento superior al 55%, D´Souza y Sharon (2001) mencionan que aproximadamente 3350 plantas enraizadas pueden generarse en 10 meses después de ocho subcultivos, en microestacas de *Bixa orellana* (Bixaceae) y Dewan *et al.* (1992) observaron que más de 700 brotes pueden obtenerse a partir de un solo explante de nudo cotiledonar de *Acacia nilotica* (Leguminosae) mediante subcultivo repetido.

Un método de cultivo de tejidos exitoso significaría una opción alternativa de propagación y ayudaría en los esquemas de mejoramiento genético para seleccionar clones resistentes a enfermedades o insectos (Mittal *et al.* 1989), así como en los programas de conservación de especies. *C. odorata* esta incluida, como especie amenazada, en la lista de la Convención para el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna en Peligro de Extinción (CITES), razón por la cual los estudios para su propagación y uso sostenible, cobran importancia (López *et al.* 1997, Patiño 1997).

Con base en los programas exitosos de cultivo *in vitro* para algunas especies, se pueden lograr muchos avances para facilitar la propagación masiva de otras. Existen evidencias que sugieren que las especies de una misma familia se comportan igual en cultivo de tejidos, como por ejemplo el requerimiento común de la misma citocinina para la formación de brotes adventicios en un gran número de especies de *Rhododendron* (Lineberger 2000b).

2.8. Micropropagación de especies forestales tropicales

2.8.1. Explantes y establecimiento de cultivos *in vitro*

El establecimiento *in vitro* de especies arbóreas es difícil de lograr (Berrios *et al.* 1991). Los estudios de micropropagación *in vitro* de especies leñosas de zonas templadas, han demostrado que la capacidad de organogénesis de explantes de estas especies, sigue un patrón estacional y, por tanto, existe un período óptimo del año para tomar explantes y asegurar una respuesta exitosa durante el cultivo *in vitro* (Lardet *et al.* 1998).

El rejuvenecimiento de material vegetal es necesario para clonar árboles maduros (Quraishi *et al.* 1997). En varias coníferas, los embriones, segmentos de hipocótilo y cotiledones son las principales fuentes de explantes, ya que son fáciles de manejar y los tejidos responden mejor a los reguladores del crecimiento en comparación a los explantes de árboles adultos (Hutzell y Durzan 1993). La multiplicación vegetativa *in vitro* permite recuperar caracteres morfológicos y fisiológicos juveniles mediante la ruptura de las relaciones existentes entre el explante y el conjunto de la planta (Dublin 1991).

En cultivo *in vitro* de plántulas de *Alnus acuminata* (Betulaceae) (Badilla *et al.* 1992), se observó que, en microestacas, a menor concentración de benzilaminopurina (BAP), fue mayor la formación de brotes y callos. Esto se debe posiblemente a que conforme aumenta la edad del tejido aumentan los reguladores del crecimiento en éste, por lo que se necesitan dosis más bajas de BAP o cualquier otro tipo de reguladores para responder.

Además de la edad, el sitio de la planta de donde se tome el explante es importante. Diferencias significativas entre explantes de brotes basales y de ramillas terminales de *Cleistanthus collinus* en los estados de establecimiento y enraizamiento, pueden atribuirse a diferencias en su madurez. Esto se debe a que, en un árbol son más juveniles los brotes basales que los brotes apicales (Quraishi y Mishra 1997) y probablemente también, debido a la mayor disponibilidad de hormonas y otros factores químicos producidos por las raíces (Bonga 1987). Asimismo, en el cultivo *in vitro* de explantes nodales de *Theobroma cacao* (Sterculiaceae) y *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae), se reveló un gradiente en el potencial de crecimiento de yemas, el cual incrementó del ápice a la base de la rama (Lardet *et al.* 1998).

En la micropropagación de *Croton sublyratus* (Euphorbiaceae), un árbol tropical, todos los intentos por iniciar un cultivo de brotes a partir de árboles adultos cultivados en el campo fracasaron debido a serios problemas de contaminación y/u oxidación de brotes. Este problema se solucionó tomando explantes nodales de árboles injertados cultivados en el invernadero (Shibata *et al.* 1996).

En cultivo *in vitro*, la respuesta de explantes de árboles maduros comparativamente es baja en relación con la de tejidos de plántulas (Augustine y D´Souza 1997). La obtención de explantes a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente, resuelve éste y algunos otros problemas, como por ejemplo la difícil desinfección del material vegetal. Bonga (1982) indicó que cuanto más joven sea la planta, más sencilla será su micropropagación, pues se ha observado que los explantes originados de tejidos jóvenes y con mayor actividad metabólica son más adecuados para estimular la formación de callos, confiriendo a éstos mayor potencialidad morfogenética y con esto mayor facilidad para emitir brotes nuevos, y principalmente raíces (Pinto *et al.* 1994).

Los explantes de nudo cotiledonar se han usado frecuentemente en micropropagación de muchas especies de árboles, como *Acacia nilotica* (Dewan *et al.* 1992), Erythrina spp. (Leguminosae) (Berrios *et al.* 1991) y *Swietenia macrophylla* (Orellana 1997). Por otro lado, se ha encontrado que, los brotes de nudos cotiledonares de muchas especies son fáciles de enraizar *in vitro*, pero en el caso de *Zanthoxylum rhetsa* (Rutaceae) el enraizamiento sólo pudo ser inducido bajo condiciones *ex vitro* (Augustine y D´Souza 1997).

2.8.2. Germinación *in vitro* de semillas de especies forestales para la obtención de explantes

La semilla y sus tejidos juegan un papel muy importante para el desarrollo del cigoto en embrión. Los tejidos regulan el intercambio gaseoso, limitando el oxígeno disponible para el cigoto. A nivel de nutrición, los tejidos de la semilla como el núcleo y el endospermo, proveen al cigoto los elementos necesarios para su desarrollo: carbohidratos, lípidos y proteínas (Espinosa y Engleman 1995). Los tegumentos juegan también un papel importante en la filtración de la luz (Escalant 1995). Una vez que la semilla germina, los sistemas radical y aéreo comienzan a utilizar los nutrimentos minerales, grasas, almidón y proteínas presentes en las células de almacenamiento de la semilla, y la plántula juvenil depende de estas reservas alimenticias (Taiz y Zeiger 1998). Las semillas de cedro son ricas en proteína, sin embargo prácticamente no poseen almidón (Vásquez 2000, com. pers.).

Por otro lado, las semillas son en general más fáciles de desinfectar, y aunque la información en las respuestas de explantes nodales puede no ser directamente aplicable a los explantes de material adulto, es una indicación favorable de los requerimientos aproximados para el cultivo de nudos y yemas de material adulto (De Fossard 2000).

Para la germinación *in vitro* de semillas forestales es indispensable la desinfección y para ello se emplean diferentes sustancias, como hipoclorito de sodio o de calcio, etanol al 70%, peróxido de hidrógeno o bicloruro de mercurio a diferentes concentraciones, combinaciones y tiempos de inmersión (Mohammed y Patel 1989, Valverde *et al.* 1998). Además, en algunas especies es necesario aplicar algún tratamiento pregerminativo antes de proceder a su siembra *in vitro* (Phillips *et al.* 1998).

Para emplear esta técnica, Valverde *et al.* (1998) lavaron semillas de *C. odorata* con agua y jabón y las mantuvieron bajo agua corriente por 30 min. Realizaron una esterilización superficial con alcohol al 70% por tres seg y con hipoclorito de sodio comercial al 5,5% durante 20 min, seguida de varios enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas a la oscuridad bajo condiciones asépticas en un medio a base de agar y agua, y la germinación ocurrió a los 10-15 días.

Semillas de *Acacia nilotica*, *A. senegal* y *A. tortilis* (Leguminosae) se germinaron en el medio modificado de Knop con 3% de sacarosa y 0,8% de agar. Se aplicaron tratamientos de escarificación e inmersión en agua destilada por tiempos variables después de una esterilización superficial con agua clorada (3,5 ± 0,5 mgl^{-1}) por 45 min para *A. nilotica* y *A. senegal*, y por 25 minutos para *A. tortilis*. Seguidamente las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se inocularon bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2ºC y 55 ± 5 % de humedad relativa, bajo luz blanca fluorescente de 450-460 μWcm^{-2} de intensidad y fotoperíodo de 16 L:8 O. La germinación se reportó a los tres días y el crecimiento de plántula a los 15 días. La germinación se consideró cuando la radícula alcanzó 5 mm o más y la raíz 3 mm o más. La primera señal de desdoblamiento de los cotiledones se consideró como emergencia de plántula. Con esta metodología se obtuvieron porcentajes de germinación de 96 a 100% e incrementos del crecimiento de plántulas de 83 y 92% con respecto a los testigos (Philips *et al.* 1998).

Los medios utilizados para la siembra *in vitro* generalmente se basan en agar, sacarosa y agua destilada, aunque pueden utilizarse medios básicos, como el MS al 50% sin reguladores del crecimiento (Hammatt y Ridout 1992).

Una vez obtenidos los cultivos asépticos, sea a partir de semilla o de partes vegetativas de plantas ya establecidas, el método de cultivo horizontal es el más adecuado para estimular el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares y adventicias, y obtener un número adecuado de explantes para comenzar la fase de multiplicación para obtener un número grande de plantas (Berrios *et al.* 1991, Perez-Parron *et al.* 1994).

2.8.3. Multiplicación

La presencia de cotiledones en el explante de nudo cotiledonar es determinante para la obtención de brotes con mejores características morfológicas y fisiológicas para iniciar el establecimiento *in vitro* de la caoba (Orellana *et al.* 2000). Estos autores recomiendan estudiar la composición de los cotiledones de la semilla de caoba, con el fin de tener elementos para formular un medio de cultivo adecuado para subcultivar explantes de yemas cotiledonares, y poder así aumentar el potencial de estas yemas como fuente de explantes secundarios. Además, sugieren la micropropagación a partir de explantes nodales para la clonación de material procedente de semilla genéticamente mejorada o de árboles élite de huertos semilleros o de cruces de alto valor combinatorio específico, con el fin de acelerar la multiplicación, realizar la producción en masa o realizar investigaciones de conservación *in vitro*.

En la micropropagación de *Azadirachta excelsa* (Meliaceae) usando como explantes segmentos nodales, segmentos de pecíolo, ápice de raiz y hojas jóvenes de plántulas de siete meses de edad, Jainol (1997) citado por Awang y Shukor (1998), encontró que el mejor explante fue el ápice de raíz por producir el porcentaje más alto de formación de brotes adventicios. También encontró que el mejor medio en términos de formación de brotes (porcentaje de explantes con brote, elongación de brotes, número y longitud de brotes axilares y número de explantes obtenido por cultivo), fue el Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0,5 mgl^{-1} de 6-bencilaminopurina (BAP).

Un factor clave en la multiplicación de los sistemas de brotes son las citocininas. Una de las principales funciones de las citocininas en cultivo de tejidos es la inducción de brotes adventicios (Minocha 1987). También se utilizan para liberar yemas axilares de la supresión por dominancia apical, para así iniciar la proliferación de brotes (Green y Muir 1979). Además, mientras el ácido abscísico (ABA) cierra estomas, las citocininas frecuentemente tienen el efecto contrario (los abren y propician evapotranspiración) (Incoll y Jewer 1987).

En la propagación *in vitro* de *Acacia senegal* (Badji *et al.* 1993), *Melia azedarach* (Meliaceae) (Thakur *et al.* 1998), *Morus laevigata* (Moraceae) (Islam *et al.* 1993) y *Ulmus pumila* (Ulmaceae) (Corchete *et al.* 1993), se demostró que las citocininas fueron indispensables para la brotación de yemas axilares, la multiplicación de nudos y/o para el crecimiento de brotes.

Las citocininas comúnmente aplicadas son benziladenina (BA), kinetina, dimetilaminopurina (2-iP) y zeatina, de las cuales BA es la más activa, la más económica y la única que puede ser autoclavada, por lo que es la más frecuentemente usada, en la mayoría de las especies leñosas, particularmente en micropropagación comercial donde el costo y facilidad de manejo son las principales consideraciones (Bonga y Von Aderkas 1992).

En la regeneración *in vitro* de plantas de *Holarrhena antidysenterica* (Apocynaceae) de cuatro citocininas probadas (BA, kinetina, sulfato de adenina y 2-iP), BA fue la más efectiva y 15 µM fue el óptimo para inducir la máxima multiplicación de brotes. Hubo correlación entre el incremento en BA hasta el nivel óptimo (15 µM). En contraste, concentraciones más altas (20 µM y superiores), suprimieron la formación de brotes durante el mismo periodo, de cuatro semanas (Raha y Roy 2001). Resultados similares fueron obtenidos en *Croton sublyratus* (Shibata *et al.* 1996), *Sorbus domestica* (Rosaceae) (Arrillaga *et al.* 1991), *Acacia nilotica* (Dewan *et al.* 1992) y en *Ulmus pumila* (Corchete *et al.* 1993).

Explantes nodales de árboles adultos de *Acacia catechu*, (Leguminosae) desarrollaron brotes robustos y sanos en medio MS conteniendo BAP y kinetina a 1 mgl^{-1} (Kaur *et al.* 1997), mientras que en *Morus leavigata* el número de brotes por explante aumentó con el incremento de citocininas hasta 10 µM y disminuyó con 15 µM. El número máximo de brotes se obtuvo con 10 µM de BA, seguido por 10 µM de kinetina y la longitud máxima de brote se encontró en 5 µM de BA (Islam *et al.* 1993).

BA no fue la mejor citocinina en cultivos de explantes nodales obtenidos de *Oxidendrum arboreum* (Ericaceae). La tasa de formación de brotes y subsecuente elongación en estos cultivos, fue más alta con zeatina que con BA, 2-iP o tidiazuron en el medio (Banko y Stefani 1989). Coleman y Ernst (1989) también observaron la misma respuesta en regeneración de brotes *in vitro* de *Populus deltoides* (Salicaceae), mientras que D'Souza y Sharon (2001) encontraron que el 2-iP, en comparación con kinetina y BA, fue mejor para la multiplicación *in vitro* de *Bixa orellana*.

Selvakumar *et al.* (2001), en sus experimentos con micropropagación de *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae), notaron que las altas concentraciones de citocininas tuvieron efectos inhibitorios en elongación de brotes. Bonga y Von Aderkas (1992) señalaron que las altas concentraciones de BA tienden a estimular la excesiva producción de brotes adventicios, los cuales compiten con brotes derivados de yemas axilares y pueden introducir variación somaclonal en los cultivos.

En la micropropagación de *Azadirachta indica* el porcentaje de plántulas anormales o plántulas que no crecieron bien, fue muy alto y las plántulas se vitrificaron. Las hojas se engrosaron, alargaron y formaron callos cuando tocaron el medio, presumiblemente debido a las citocininas y otras purinas en los medios de cultivo (Eeswara *et al.* 1997).

2.8.4. Desarrollo

La mayoría de brotes adventicios no crecen adecuadamente en presencia de BA u otra citocinina. Por tanto, una vez que los brotes tienen un tamaño suficiente para separarse y subcultivarse, son transferidos a un medio libre de citocinina. El carbón activado se agrega frecuentemente al medio de subcultivo para remover citocinina que se ha liberado del tejido dentro del medio (Biondi *et al.* 1984).

Para promover el desarrollo de los brotes multiplicados de *Croton sublyratus*, antes del enraizamiento se transfirieron a un medio MS carente de reguladores del crecimiento. Los explantes alcanzaron una altura mayor de 10 mm en 4 a 6 semanas. El medio MS gelificado con 0,2% de gelrite, resultó adecuado para el alargamiento pre-enraizamiento de brotes (Shibata *et al.* 1996).

2.8.5. Enraizamiento

Las raíces son órganos relativamente simples que resultan de procesos bioquímicos y fisiológicos complejos. Su patrón de crecimiento es uniforme y continuo, pero pueden modificar su desarrollo en respuesta a estímulos ambientales (gravedad, luz, tacto y patógenos invasores). Tienen pocos tipos de células diferenciadas y simetría radial (Schiefelbein y Benfey 1991, Aeschbacher *et al.* 1994, Flores 1994).

El enraizamiento *in vitro* es afectado por la genética, madurez, reguladores del crecimiento, calidad del brote de subcultivos previos, actividad de peroxidasa, fotoperíodo, intensidad y calidad de luz, etc. (McCown 1988). Otros factores físicos que afectan este proceso son: estrés hídrico, alta temperatura,

carbón activado, oxigenación y dentro de otros factores químicos están: B, Ca y Mn adicionados al medio, así como algunos fenoles y vitamina D (Gaspar y Coumans 1987). Niveles altos de sacarosa estimulan la formación de lignina y esto promueve el enraizamiento (Driver y Suttle 1987). Las auxinas ácido indolacético (AIB) y ácido naftalenacético (ANA) son más eficaces en promover el enraizamiento que el ácido indolacético (AIA) (Gaspar y Coumans 1987) a causa de la inestabilidad de esta última. El enraizamiento también se promueve algunas veces con un aumento en niveles internos de putrescina y mediante una reducción en el pH del medio de cultivo (Tiburcio *et al.* 1989).

2.8.5.1. Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microestacas

Algunas veces la fase de inducción de raíz se realiza *in vitro*, mientras que la fase de desarrollo de raíz toma lugar en una mezcla no estéril para enraizamiento (Bonga y Von Aderkas 1992). De esta manera, las microestacas se enraizan mediante modificaciones de dos métodos básicos. El enraizamiento *in vitro* se logra transfiriendo las microestacas cuidadosamente disectadas a un medio libre de reguladores del crecimiento o que tenga sólo auxinas. El otro método es el enraizamiento no estéril o *ex vitro* y es el que se prefiere a nivel comercial (Lineberger 2000a); durante este enraizamiento, generalmente se utilizan sustratos como perlita, vermiculita, pomes, arena y suelo (desinfectados), además de ciertos enraizadores y fungicidas (Mascareñas *et al.* 1993). El enraizamiento de brotes se realiza en cámaras de humedecimiento (Villalobos y Torpe 1991, Bonga y Von Aderkas 1992), al igual que el enraizamiento de estacas de especies forestales sugerido por Mesén (1998).

La ventaja principal del enraizamiento *ex vitro* sobre el *in vitro*, es que el daño a las raíces durante la transferencia al suelo es menos probable. Más aún, las tasas de enraizamiento con frecuencia son más altas y la calidad de raíz es mejor cuando el enraizamiento ocurre *ex vitro* (Bonga y Von Aderkas 1992), como se comprobó en el enraizamiento de brotes adventicios de segmentos de hipocótilo de *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) (Kim *et al.* 1996).

Jainol (1997) citado por Awang y Shukor (1998), encontró que para enraizamiento *in vitro* de *Azadirachta excelsa* 2 mgl^{-1} de ANA fue la mejor concentración al producir un 65,4% de sobrevivencia después del trasplante a vivero. Para esta misma especie, Liew *et al.* (1999) encontraron que una combinación de 0,5 mgl^{-1} de ANA y 1 mgl^{-1} de AIB indujeron la formación de raíces en la mayoría de brotes, y que a estas mismas concentraciones más 2,5 gl^{-1} de carbón activado en medio MS al 50%, las raíces fueron más numerosas y de mayor longitud. La función del carbón activado es absorber cualquier sustancia

inhibitoria que pudiera impedir el enraizamiento; además, es capaz de crear un efecto de oscurecimiento en el medio de cultivo y por tanto favorecer el enraizamiento, si se considera que las auxinas son fotosensibles (Normanly 1997). Así, se descubrió que brotes de *Eucalyptus*, *Hevea* y *Sapium*, entre otras especies leñosas, enraizan más fácilmente cuando se añade carbón activado junto con auxinas al medio de cultivo (George y Sherrington 1984, citados por Liew *et al.* 1999).

2.8.5.2. Efecto de auxinas en el enraizamiento de microestacas

En muchas especies leñosas, un problema serio que limita la micropropagación exitosa, con propósitos comerciales, es su renuencia a formar raíces adventicias ya sea *in vitro* o *in vivo* (Standardi y Romani 1990, Arrillaga *et al.* 1991). Afortunadamente, existe gran cantidad de sustancias naturales y sintéticas que han mostrado su capacidad como promotores de enraizamiento (Blazich 1988) y las más importantes son las auxinas. Las condiciones de cultivo *in vitro* facilitan su administración y la de otros compuestos que favorecen la formación de raíces (De Klerk *et al.* 1999). La función de las auxinas en la promoción del enraizamiento es compleja, pero está relacionada con su acción sobre la división y el crecimiento celular y en la síntesis de pared celular, la atracción de nutrimentos y otras sustancias al sitio de aplicación, así como sus efectos en las relaciones hídricas y fotosintéticas de las estacas, y otros procesos interrelacionados (Leakey y Mesén 1994).

La diferente eficiencia entre las diversas auxinas, puede atribuirse a la naturaleza del compuesto o a la concentración de la auxina libre que es liberada en las células. Esto último depende a su vez de la absorción, el transporte y la conversión del compuesto agregado y de la cantidad de la auxina sintetizada por la propia planta (De Klerk *et al.* 1999).

La auxina puede aplicarse por varios días o semanas a bajas concentraciones (micromoles) o por varios segundos o minutos a alta concentración (milimoles) (Hartmann *et al.* 1990). Las estacas producidas en cultivo de tejidos pueden tratarse brevemente con alta concentración de auxina y luego plantarse *ex vitro*, como lo hacen algunas grandes empresas comerciales (Blazich 1988). Cuando las estacas están todavía pequeñas es preferible enraizarlas *in vitro* a bajas concentraciones de auxina y transferirlas a algún sustrato después de que las raíces se han formado; durante el enraizamiento *in vitro*, las microestacas aumentan en tamaño y llegan a ser más robustas (De Klerk *et al.* 1999).

Exponiendo las microestacas de *Acacia senegal* a un corto tratamiento inductivo con una alta concentración de ANA (5 x 10^{-5} M), se obtuvo 100% de enraizamiento. Durante la fase de elongación de raíces se observó que los brotes de los explantes bien enraizados mostraron mejor desarrollo que los obtenidos de los explantes enraizados débilmente o de los que no enraizaron del todo (Badji *et al.* 1993).

2.8.5.3. Efecto de la oscuridad en el enraizamiento de microestacas

En particular, es bien conocido que la oscuridad durante las primeras semanas de la fase de enraizamiento es frecuentemente esencial para estimular el enraizamiento en varias especies leñosas (Rugini *et al.* 1993), aunque con el pre-tratamiento de oscuridad, la sobrevivencia de las plántulas generalmente disminuye cuando son transferidas al suelo (Von Arnold y Eerikson 1984).

El hecho de que cierto número de especies pueda enraizar exitosamente en la obscuridad o como estacas leñosas defoliadas (Davis y Potter 1981), indica que la fotosíntesis después del corte de las estacas, no es un requerimiento absoluto para el enraizamiento en todas las especies (Mesén *et al.* 1997).

2.8.5.4. Efecto del medio de cultivo en el enraizamiento de microestacas

El medio de enraizamiento Woody Plant Médium (WPM) reducido a un 20% más 0,1 $mg.l^{-1}$ de AIB generalmente da 95-100% de enraizamiento (Welander 1993), pero en general el medio MS al 50, 66,66 o 75% es el más utilizado para enraizamiento *in vitro* (Villalobos y Torpe 1991, Corchete *et al.* 1993, Pinto *et al.* 1995).

Aunque se requiere sacarosa para la formación de raíces adventicias, el aumento de la concentración de 15 a 30 gl^{-1} en el medio de enraizamiento de brotes de *Azadirachta excelsa* tuvo un efecto inhibitorio, por lo que los brotes de esta especie requieren solamente una baja concentración de sacarosa para producir raíces (Liew *et al.* 1999). No obstante, los medios bajos en sacarosa pueden causar vitrificación, debido a un potencial osmótico disminuido en el medio (Chesick *et al.* 1991).

Los brotes micropropagados de *Acacia catechu* fueron enraizados en medio MS al 25% suplementado con AIA a 3 mgl^{-1} y 1,5% de sacarosa para obtener plántulas completas aunque hubo formación de callo intermitente en la unión de la raíz y el brote. Para reducir la cantidad de callo, la concentración de sacarosa se redujo de 3 a 1,5% (Kaur *et al.* 1997). Esta concentración reducida de

sacarosa también fue óptima para otros árboles como *Feronia limonia* (Purohit y Tak 1992) y *Acacia auriculiformis* (Leguminosae) (Das *et al.* 1993).

En caoba el enraizamiento *in vitro* fue favorecido mediante la aplicación de un choque auxínico inicial (inducción), constituido de altas concentraciones de auxinas y bajas concentraciones de citocinina por corto tiempo en la oscuridad, seguido de una reducción de éstos durante la fase de expresión y crecimiento de raíces. Los altos porcentajes de enraizamiento (70%), así como también el número (2,1) y longitud de raíces obtenidas, demostraron la eficiencia del procedimiento al permitir la formación de una vitroplanta de caoba con características adecuadas para su aclimatación (Orellana *et al.* 1997).

La eficiencia del sistema radicular no puede ser confirmada hasta después que las plántulas han estado creciendo por algún tiempo en suelo y se ha obtenido información de la tasa y el hábito de crecimiento (Abdullah *et al.* 1989).

2.8.6. Aclimatación

El éxito de los métodos *in vitro* en la propagación vegetal depende no solo del número de plántulas producidas, sino también de su tasa de sobrevivencia al transferirse a condiciones de invernadero y campo (Liew *et al.* 1999, Lineberger 2000a).

Las microestacas están poco adaptadas para crecer en condiciones de invernadero cuando se remueven de las condiciones de enraizamiento *in vitro*, ya que tienen órganos frágiles con reducido tejido de soporte mecánico y paredes celulares delgadas (Donnelly y Tisdall 1993) y carecen de características anatómicas necesarias para resistir variaciones en el ambiente natural. Las hojas difícilmente controlan la transpiración, especialmente a humedad relativa menor de 90% (Thakur *et al.* 1998) porque carecen de cera epicuticular suficiente y funcional y tienen estomas anormales, lo cual propicia deshidratación excesiva y bajo control de intercambio gaseoso (Lineberger 2000a); además, sus raíces no poseen pelos absorbentes (Ahuja 1993). La sacarosa en el medio de multiplicación de brotes es parcialmente responsable de esto porque suprime la formación de ribulosa bifosfato carboxilasa, una enzima clave en fotosíntesis (Bonga y Von Aderkas 1992).

Después de reducir la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, el mecanismo fotosintético de las plantas de cultivo *in vitro* se recobra ligeramente y con la exposición de éstas a altas intensidades de

luz manteniendo una alta humedad relativa, se estimula un desarrollo más rápido de hojas funcionales (Bonga y Von Aderkas 1992).

En efecto, la plántula proveniente de laboratorio es muy frágil puesto que viene de un medio nutritivo y aséptico y por tanto debe ser objeto de cuidados intensivos durante la aclimatación (Etienne *et al.* 1997). En especies anuales, leñosas y suculentas, las plantas obtenidas *in vitro* se deben lavar cuidadosamente para eliminar todos los residuos de agar, que pueden ser una fuente de contaminación (Villalobos y Torpe 1991, Goh y Galiana 1998).

En la primera semana es decisivo un ambiente constantemente húmedo para prevenir el estrés por deshidratación en las microestacas (Goh y Galiana 1998); también, durante los primeros 15 días, las plántulas viven de sus reservas por lo que se puede presentar un ligero amarillamiento, siendo recomendable aplicar una solución nutritiva, como por ejemplo medio líquido MS al 50% o cualquier fertilizante foliar diluido (Villalobos y Torpe 1991, Etienne *et al.* 1997). Sin embargo, en plántulas de *Melia azedarach* esta fertilización no fue esencial (Thakur *et al.* 1998)

Las plántulas enraizadas obtenidas a partir de brotes de mate (*Ilex paraguarensis*, Aquifoliaceae), tuvieron una tasa de sobrevivencia de 70% cuando se transfirieron a invernadero en macetas con sustrato a base de perlita, musgo y arena (1:1:1 vol/vol) (Sansberro *et al.* 1999) y en micropropagación clonal *in vitro* de *Bixa orellana*, los ensayos de endurecimiento indicaron que la turba de coco fue el mejor sustrato al permitir un 80% de sobrevivencia (D´Souza y Sharon 2001).

Se debe evitar la desecación y por ello se recomienda mantener en cámara húmeda. El ciclo de humedad puede ser de 4-6 seg con intervalo de 4-6 min. El área debe estar sombreada de tal manera que excluya un 60% de luz, y mantener las microestacas bajo estas condiciones de humedad y sombra por 5 a 7 días, aunque algunas especies pueden requerir 2 o 3 días extra si se observa algún indicio de marchitamiento. Luego se pasa a una sombra que excluya el 50% de luz o más, y se mantiene ahí por 7 días, al final de los cuales las microestacas generalmente empiezan a brotar (Lineberger 2000a).

Cualquier modificación que se haga del protocolo anterior debe considerar que el paso de alta a baja humedad relativa y de baja a alta iluminación debe ser gradual (Kirdmanee *et al.* 1996), como se realizó en *Eucalyptus tereticornis* (Mirtaceae) (Subbaiah y Minocha 1990), en *Eucalyptus spp.* (Le Roux y Van Staden 1991) y en *Sesbania grandiflora* (Leguminosae) (Detrez *et al.* 1994).

Experiencias con plántulas de *Azadirachta excelsa* enraizadas *in vitro*, indican que éstas crecen normalmente cuando se transfieren al campo, si se colocan previamente en una cámara húmeda, equipada con 6 aspersores intermitentes a intervalos de 10 min durante 5-7 días y luego se cambian a un sombreadero al 50% por otros 7 días. Este protocolo permite que un 80% de las plántulas enraizadas *in vitro* sobrevivan en el ambiente de campo (Liew *et al.* 1999).

En el caso de caoba, la eliminación de la tapa de los tubos y la adición de 2 ml de agua destilada a cada tubo, tres días antes del traslado de vitroplantas al invernadero, en vasos de polietileno que contenían arena estéril, así como las condiciones proporcionadas por una cámara plástica conteniendo un sistema de riego con agua en gotas finas (humedad relativa cercana al 100% por un periodo de 10 días), favorecen su adaptación a condiciones normales de invernadero. En estas condiciones, vitroplantas de 2,3 cm de altura promedio, con 3-5 nudos, 4-6 hojas y 2,5 raíces promedio por planta permitieron obtener un 27% de sobrevivencia a la aclimatación (Orellana 1997).

El éxito de los sistemas de micropropagación puede medirse efectivamente por el porcentaje de plántulas que son transferidas exitosamente de los vasos de cultivo de tejidos al invernadero o a condiciones de campo (Kirdmanee *et al.* 1996). La adaptación exitosa a las condiciones *ex vitro* se indica por la aparición de raíces nuevas (Goh y Galiana 1998).

Una vez aclimatadas, las plantas cambian su estructura morfológica, las raíces no funcionales se sustituyen por otras con pelos absorbentes y las hojas nuevas también sufren una etapa de transición en respuesta a las condiciones ambientales (Aeschbacher *et al.* 1994).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la investigación. La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y en el invernadero de Biotecnología, del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica, de Enero a Noviembre de 2001.

3.2. Fuente de explantes. Para obtener plántulas como fuente primaria de explantes (microestacas) se utilizó semilla de *Cedrela odorata* L. correspondiente a los mejores genotipos del ensayo de procedencias del proyecto sobre "Mejoramiento genético de meliáceas" (identificadas con los números 353 y 354 de Tikal, Guatemala, 469 de Meambar, Honduras, y Mex 1–29, Mex 1–46 y Mex 1–74 de Quintana Roo, México), así como semilla procedente de Pococí, Costa Rica, certificada por el Banco Latinoamericano de Semilla forestal, ubicado en el CATIE.

3.3. Desinfección de semilla y germinación *in vitro*. Se utilizaron las recomendaciones de Valverde *et al.* (1998) para la desinfección de *C. odorata*, y las de Orellana *et al.* (2000) para la germinación *in vitro*. Las semillas se lavaron con agua y jabón y se mantuvieron bajo agua corriente por 10 a 15 min. Bajo condiciones asépticas, se realizó una esterilización superficial con alcohol al 70% por 60 segundos y con hipoclorito de sodio comercial al 5,5% (75% v/v) durante 25 min en agitación constante. Después del tratamiento con cada una de las sustancias citadas, se realizaron cinco enjuagues en agua bidestilada estéril. Posteriormente, la semilla se sembró en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo 15 ml de medio de cultivo MS (Murashige y skoog 1962) (Anexo 1) suplementado con 3% de sacarosa y gelificado con 0,7% de agar. El pH fue ajustado a 5,7. Las condiciones de cultivo fueron: fotoperiodo de 12 L:12 O y temperatura de 29 ± 2ºC.

3.4. Cultivo de microestacas

3.4.1. Fase de iniciación

Explantes de nudo cotiledonar de 3 cm de longitud fueron tomados de plántulas de 45 a 60 días de edad y colocados verticalmente en el medio de cultivo MS, suplementado con 3% de sacarosa y 2,46 µM de 2-iP (6-γ,γ-dimethylamino purina) para promover la brotación de las yemas cotiledonares según Orellana (1997). El medio se gelificó con agar al 0,7% después de ajustar el pH a 5,7. De este medio se agregaron

25 ml en frascos "Gerber" de 50 x 90 mm cerrados con tapas plásticas "Magenta" y se esterilizó en autoclave a 121 ^{0}C por 20 min.

3.4.2. Fase de multiplicación

Para determinar la capacidad de producción de brotes de esta especie, se utilizaron brotes obtenidos de la fase de iniciación y se evaluó la respuesta individual de BAP, kinetina y 2-iP (2,2, 6,5, 13,3, 20 μM), bajo un diseño completamente al azar con arreglo simple de tratamientos (Anexo 2), nueve repeticiones y un frasco "Gerber" con tres microestacas como unidad experimental.

3.4.3. Fase de desarrollo

En esta fase se utilizaron explantes epicotiledonares de 2-3 cm obtenidos de plántulas de 45-60 días de edad y se evaluaron los medios de cultivo MS y WPM (Anexo 1) (Lloyd y McCown 1980), al 100, 75, 50, y 25%. El primer medio se utilizó porque es el universalmente empleado en el cultivo de tejidos, y el segundo por ser el recomendado para plantas leñosas. Estos medios fueron suplementados con sacarosa (10, 20, 30 y 40 gl^{-1}) para establecer un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial 2 x 4^2, 32 tratamientos (Anexo 7), cuatro repeticiones para MS y tres repeticiones para WPM con un frasco "Gerber" con tres brotes, como unidad experimental.

3.4.4. Fase de enraizamiento

Se evaluó el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, probando para el primer caso las tres etapas características de enraizamiento (inducción, expresión y desarrollo), mientras que para el segundo caso se aplicó un choque auxínico para la inducción y se pasó directamente al invernadero en un sustrato a base de fibra de coco y suelo común en proporción 1:1 y esterilizado en autoclave a 120 ^{0}C durante 30 min. En ambos casos se utilizaron brotes obtenidos de explantes de nudo cotiledonar y que median 1-2 cm.

3.4.4.1. Enraizamiento *in vitro*

Para el enraizamiento *in vitro*, cada explante individual se colocó en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo 15 ml de medio MS al 50% con pH de 5,7 y suplementado con los reguladores y reactivos correspondientes.

a) Inducción. Se evaluó el efecto de auxinas (ANA: 0,5 y 1,0 mgl^{-1} y AIB: 1,0 y 1,5 mgl^{-1}) y de un medio sin reguladores, durante un mes en oscuridad, mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo de tratamientos $T_A + 2^2$ (Anexo 11), 10 repeticiones y cuatro microestacas, como unidad experimental.

b) Expresión. Los brotes de la fase anterior se subcultivaron a un nuevo medio, para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de carbón activado (0, 1,5, 2,0 y 3,0 gl^{-1}), de sacarosa (15, 30 y 45 gl^{-1}) y del gelificante (Agar 7 gl^{-1} y Phytagel 2 gl^{-1}). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3 x 2 (24 tratamientos, Anexo 16), cuatro repeticiones y dos microestacas, como unidad experimental. El tiempo de cultivo fue de 15 días.

c) Desarrollo. Para el desarrollo de raíces se realizó un subcultivo en un medio suplementado con sacarosa (15 gl^{-1}) y que contenía carbón activado (1,5 gl^{-1}) y agar (7 gl^{-1}). El tiempo de cultivo en esta fase fue de 30 días.

3.4.4.2. Enraizamiento *ex vitro*

Los tratamientos evaluados para el choque auxínico fueron las combinaciones de ANA (11,5 y 23,0 mgl^{-1}) y AIB (43,0 y 86,0 mgl^{-1}) durante diferente tiempo de exposición en oscuridad (8, 16 y 24 h). Se utilizó un arreglo factorial 2^2 x 3 (12 tratamientos, Anexo 17), con diseño experimental completamente al azar, cinco repeticiones y tres microestacas como unidad experimental.

3.4.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y pruebas de Duncan y de medias de cuadrados mínimos (LSMEANS) para comparación múltiple de medias (α=0,05), mediante el procedimiento GLM (SAS 1999). Para el análisis, los datos se transformaron mediante las fórmulas $\arcsin\sqrt{(y)}$ o $\sqrt{(y+0,5)}$.

Las variables analizadas en el estudio fueron:

Tiempo de brotación (días): Se consideró como brote emergido aquel brote de la unidad experimental perceptible a simple vista.

Porcentaje de brotación (%): Este valor se obtuvo con base al número de explantes dentro de la unidad experimental que produjeron al menos un brote, al final de cuatro semanas de cultivo, en relación con el total de explantes, multiplicado por 100.

Número promedio de brotes por explante: Se obtuvo sumando el total de brotes en la unidad experimental y dividiéndolo entre el número de explantes en la misma.

Altura de brotes (cm): Se midió la altura desde la inserción del brote en el explante hasta su extremo apical.

Porcentaje de sobrevivencia: Se determinó mediante la relación entre explantes muertos y el número total inicial de cada tratamiento, multiplicado por 100. Se determinó a los 15 días del trasplante en el caso de multiplicación y expresión de raíz y a los 30 en el caso de inducción de raíz.

Porcentaje de enraizamiento: Se relacionó el número de brotes que formaron al menos una raíz, con el número total de brotes de la unidad experimental respectiva.

Número promedio de raíces por explante: Se contó y sumó el número de raíces formadas en cada explante y se dividió entre el número de explantes de la unidad experimental.

Longitud de raíz (cm): Se midió desde la unión de la raíz con la base del brote, hasta su extremo apical.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de explantes a partir de semilla germinada *in vitro*

Aunque no fue un objetivo de la investigación, pero dado que se utilizó semilla de recolecciones recientes, así como semilla con 4-24 meses de recolectada, se pudo observar que no hubo diferencia entre éstas con respecto al porcentaje de germinación, pero sí con relación al porcentaje de contaminación (25% en semilla de recolección reciente y 10% en semilla con cuatro o más meses de almacenada). Además, hubo diferencias en cuanto al vigor de plántula, siendo la semilla "nueva" la que produjo plántulas más vigorosas y en menor tiempo. Lo anterior puede atribuirse a las temperaturas de almacenamiento (7–15 ºC), que pudieran haber inhibido los agentes contaminantes de la semilla, lo cual no elimina la posibilidad de su aparición conforme transcurre el proceso de germinación o el cultivo *in vitro*; pero al mismo tiempo, esta condición de almacenaje también disminuye el vigor de la semilla. De igual manera, en la germinación de la semilla de la procedencia Mex 1-46, se observaron algunas plantas albinas, que redujeron la disponibilidad de material para obtención de explantes (Fig. 1 A).

4.2. Fase de multiplicación

El comportamiento de los explantes a las diferentes citocininas y concentraciones se evaluó en tres ensayos previos (Anexo 2). Estos ensayos permitieron observar diferencias significativas en el porcentaje de brotación, número promedio de brotes por explante y en la altura de los brotes. Para el porcentaje de brotación y la altura de brotes, la BAP tuvo un mayor efecto seguido por el 2-iP y la kinetina, observándose una respuesta similar entre estas dos citocininas, mientras que para el *nb* se observó un efecto de gradiente para BAP, 2-iP y kinetina, respectivamente. Las mejores concentraciones para favorecer las variables citadas fueron 2,2 y 6,5 µM de BAP, mientras que las concentraciones de 20 µM de BAP, 6,5 µM de kinetina y 13,3 o 20 µM de 2-iP tuvieron un efecto mínimo y por el contrario, desarrollaron callo en la base de los explantes, lo cual afectó en general la multiplicación de los explantes, debido a la formación de raíces, indeseables en esta fase (Fig. 1 B-D).

Al igual que en los ensayos previos, en el experimento hubo diferencias significativas entre los tratamientos para todas las variables evaluadas (Cuadro 1), pero no entre las concentraciones de BAP cuando esta auxina se evaluó de manera independiente (Anexo 4).

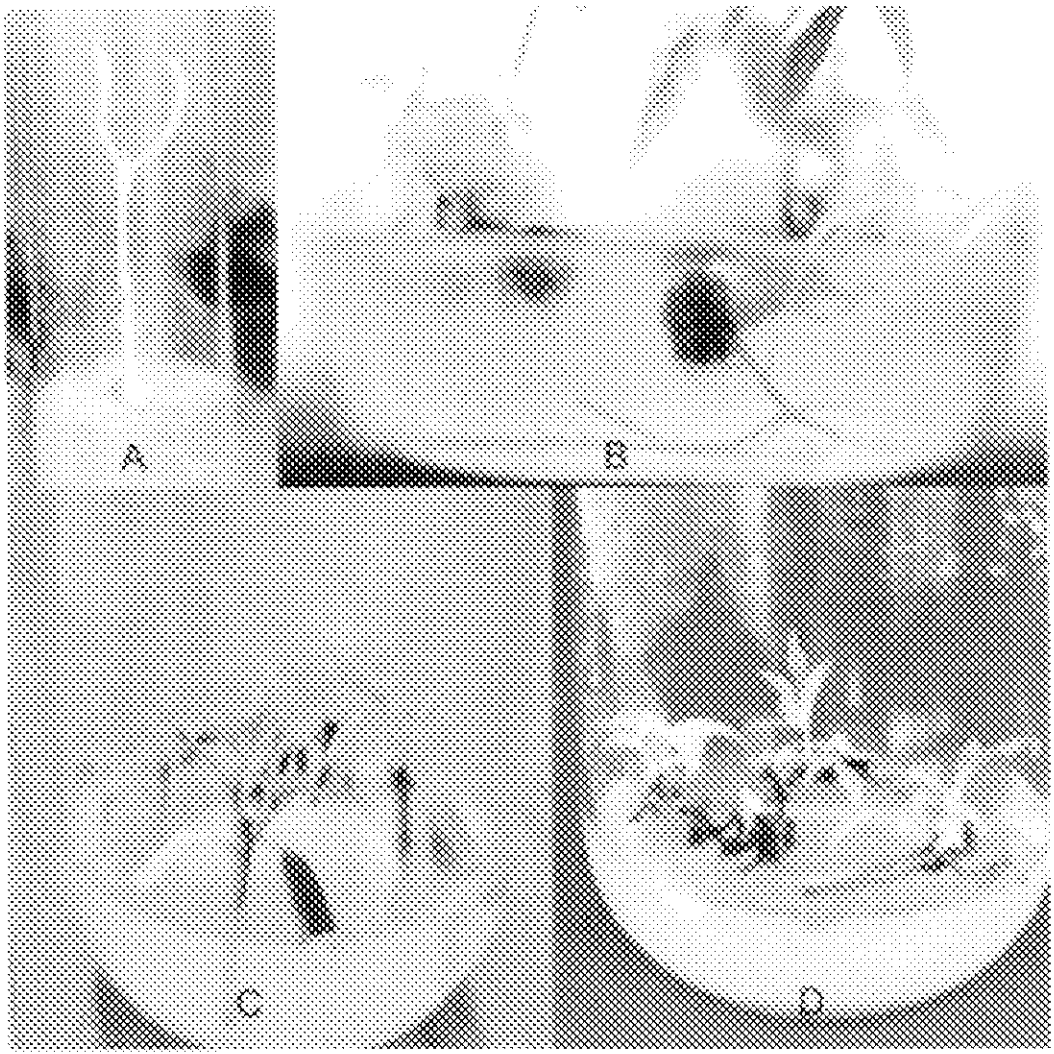

Figura 1. Fases de multiplicación a partir de explantes nodales de nogal.

A. Plantulas obtenidas que demuestran la disponibilidad de material como fuente de explantes.

B. Producción de callo y raíz, observado en altas concentraciones de citocinina.

C. Producción de explantes nodales.

D. Multiplicación de explantes nodales.

Cuadro 1. Efecto de diferentes citocininas en la fase de multiplicación de explantes nodales de cedro.

Tratamiento	µM	Días a brotación	% de brotación	% de sobrevivencia	No. de brotes por explante	Altura de brotes (cm)
BAP						
1	2,2	29,26 a	33,0 ab	77,7 ab	0,44 ab	1,0 a
2	6,5	29,20 a	60,8 a	94,3 a	1,00 a	0,7 ab
3	13,3	5,80 b	11,0 b	33,3 b	0,11 b	0,2 b
4	20,0	11,7 ab	16,5 b	83,3 a	0,49 ab	0,5 ab
Kinetina						
5	2,2	17,5 ab	33,2 ab	100 a	0,77 ab	0,3 b
6	6,5	5,8 b	11,0 b	33,3 b	0,16 b	0,2 b
7	13,3	17,5 ab	16,5 b	83,3 a	0,33 b	0,5 ab
8	20,0	11,7 ab	11,0 b	66,7 ab	0.16 b	0,3 b
2-iP						
9	2,2	5,8 b	5,5 b	33,3 b	0,05 b	0,2 b
10	6,5	11,7 ab	22,2 b	61,0 ab	0,50 ab	0,3 b
11	13,3	17,5 ab	27,5 b	100 a	0,38 ab	0,5 ab
12	20,0	11,7 ab	11,0 b	83,3 a	0,22 b	0,3 b

Valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes (Duncan 0,05).

4.2.1. Días a brotación

El promedio de días a brotación fue de 14,5 días. Los mejores tratamientos fueron 2,2 µM de el 2-iP, 6,5 de la kinetina y 13,3 µM de la BAP los cuales mostraron diferencia significativa con las bajas concentraciones de la BAP, donde el tiempo requerido fue de 30 días.

4.2.2. Porcentaje de brotación

De las tres citocininas, la BAP tuvo un mayor efecto en promover la brotación. El mayor porcentaje de brotación (60,83%), se obtuvo con 6,5 µM de BAP, el cual no mostró diferencia significativa con 2,2 µM de BAP y 2,2 µM de kinetina (33% y 33,2%, respectivamente), pero sí con todas las demás concentraciones de estas citocininas y de 2-iP. El porcentaje más bajo de brotación (5,5%) se obtuvo con 2,2 µM de 2-iP (Fig. 2 A). Al repetir el experimento sólo con las concentraciones de la BAP, los mejores tratamientos fueron 2,2 µM y 13,3 µM con un 100 y 93% de brotación, respectivamente (Fig. 2 B).

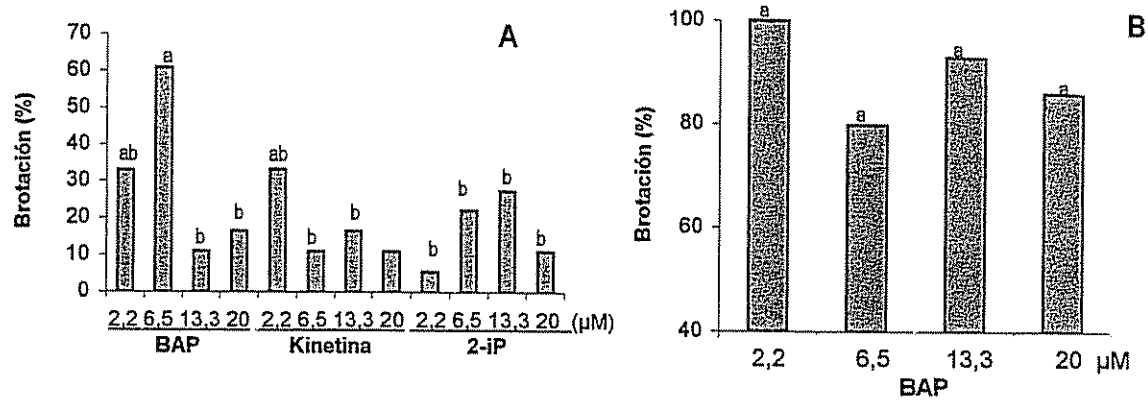

Figura 2. Efecto de diferentes citocininas sobre el porcentaje de brotación de explantes nodales de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP.

4.2.3. Porcentaje de supervivencia

En general, los explantes sobrevivieron en todos los tratamientos con citocininas. El promedio de sobrevivencia fue de 70,8% y se obtuvo hasta un 100% con 2,2 µM de kinetina y 13,3 µM de 2-iP, pero estos tratamientos solo mostraron diferencia significativa con 13,3 µM de BAP, 6,5 de kinetina y 2,2 µM de 2-iP, donde la supervivencia observada fue de 33,3% (Fig. 3 A). Al evaluar solo los tratamientos con BAP, la mejor concentración fue 2,2 µM (Fig. 3 B).

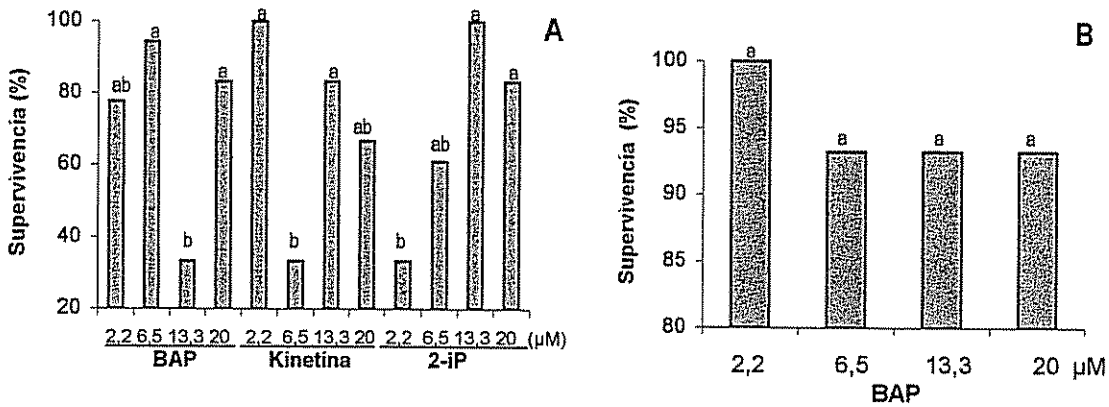

Figura 3. Efecto de diferentes citocininas sobre el porcentaje de supervivencia de explantes nodales de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP.

4.2.4. Número promedio de brotes por explante

Con respecto a esta variable, la BAP superó a la kinetina y ésta a la 2-iP. No hubo diferencias significativas entre 2,2, 6,5 o 20 µM de BAP (*nb* = 0,4, 1,0 y 0,5 respectivamente) con 2,2 µM de kinetina y

6,5 y 13,3 µM de 2-iP (*nb* = 0,8, 0,5 y 0,4, respectivamente), pero sí entre 2,2 µM de BAP (*nb* = 1,0) con los demás tratamientos (Fig. 4 A).

No obstante que el número de brotes obtenido con el mejor tratamiento (2,2 µM BAP), fue mínimo (1), al evaluar solo los tratamientos de BAP se obtuvieron de 2,5 a 4 brotes por explante, siendo nuevamente 2,2 µM la mejor concentración observada al producir 4,06 brotes (Fig. 4 B).

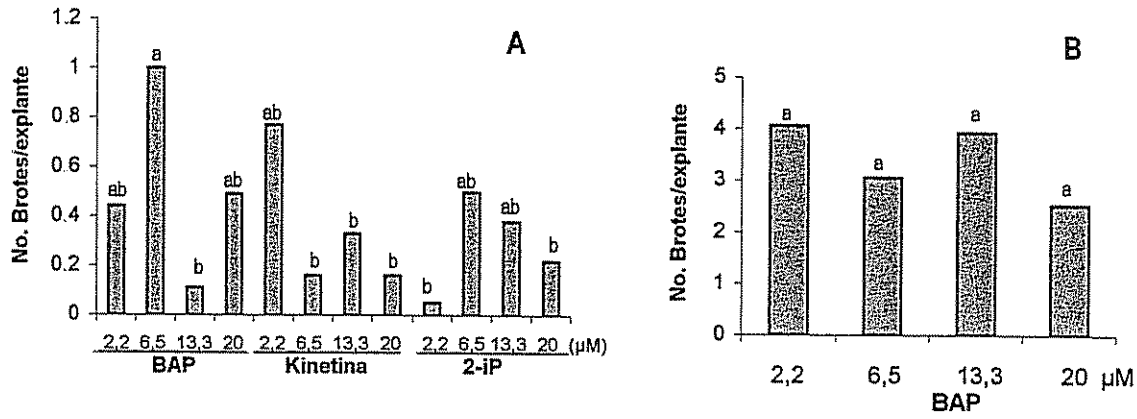

Figura 4. Efecto de diferentes citocininas sobre el número promedio de brotes por explante nodal de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP.

4.2.5. Altura de brote

La altura del brote fue similar en presencia de kinetina y 2-iP, pero se observó un mayor efecto con BAP. Los brotes más largos (1 cm), se obtuvieron con la concentración de 2,2 µM de BAP, la cual mostró diferencia significativa con 13,3 µM de BAP y con las concentraciones de 2,2 µM y 6,5 µM de kinetina y 2-iP. Los brotes más pequeños (0.16 cm) se observaron en los explantes expuestos a 2,2 µM de 2-iP (Fig. 5 A). Al repetir el experimento sólo con los tratamientos de BAP, nuevamente se observó una mayor altura de brotes con 2,2 y 6,5 µM (Fig. 5 B).

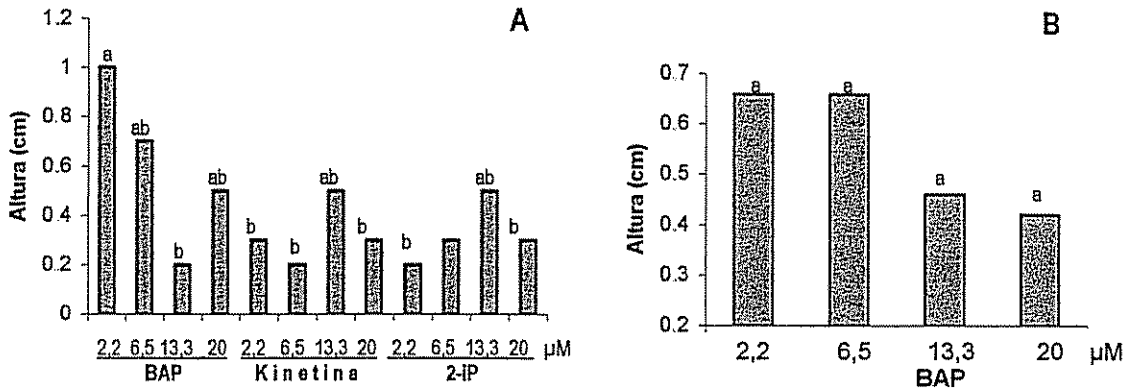

Figura 5. Efecto de diferentes citocininas sobre la altura de brotes obtenidos en explantes nodales de cedro. A. Comparación del efecto de la BAP, kinetina y 2-iP. B. Efecto independiente de la BAP.

4.3. Fase de desarrollo

Hubo efecto del medio de cultivo, y de la interacción de los tres factores sobre la altura de brote y/o el porcentaje de supervivencia. Además, con el medio WPM fue notable un enraizamiento general, sin mediar un procedimiento de inducción, mientras que con el medio MS sólo en algunos tratamientos se detectó raíces.

4.3.1. Altura del brote

El efecto del medio de cultivo fue altamente significativo ($P < 0,0001$) (Anexo 5). El medio WPM fue superior al medio MS ($P < 0,05$), para promover la altura del brote (2,13 y 0,54 cm, respectivamente) (Anexo 6). En el análisis individual, el medio WPM no mostró efecto de los factores (Fig. 6 A, B), ni de la interacción (Fig. 7).

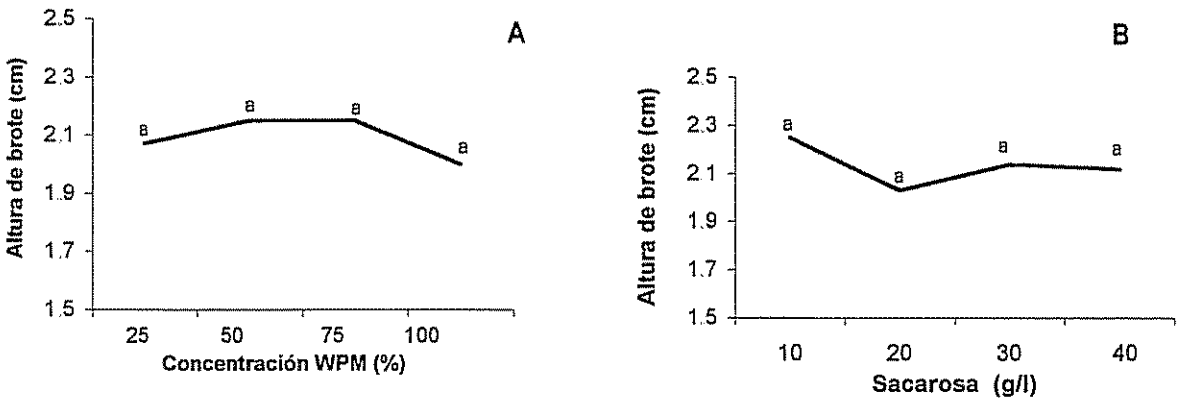

Figura 6. Efecto de diferentes factores sobre la altura de brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa.

La mejor concentración de medio fue al 25%, la cual también formó la mejor combinación con sacarosa a 10 gl^{-1} (tratamiento 29) (Anexos 7, 8 y 9), aunque no fue estadísticamente diferente de otras interacciones (Fig. 7).

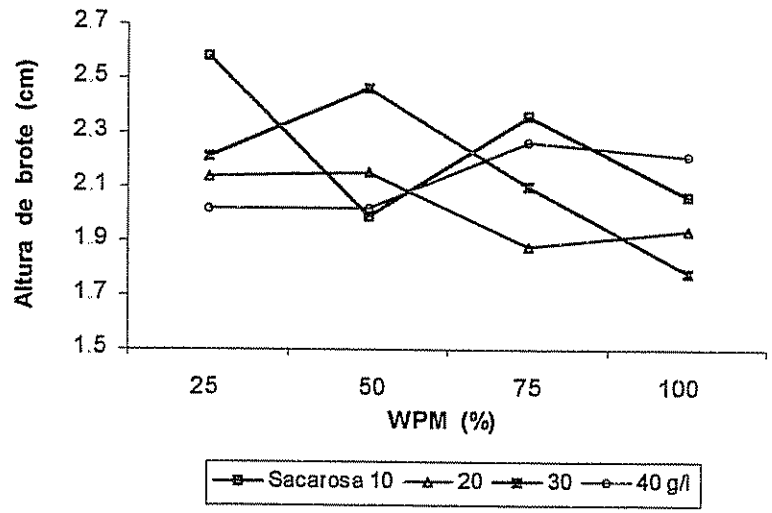

Figura 7. Efecto de la interacción entre la concentración del medio WPM y la concentración de sacarosa, sobre la altura de brotes de cedro.

4.3.2. Porcentaje de supervivencia

Para esta variable sólo el tipo de medio de cultivo tuvo efecto ($P > 0,03$), encontrándose diferencias significativas (Anexo 5). El mejor medio fue el WPM al producir un 100% de sobrevivencia, contra un 91,1% en el medio MS (Anexo 6).

4.3.3. Porcentaje de enraizamiento

No obstante la ausencia de diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones de medio WPM, así como entre la interacción con las concentraciones de sacarosa (Anexo 9 y 10), se observó una tendencia ascendente en el porcentaje de enraizamiento conforme disminuyó la concentración del medio hasta 50% (Fig. 8 A). Al incrementar la concentración de sacarosa de 10 a 20 gl^{-1} se observó un aumento en el enraizamiento, el cual disminuyó con 30 gl^{-1}, pero con 40 gl^{-1} volvió a subir al mismo nivel que con la segunda concentración (Fig. 8 B).

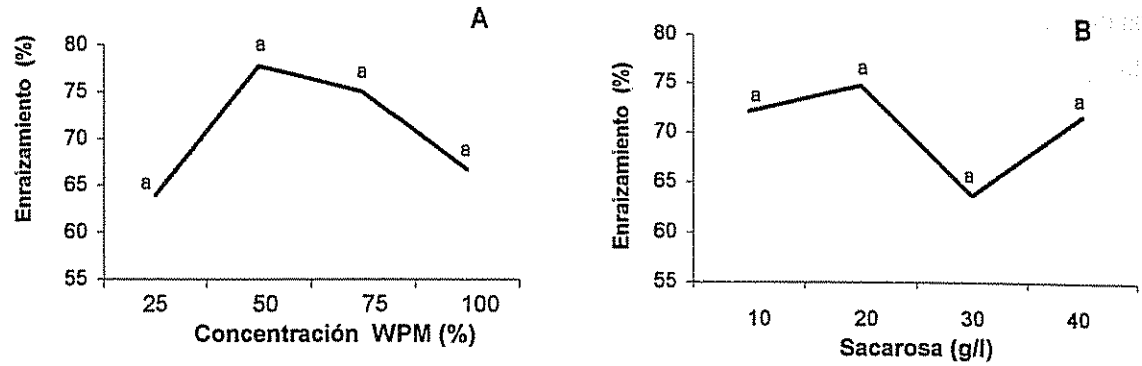

Figura 8. Efecto de diferentes factores sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa.

La mejor interacción para favorecer el enraizamiento se obtuvo de la combinación de medio al 25% más sacarosa a 20 gl^{-1}; sin embargo, la misma concentración de medio más sacarosa a 30 gl^{-1}, produjo el más bajo porcentaje de enraizamiento (100 y 22%, respectivamente) (Fig. 9).

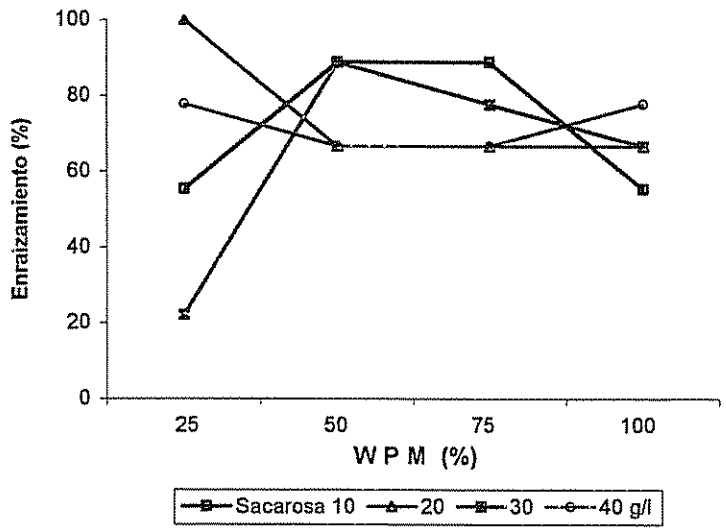

Figura 9. Efecto de la interacción entre la concentración de medio WPM y de sacarosa en el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro.

4.3.4. Número promedio de raíces por explante

Con base en el análisis de varianza, ni los factores ni la interacción mostraron diferencia significativa para esta variable, pero la prueba de LSMEANS detectó diferencias entre el tratamiento 31 con los tratamientos el 27, 20, 30 y 32 (Anexo 10).

A medida que se disminuyó la concentración de medio de cultivo hasta el 50%, se observó una leve tendencia de incremento en el número promedio de raíces por explante, el cual disminuyó cuando el medio se diluyó al 25%. Esta misma tendencia de incremento, también se observó a medida que se incrementó la concentración de sacarosa (Fig. 10 A, B).

La prueba de comparación múltiple de medias corroboró estos resultados al señalar diferencias significativas entre los tratamientos 27 y 31 (Anexos 6 y 7).

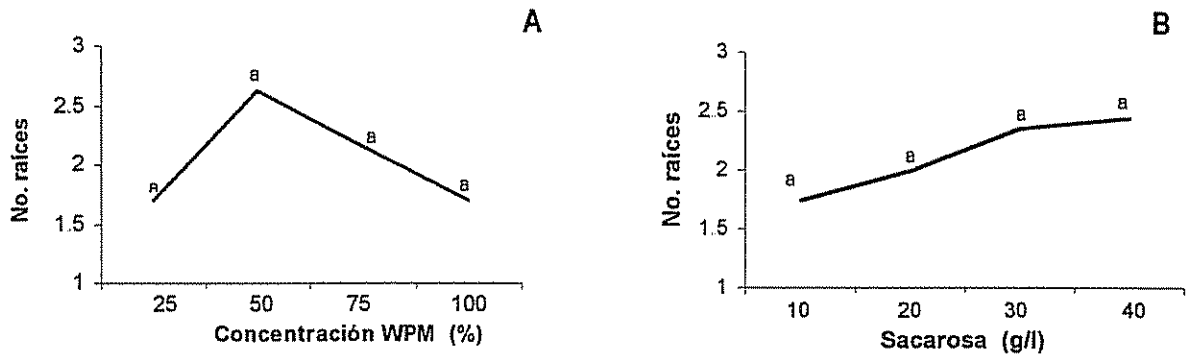

Figura 10. Efecto de diferentes factores sobre el número de raíces de brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM, B. Concentración de sacarosa.

En cuanto a las combinaciones, el número más alto de raíces por explante (3,88) se obtuvo en el medio al 50% con 30 gl^{-1} de sacarosa y con esta misma concentración, conforme se disminuyó la concentración del medio, el número de raíces también disminuyó (Fig. 11).

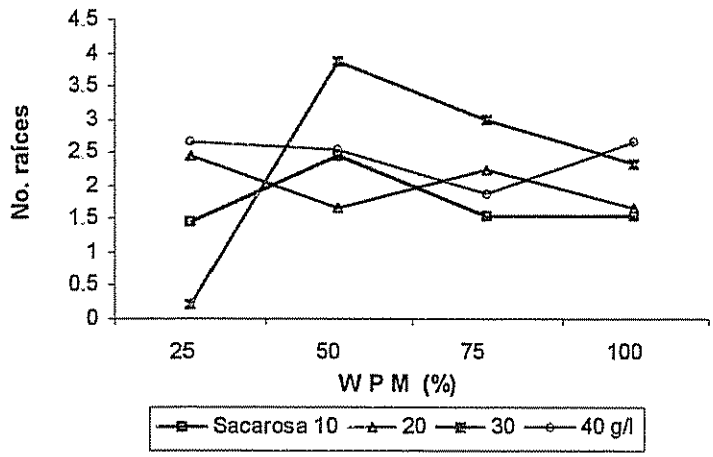

Figura 11. Efecto de la interacción entre concentración de medio de cultivo WPM y de sacarosa, en el número de raíces en brotes de cedro

4.3.5. Longitud de raíz

Aunque el análisis de varianza no detectó diferencias entre factores ni entre la interacción, la prueba de medias de cuadrados mínimos detectó diferencias entre el tratamiento 20 con el 21, 22 y 31, al nivel de 0,03, 0,02 y 0,001, respectivamente (Anexo 10).

Esta variable mostró un comportamiento contrario al observado para el número de raíces en cuanto a las concentraciones de medio de cultivo, pues a medida que disminuyó la concentración, disminuyó la longitud de raíz (Fig. 12 A). Con respecto al factor concentración de sacarosa, la longitud de raíz presentó una tendencia a aumentar conforme se incrementó el nivel de sacarosa alcanzando el máximo de 8,2 cm con 40 gl^{-1} (Fig. 12 B).

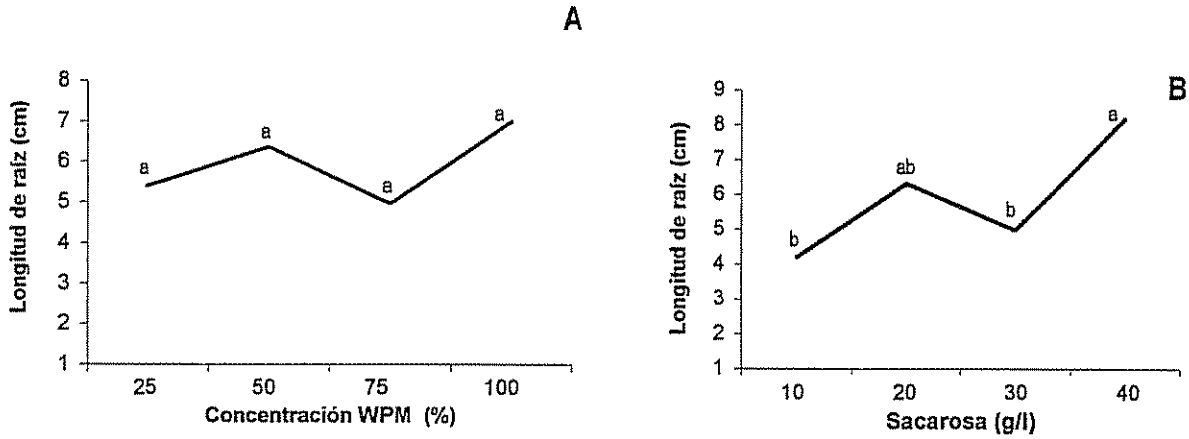

Figura 12. Efecto de diferentes factores sobre la longitud de raíz en brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa.

La interacción entre el medio al 100% y el sacarosa a 40 gl^{-1} (tratamiento 20) fue la mejor al promover una mayor longitud de raíz (11,83 cm). Este tratamiento fue estadísticamente superior sólo al tratamiento 31 (Anexo 10).

Con 30 gl^{-1} de sacarosa, conforme disminuyó la concentración de medio, aumento la longitud de raíz, alcanzando el máximo al combinarse con el medio al 50%, aunque ninguna de sus otras combinaciones tuvo el valor máximo observado para esta variable, pero sí el mínimo al combinarse con el medio al 25% (tratamiento 31 = 0,83 cm) (Fig. 13).

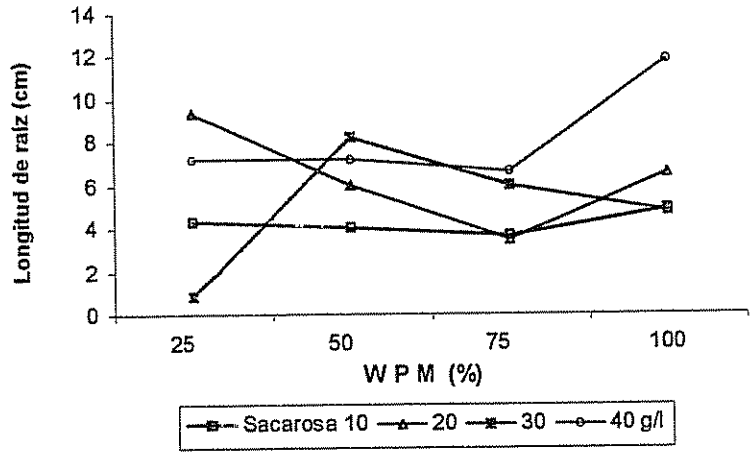

Figura 13. Efecto de la interacción entre la concentración del medio de cultivo y de sacarosa, en la longitud de raíces de brotes cedro.

4.3.6. Raíces secundarias

Aunque el análisis de varianza no señaló efecto de ninguno de los factores ni de la interacción, la prueba de comparación múltiple de medias, señaló al tratamiento 28 como el mejor para promover la formación de raíces secundarias (Anexo 8 y 10). Dicho tratamiento correspondió a la mejor concentración de medio WPM (50%) y a la mejor concentración de sacarosa (40 gl^{-1}) (Anexo 9), encontrados al analizar cada factor de manera individual (Fig. 14 A, B) y detectados también al observar la interacción entre los factores (Fig. 15).

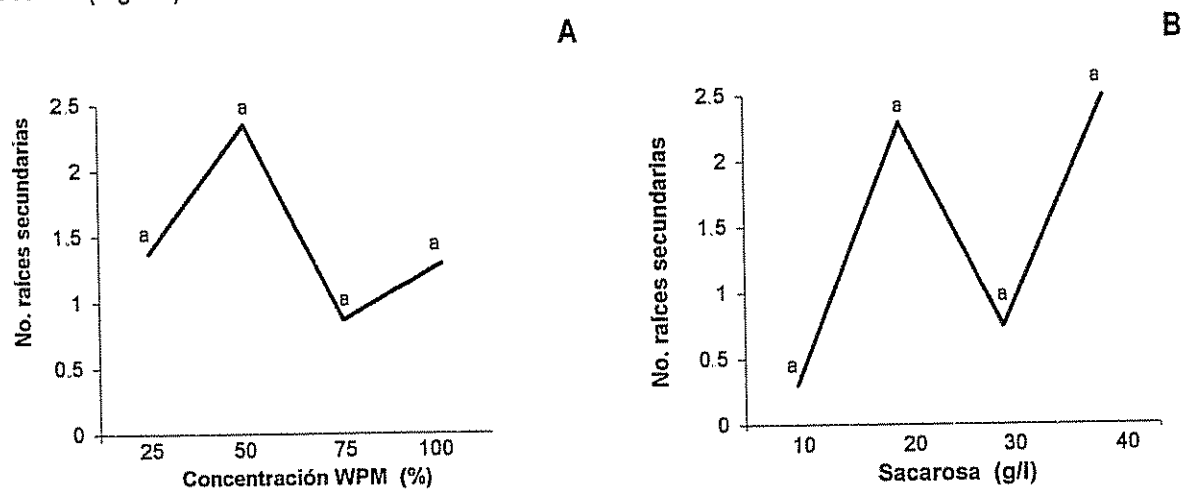

Figura 14. Efecto de diferentes factores sobre el número de raíces secundarias de brotes de cedro. A. Concentración de medio de cultivo WPM. B. Concentración de sacarosa.

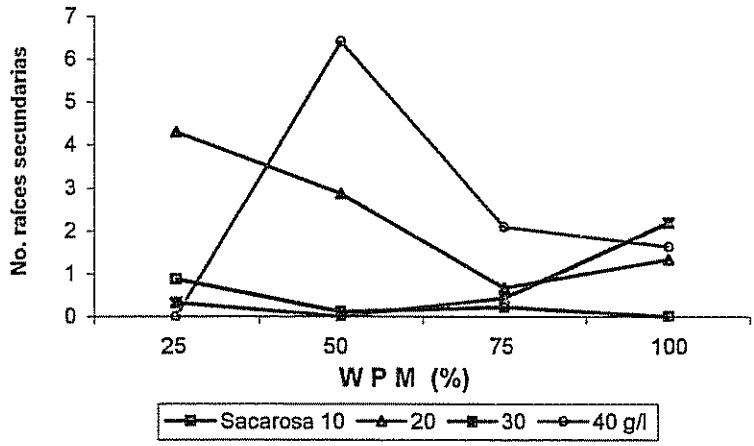

Figura 15. Efecto de la interacción entre la concentración de medio de cultivo WPM y de sacarosa, en el número de raíces secundarias en brotes de cedro.

4.4. Fase de enraizamiento

4.4.1. Inducción de raíces

Para la inducción de raíz inicialmente se estableció un experimento en diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2. En esta prueba preliminar se observó desarrollo de callo prácticamente en todos los tratamientos, por lo que el experimento se repitió, incluyendo un testigo absoluto carente de auxinas. Debido a la disponibilidad limitada de material vegetal, el diseño utilizado en este último experimento fue completamente al azar, con arreglo de tratamientos $T_A + 2^2$ (Anexo 11), 10 repeticiones y 4 tubos de ensayo como unidad experimental.

4.4.1.1. Porcentaje de supervivencia

No hubo diferencias significativas entre tratamientos. No obstante, el tratamiento sin auxinas mostró una mayor supervivencia (Fig. 16 A). De igual manera, no se observó efecto de ANA (Fig. 16 B), ni de AIB aunque se observó una tendencia de incremento al aumentar la concentración de AIB (Fig. 17 A).

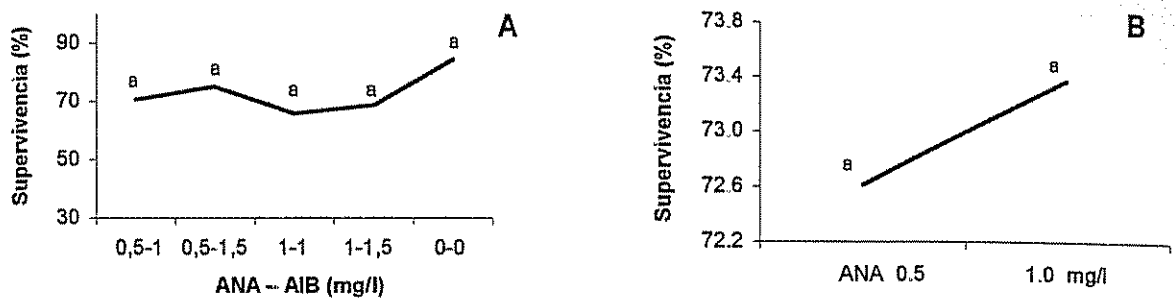

Figura 16 . Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de supervivencia de brotes de cedro. A. Combinaciones de ANA y AIB y testigo absoluto. B. Efecto individual de ANA.

A pesar de no haberse detectado efecto de la interacción, el porcentaje de supervivencia disminuyó con AIB a 1 mgl^{-1} y aumentó con AIB a 1,5 mgl^{-1}, cuando se incrementó la concentración de ANA. Con base en lo anterior, la mejor combinación para esta variable fue ANA 1 mgl^{-1} + AIB 1,5 mgl^{-1} (Fig. 17 B).

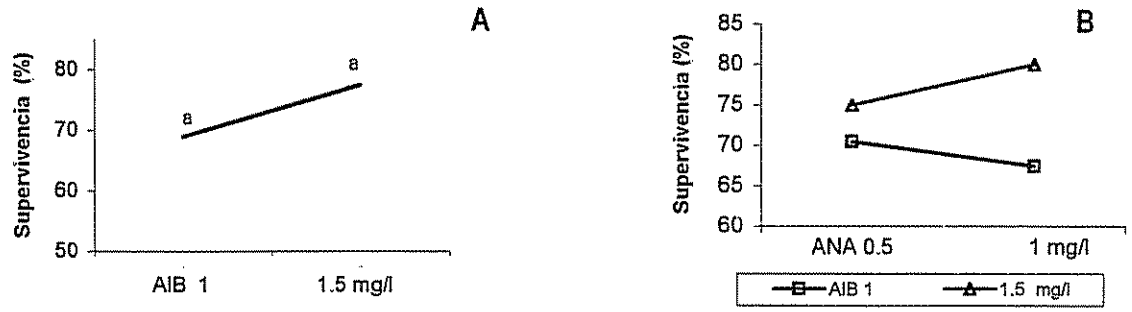

Figura 17. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de supervivencia de brotes de cedro, en la fase de inducción de raíces. A. Efecto individual de AIB. B. Efecto de la interacción entre ANA y AIB.

4.4.1.2. Porcentaje de enraizamiento

El análisis de varianza no indicó diferencias significativas entre tratamientos (Anexo 13). La comparación de medias señaló al tratamiento 1 como estadísticamente superior al testigo, pero no a los demás tratamientos (Fig. 18 A). No se observaron efectos ni de ANA (Fig. 18 B) ni de AIB (Fig. 19 A), no obstante, cuando se aumento la concentración de cualquiera de estos factores, el porcentaje de enraizamiento disminuyó (Anexo 14).

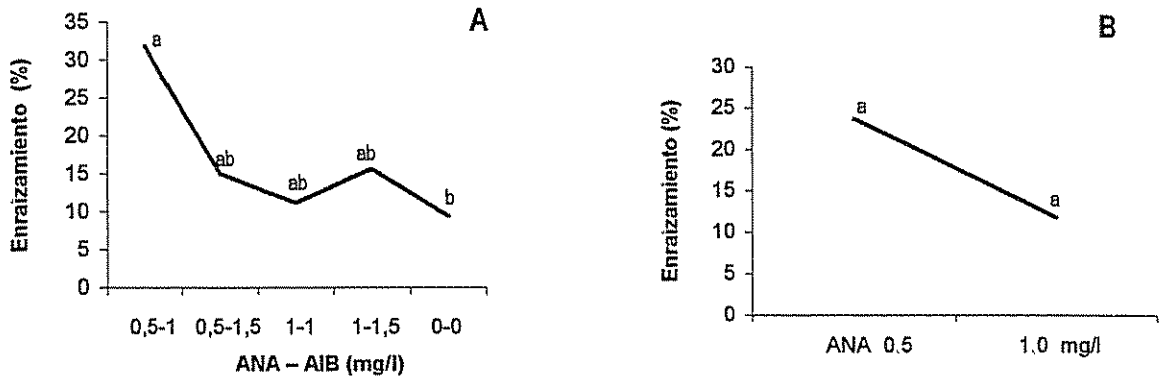

Figura 18. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro. A. Combinaciones de ANA y AIB y testigo absoluto. B. Efecto individual de ANA.

La interacción de ambas auxinas no fue significativa (Anexo 13) en base al análisis de varianza; no obstante, la combinación de ANA 0,5 mgl^{-1} + AIB 1 mgl^{-1} (tratamiento 1) (Fig. 19 B), fue diferente del tratamiento 2 y 3 ($P < 0,04$ y $P < 0,02$ respectivamente) (Anexo 15).

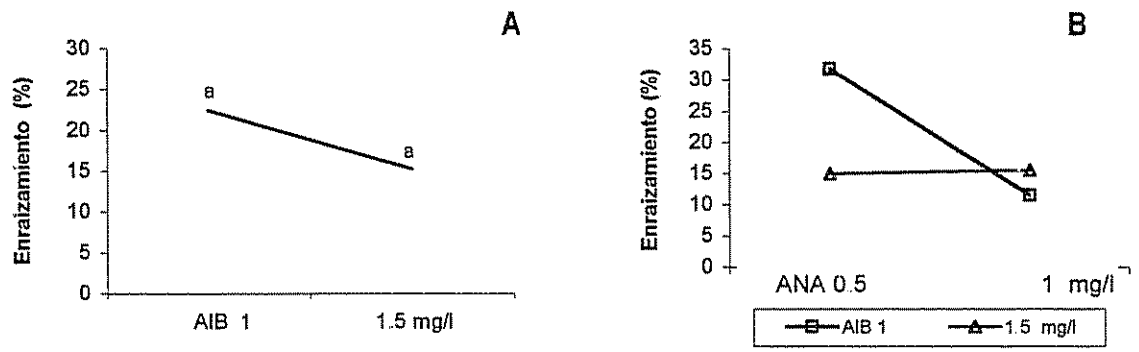

Figura 19. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el porcentaje de enraizamiento de brotes de cedro. A. Efecto individual de AIB. B. Efecto de la interacción entre ANA y AIB.

4.4.1.3. Número promedio de raíces por explante

Se encontraron diferencias estadísticas significativas sólo entre el tratamiento 1 y el testigo (Fig. 20 A). A diferencia de AIB (Fig. 20 B), se observó efecto de ANA, siendo estadísticamente superior la concentración de 0,5 mgl^{-1} (Fig. 21 A) (Anexo 14). La interacción también fue significativa (Fig. 21 B), y hubo diferencias entre el tratamiento 1 con el 3 y 4 ($P < 0,01$ y $P < 0,02$, respectivamente) (Anexo 15). Por tanto, la mejor combinación fue ANA 0,5 mgl^{-1} + AIB 1 mgl^{-1}, correspondiente al tratamiento 1.

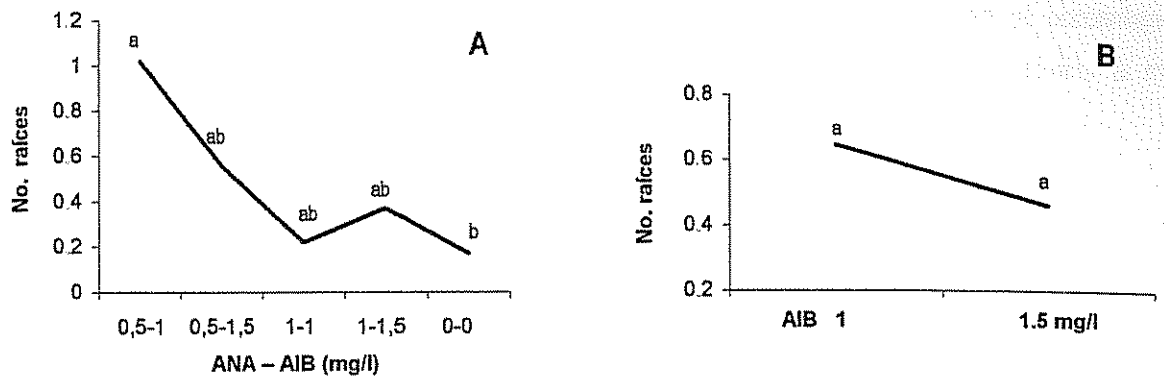

Figura 20. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el número promedio de raíces en brotes de cedro. A. Combinaciones de ANA y AIB y testigo absoluto. B. Efecto individual de AIB.

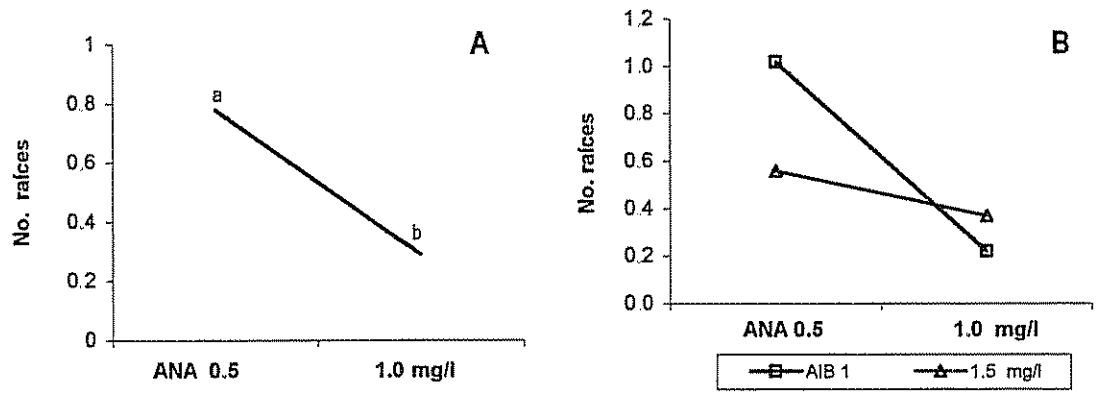

Figura 21. Efecto de tratamientos de auxinas sobre el número promedio de raíces de brotes de cedro. A. Efecto individual de ANA. B. Efecto de la interacción entre ANA y AIB.

4.4.1.4. Longitud de raíces (cm)

Para esta variable no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos; no obstante, el tratamiento 1 tuvo mayor efecto que el resto de los tratamientos y el testigo. Los tratamientos 3 y 4, fueron iguales en cuanto a su efecto para promover la longitud de raíz y menores que el testigo (Fig. 22 A) (Anexo 12). No se observaron efectos significativos de ANA (Fig. 22 B), ni de AIB (Fig. 23 A) para esta variable, aunque la tendencia fue a disminuir al incrementar la concentraciones de cualquiera de estas auxinas, siendo más notorio para el caso de ANA (Anexo 14). La interacción igualmente no tuvo efecto en la longitud de raíz (Anexo 13 y 15), pero se observó una tendencia a disminuir con las combinaciones de las concentraciones más altas (Fig. 23 B).

La concentración más alta de sacarosa produjo los valores más altos en el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de raíz y un porcentaje de supervivencia similar al mejor obtenido con la concentración intermedia.

Los resultados obtenidos entre los dos tipos de gelificante prácticamente fueron los mismos tanto numérica como estadísticamente.

Cuadro 2. Efecto de carbón activado, sacarosa y tipo de gelificante en la fase de expresión de raíces de cedro.

Factor y concentración (gl^{-1})	Porcentaje		Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
	Supervivencia	Enraizamiento		
Carbón activado				
0,0	87,50 a	16,66 a	0,72 a	0,46 a
1,5	77,00 ab	10,41 a	0,27 a	0,30 a
2,0	70,83 ab	14,58 a	0,35 a	0,57 a
3,0	66,66 b	9,52 a	0,16 a	0,14 a
Sacarosa				
15	71,87 a	9,37 a	0,22 a	0,24 a
30	79,03 a	9,67 a	0,31 a	0,46 a
45	76,66 a	20,00 a	0,65 a	0,45 a
Gelificante				
Agar 7,0	73,96 a	13,54 a	0,40 a	0,43 a
Phytagel 2,0	77,78 a	12,22 a	0,37 a	0,33 a

Valores con letras iguales para cada variable y factor no son estadísticamente diferentes (Duncan 0,05).

Como se observa en la Fig. 24, aunque el enraizamiento obtenido mediante los tratamientos de inducción y expresión de raíz fue notablemente inferior al observado en la fase de desarrollo con el medio WPM, permitió la aclimatación posterior de las plántulas. El poco enraizamiento en la fase de inducción, podría atribuirse al periodo de 30 días de oscuridad en que se desarrolló la fase de inducción, ya que durante este periodo algunos explantes presentaron clorósis y llegaron a morir, aspecto también señalado por Von Arnold y Eerikson (1984) para varias especies leñosas.

4.4.3. Enraizamiento *ex vitro*

No se observó respuesta en ninguno de los tratamientos evaluados, debido quizás al reducido tamaño de los explantes (1-2 cm), pues se ha señalado que los brotes de poca altura generalmente no enraizan (Augustine y D'Souza 1997).

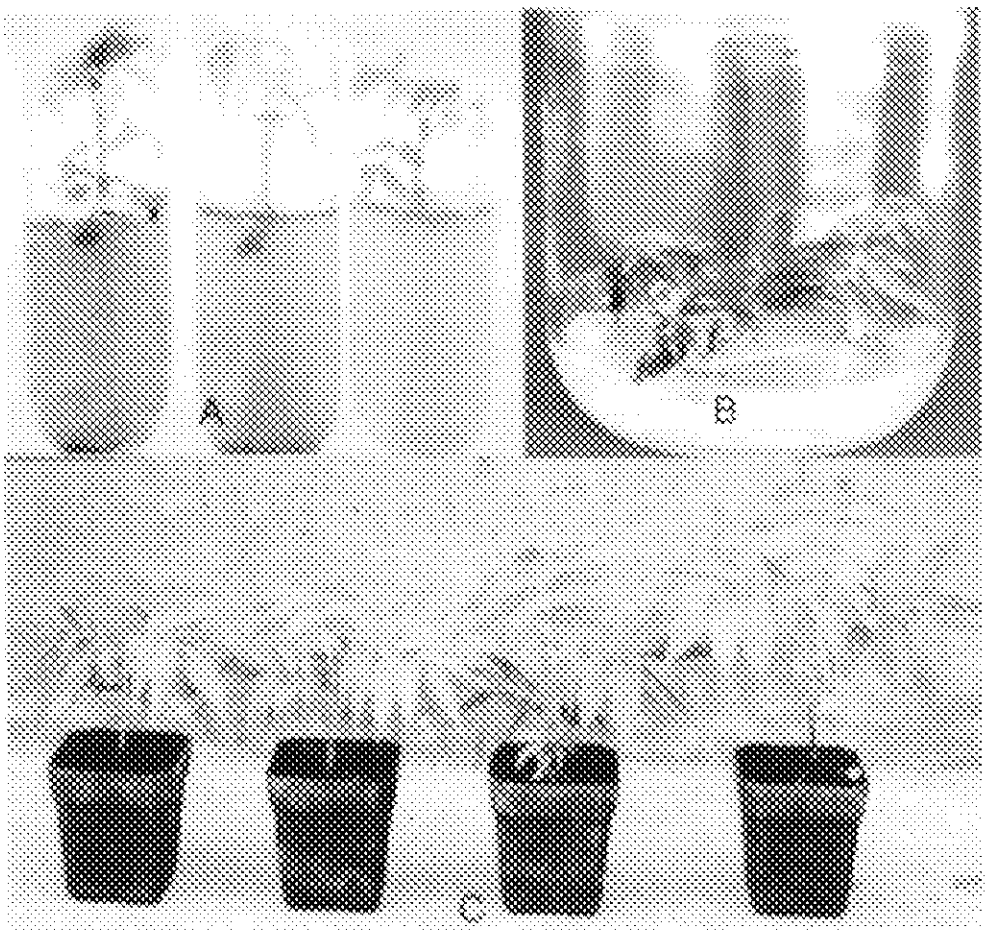

Figura 24. Producción de raíces en micropropagación de caña a partir de explantes nodales.
A. Fase de enraizamiento.
B. Trasplantando explantes en fase de enraizado.
C. Plantas enraizadas.

5. DISCUSION

Se sabe que el genotipo influye en el comportamiento de las especies *in vitro* (Bonga y Von Aderkas 1992). En la germinación *in vitro* de semilla de cedro de tres procedencias (Mex 1-29, Mex 1-46, Mex 1-74) y con tres meses de almacenada, se observó diferencias en el porcentaje de contaminación, ya que varió entre 20-46%. Además, en la procedencia Mex 1-46 se observó un 5% de plántulas albinas (Fig. 24) lo cual, aunado a las contaminadas (43%), disminuyó considerablemente la disponibilidad de material para cultivar posteriormente *in vitro*.

En el presente estudio, la contaminación inicial por hongos y bacterias de las semillas influyó negativamente durante la germinación *in vitro* y también en la supervivencia posterior de explantes. Esto se puede atribuir a la asociación de las semillas de especies forestales tropicales con muchos microorganismos, que de manera natural ayudan a los procesos de germinación, pero que representan un factor limitante para los trabajo *in vitro* (Castro, 2001). Esta asociación afecta directa o indirectamente el proceso de micropropagación: de manera directa al contaminar y matar los embriones y de manera indirecta mediante los tratamientos de desinfección aplicados y que pueden ser tóxicos para la semilla (Kuneman y Faaj-Groenen 1988). Los porcentajes de contaminación durante la germinación fueron hasta del 46% y en la fase de multiplicación posterior, se registraron porcentajes de supervivencia del orden de 33% debido principalmente, a la presencia de hongos y bacterias, tal y como observaron Berrios *et al.* (1991) en la propagación clonal *in vitro* de diferentes especies de poró (*Erythrina* spp.).

Los porcentajes más bajos de supervivencia (33%) se registraron en los tratamientos de citocininas, (BAP 13,3 µM, Kinetina 6,5 y 2-iP 2,2 µM), que aunque aceleraron la brotación, fueron estadísticamente inferiores con las bajas concentraciones de BAP (2,2 y 6,5 µM), en cuanto al porcentaje de brotación y al número y longitud de brotes obtenidos, como se observó previamente en los ensayos. Esta baja supervivencia puede deberse al número y longitud reducidos de los brotes, lo cual favorece una mayor susceptibilidad de los mismos, tanto a microorganismos contaminantes como a los nutrimentos y reguladores del desarrollo empleados en el medio de cultivo (Jaroensanti y Panijpan 1981). Por tanto, las bajas concentraciones de la BAP fueron más eficaces para promover la brotación de los explantes nodales de cedro. No obstante, los brotes obtenidos fueron muy pequeños y dificultaron su separación posterior para pasar a desarrollo (Trujillo *et al.* 1994, Orellana 1997). El hecho de que estas mismas concentraciones de la BAP mantuvieran su efecto positivo en multiplicación, al compararse con las diferentes concentraciones de kinetina y 2-iP y con concentraciones más altas de la misma BAP, y al repetirse el experimento solo con las

concentraciones de BAP, las señala como potencialmente útiles para la micropropagación de *C. odorata*, al igual que se han señalado para *Eucalyptus camaldulensis* (Gupta *et al.* 1983), *E. globulus* (Bennett *et al.* 1994), *Alnus acuminata* (Badilla *et al.* 1992) y *Croton sublyratus* (Shibata *et al.* 1996) entre otras especies. Por otro lado, la presencia de callo en la base de los explantes, más frecuentemente observada a altas concentraciones de BAP, de kinetina o de 2-iP, corresponden con lo observado por Puddephat *et al.* (1997) en *Quercus robur* (Fagaceae) y puede atribuirse a que dichas concentraciones superan un límite aceptable por el explante provocando este desorden fisiológico; otra causa podría ser la alta intensidad metabólica de los explantes, por ser tejidos jóvenes, que les confiere mayor potencial morfogenético y con ello mayor facilidad para emitir estructuras como brotes nuevos y raíces, o en su defecto callo (Bonga 1982, Pinto 1994).

Aunque el genotipo influye en la respuesta de los cultivos *in vitro*, y específicamente, diferentes especies de plantas muestran significativa variabilidad en absorción y metabolismo de la BAP, añadida al medio de cultivo (Blakesley y Constantine 1992), los resultados obtenidos señalan que *C. odorata* tuvo un comportamiento similar a *C. tonduzii* (Meliaceae), al producir un mejor desarrollo de brotes a la misma concentración de BAP (2.2 µM) (Guevara *et al.* 1992), aspecto que coincide con lo encontrado por Lineberger (2000a) al mencionar que especies diferentes de un mismo género pueden responder igual a una misma citocinina.

El alargamiento de brotes máximo alcanzado (1 cm) en el presente estudio, fue similar al obtenido usando explantes nodales de *Kielmeyera coriacea* para multiplicación *in vitro*. En esta especie, la mayor brotación se obtuvo con 2,2 µM de BAP y los brotes fueron menores de 1 cm (Pinto *et al.* 1994). Sin embargo, este tamaño de los brotes obtenidos no garantiza el éxito para pasar a la fase posterior del cultivo *in vitro* (desarrollo), por su difícil manejo y la mayor susceptibilidad a la manipulación. Por lo anterior, sería recomendable realizar un subcultivo en un medio con carbón activado para remover residuos de citocinina utilizada en multiplicación (Biondi *et al.* 1984).

La fase previa de desarrollo de los brotes, al enraizamiento, es de suma importancia ya que en ésta, el brote obtenido en multiplicación, alcanzará el tamaño adecuado para que cuando adquiera raíces se pase a aclimatación y se garantice una alta supervivencia. Por esto, es necesario iniciar con brotes de tamaño adecuado (mínimo 1 cm) (Augustine y D'Souza 1997). Como se observó en el presente estudio, tanto los nutrimentos del medio de cultivo, como la cantidad de sacarosa utilizados influyeron en el desarrollo de los brotes (Welander 1993). Las bajas concentraciones de medio WPM (25 o 50%), al igual

que las concentraciones de 10 o 30 gl^{-1} de sacarosa, fueron las mejores para favorecer la altura de brotes. Resultados similares fueron obtenidos para *Croton sublyratus* (Shibata *et al.* 1999). Lo anterior puede atribuirse a que las especies leñosas requieren una formulación de nutrimentos baja en concentraciones de sales (Margara 1988) y a que, si bien la mayoría de los cultivos *in vitro* son dependientes de una fuente de carbohidratos, hasta que están listos para aclimatación (Kozai *et al.* 1988), las bajas concentraciones de sacarosa pueden inducir un metabolismo autotrófico y favorecer una morfología de brotes normal (García-Martín *et al.* 2001).

Aunque en el medio MS se registró un 91% de supervivencia, éste fue estadísticamente inferior al 100% registrado en el medio WPM, lo cual puede atribuirse a la mayor concentración de macronutrimentos en el medio MS, que pudiera ser tóxica para los explantes, o ser más atractiva para los agentes contaminantes (Margara 1988).

El enraizamiento espontáneo observado en la fase de desarrollo se favoreció más acentuadamente en el medio WPM al 50% más sacarosa a 30 gl^{-1} para el número de raíces y al 100% más 40 gl^{-1} de sacarosa para longitud de raíz y número de raíces secundarias. Este resultado podría atribuirse a que la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de tejidos de especies leñosas, prefieren bajas concentraciones de sales y además, están marcadamente influenciados por la disponibilidad de N y la forma en la cual este nutrimento esté presente en el medio (NO_3^+ o NH_4^-) (Margara 1988). A diferencia del medio WPM, el medio MS se caracteriza por un alto contenido de N (60 mel^{-1}) del cual una tercera parte está en forma reducida (amonio), y por una alta concentración de K. También, el medio WPM al igual que el MS, carece de $MgSO_4$ y $CaCl_2$, y en cambio posee menos del 50% de N en forma de nitratos (Anexo 1). De igual manera, el enraizamiento favorecido con las altas concentraciones de sacarosa, puede deberse a que la sacarosa, al igual que el N, es fuente energía para que las plantas desarrollen tejidos y órganos como por ejemplo las raíces (Veirskov 1988).

La ausencia de efecto estadístico en los factores y en la interacción, no impide señalar a la combinación de medio WPM al 50% más sacarosa a 30 gl^{-1}, como la mejor para la fase de desarrollo en base a la tendencia general observada para altura de brote, porcentaje de enraizamiento y número y longitud de raíces, lo cual coincide con lo observado en *Eucalyptus tereticornis* (Subbaiah y Minocha 1990), en cacao (Dublin 1991), en *Acacia nilotica* (Dewan *et al.* 1992) y en *Quercus robur* (García-Martín *et al.* 2001).

A pesar de que se observó un efecto significativo y diferencia estadística entre las concentraciones de ANA para el número de raíces (Anexo 13 y 14), los valores obtenidos para ésta y las demás variables evaluadas, contrastan marcadamente con los valores registrados para el enraizamiento que se presentó en la fase de desarrollo. La poca respuesta de los explantes en esta fase, puede deberse tanto al tamaño de los brotes utilizados (1-2 cm), como a la formación excesiva de callo observada de manera general en los tratamientos y atribuida a la presencia de auxinas en el medio (Murthy y Saxena 1994), situación también observada en micropropagación de *Ulmus pumila* (Corchete *et al.* 1993) y en *Madhuca longifolia* (Sapotaceae) (Rout y Das 1993). Otra causa podría ser la condición de oscuridad en la cual se realizó el experimento y por la cual se observó clorosis y defoliación en los explantes, situación que, en algunos casos originó la muerte y de manera general debilitó a los explantes para subcultivar a la fase de expresión de raíces, pues si bien la oscuridad es esencial para inducir enraizamiento en varias especies leñosas, al evitar la degradación de las auxinas por la luz, también ocasiona un desequilibrio fisiológico en los explantes que vienen de un medio de luz continua, afectando negativamente la supervivencia en etapas posteriores (Von Arnold y Eerikson 1984). No obstante, en términos de enraizamiento normalmente se dice que la formación de callo es un prerrequisito de la diferenciación de primordios radicales (De Klerk *et al.* 1995).

La respuesta en número y longitud de raíces obtenida con las concentraciones altas de ANA y AIB, de forma individual o combinada, fue menor que con las concentraciones bajas, debido quizás a toxicidad dado que los brotes jóvenes se caracterizan por un alto contenido interno de auxinas que bien puede ser suficiente para inducir el enraizamiento tal y como ocurrió en la fase de desarrollo y que concuerda con resultados similares obtenidos en *Bixa orellana* (D´Souza y Sharon 2001), *Plumbago zeylanica* (Selvakumar *et al.* 2001) y en *Azadirachta indica* (Eeswara *et al.* 1997). Ya que se ha señalado que especies de un mismo género pueden responder igual a una misma citocinina, en el presente estudio se observó que el AIB a 1 mgl^{-1}, favoreció la inducción de raíz en brotes de *C. odorata*, al igual que lo hizo en *Melia azadirach* (Ahmad *et al.* 1990 en Eeswara *et al.* 1997).

Aunque se menciona que el cultivo de los brotes durante un día en oscuridad o con carbón activado favorece el enraizamiento, en el presente estudio se observó que el carbón activado no mejoró el enraizamiento y más bien tuvo un efecto perjudicial conforme se incrementó su concentración, hecho que puede atribuirse a que además de absorber exudados indeseables, el carbón activado también elimina algunos químicos esenciales del medio, como el hierro en forma compleja y el zinc (Lange 1989, Nissen y Sutter 1990), además de las vitaminas tiamina y ácido nicotínico (Dumas y Monteuuis 1995). Por otro lado, ninguna de las concentraciones de carbón activado evaluadas previno la formación de callo en la mayoría

de los explantes. La presencia de callo puede atribuirse a la toxicidad de las auxinas que favorecen su acción en la oscuridad proporcionada por el carbón activado (Dewan *et al.* 1992, Thakur *et al.* 1998).

La expresión de raíz se favoreció con las altas concentraciones de sacarosa, aspecto igualmente señalado en el enraizamiento de brotes de *Acacia albida* (Leguminosae), (Duhox y Davies (1992). El porcentaje de enraizamiento y el número de raíces por brote aumentaron conforme se aumentó la concentración de sacarosa, observándose el mayor efecto con 45 gl^{-1}, lo cual es lógico si se tiene presente que los carbohidratos sirven como fuente de energía y producen los esqueletos de carbono necesarios para la formación de tejidos y órganos vegetales nuevos (raíces en este caso), existiendo una correlación positiva entre el número de raíces producidas y el contenido de carbohidratos en el cultivo *in vitro* de algunas especies vegetales (Veierskov 1988).

En el presente estudio, el tipo de agente gelificante no influyó en el enraizamiento. El mínimo efecto observado se puede atribuir a que tanto el tipo de gelificante como su concentración pudieron haber afectado la disponibilidad de nutrientes (Singha *et al.* 1985, Podwyszynska y Olszewski 1995); o bien a los compuestos inorgánicos en el agar y la interacción tejido-medio-agar, que originaron clorósis y/ necrósis (Scholten y Pierik 1997). Con excepción del porcentaje de supervivencia, la menor respuesta observada en las demás variables con el Phytagel como gelificante, coinciden con lo observado en *Rosa híbrida*, *Cordyline fruticosa* y *Homalomena* (Podwyszynska y Olszewski 1995). A diferencia de lo anterior, Pasqualetto *et al.* (1988), encontró que el Phytagel favoreció la multiplicación y el enraizamiento de brotes de *Malus* sp. Por lo anterior y no obstante que el agar es el ingrediente activo más costoso en la elaboración del medio de cultivo, es recomendable seguir utilizándolo para la micropropagación de *C. odorata*.

La diferencia principal entre el enraizamiento obtenido en la fase de desarrollo y el obtenido en inducción y expresión de raíz, fue el origen de las raíces, siendo una organogénesis directa e indirecta (formación de callo), respectivamente. Con base en lo anterior, en la fase de desarrollo, sería factible evaluar el medio WPM a diferentes concentraciones, combinado con concentraciones de carbón activado para superar el tamaño de brotes (mediante la eliminación de residuos de citocininas) y mantener un enraizamiento adecuado (en porcentaje, número y longitud), que garantice la supervivencia durante la aclimatación.

La nula respuesta de los microbrotes a los tratamientos para el enraizamiento *ex vitro*, puede atribuirse al reducido tamaño de los mismos (1-2 cm) (Augustine y D'Souza 1997), pues se dice que los

brotes deben exceder de 1 cm si es *in vitro* y de 2 cm si el enraizamiento es *in vivo* (Welander 1993). Otra causa podría ser la toxicidad por las altas concentraciones de auxina utilizadas que pudieron haber pasado los niveles biológicos permisibles por los brotes como ocurrió en estacas de *Vochysia guatemalensis* (Vochysiaceae) (Mesén y Trejos 1997).

No obstante que las diferentes fases del proceso del cultivo *in vitro*, se realizaron de manera independiente, los resultados obtenidos permiten formar un esquema general de micropropagación de *C. odorata* a partir de explantes nodales obtenidos de semilla germinada *in vitro*. Asimismo, el número reducido de plantas obtenidas al desarrollar las fases del proceso de manera secuenciada, garantiza el éxito de la metodología y la disponibilidad de material vegetal, para evaluar su comportamiento en campo, con vistas a mantener su tolerancia al barrenador de las meliáceas (*H. grandella*), y sin duda apoyaría los esfuerzos que se están realizando para la conservación y el mejoramiento genético de la especie.

6. CONCLUSIONES

1. La benzilaminopurina (BAP) a niveles de 2,2 y 6,5 μM fue la mejor citocinina para favorecer la brotación de explantes nodales de *C. odorata*.

2. El medio para plantas leñosas WPM fue el mejor para promover el desarrollo de brotes de cedro con base en lo observado para altura de brote y porcentaje de supervivencia.

3. Una combinación del medio WPM al 50% y sacarosa a 30 gl^{-1}, además de favorecer el desarrollo de los brotes, favoreció su enraizamiento (porcentaje, número de raíces primarias y secundarias y longitud de raíz) *in vitro*.

4. Las auxinas ácido naftalenacético y ácido indolbutírico (ANA y AIB), a las dosis evaluadas favorecieron mínimamente el enraizamiento *in vitro* y no tuvieron efecto sobre el enraizamiento *ex vitro* en los brotes de *C. odorata*.

5. El carbón activado no favoreció el enraizamiento *in vitro* en los brotes de *C. odorata*, y más bien tuvo un efecto negativo a las concentraciones de 2 y 3 gl^{-1}.

6. El tipo de gelificante no influyó marcadamente en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *C. odorata*, pero se observó una mejor respuesta en los medios solidificados con agar.

7. RECOMENDACIONES

Para afinar las diferentes fases de micropropagación de *C. odorata*, y obtener un proceso que garantice un alto número de plantas para estudiar en campo, se recomienda lo siguiente:

1. Evaluar diferentes tratamientos de desinfección para la semilla, que permitan obtener material vegetal suficiente para la obtención de explantes.

2. Estudiar la respuesta de diferentes procedencias de semilla en las distintas fases del proceso de micropropagación, desde germinación hasta aclimatación, y su posterior comportamiento en campo, en relación con la tolerancia a *H. grandella*.

3. Evaluar diferentes condiciones de cultivo (químicas y físicas) en la fase de desarrollo a fin de incrementar el tamaño de brotes obtenidos, que permita el enraizamiento y la aclimatación.

4. Evaluar el medio WPM como inductor de enraizamiento, durante la fase de desarrollo.

5. Evaluar dosis más bajas de auxinas, así como tamaño de brotes obtenidos *in vitro*, durante el enraizamiento *ex vitro*.

6. Continuar utilizando el agar como agente gelificante, para el cultivo *in vitro* de *C. odorata*.

7. Estudiar las diferentes condiciones de aclimatación (sustrato, humedad, luz y temperatura) que permitan una alta supervivecia de plantas para su transferencia al campo.

8. LITERATURA CITADA

Abdullah, AA; Grace, J; Yeoman, MM. 1989. Rooting and establishment of Calabrian pine plantlets propagated *in vitro*: influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. New Phytology 113:193-202.

Acosta, SM. 1970. El cedro centroamericano en el Ecuador (*Cedrela mexicana* Roemer). Instituto de Ciencias Naturales. Quito, Ecuador. 16 p.

Aeschbacher, RA; Schiefelbein, JW; Benfey, P. 1994. The genetic and molecular basis of root development. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology 45:25-45.

Ahuja, MR. 1993. Regeneration and germplasm preservation in aspen-*Populus*. *In* Ahuja, MR. (ed.) Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 187-194.

Albert, PD; López, AA; Rodríguez, TM; Duarte, RM. 1995. Recursos fitogenéticos forestales, I. Familia *Meliaceae*. Fontqueria 42:329-351.

Alvarez, M. 1999. Caracterización de frutos y semillas de *Cedrela odorata* L., *Tabebuia rosea*, *Alnus acuminata* y *Cupressus lusitanica*. *In* Simposio sobre avances en la producción de semillas forestales en América Latina (2º: Santo Domingo, República Dominicana). Memorias/Coordinador, Rodolfo Salazar. Turrialba, Costa Rica. p. 145-150.

Arrillaga, I; Marzo, T; Segura, J. 1991. Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27:341-348.

Augustine, AC; D'Souza, L. 1997. Micropropagation of an endangered forest tree – *Zanthoxylum rhetsa* Roxb. Phytomorphology 47(3):319-323.

Awang, K; Shukor, NAA. 1998. Domestication of *Azadirachta excelsa*: some aspects of propagation and cultivation. Domestication of Agroforestry Trees in Southeast Asia p. 196-203.

Badilla, MMV; Hidalgo, DN; Guevara, BE; Murill, GO. 1992. Cultivo *in vitro* de plántulas de jaúl (*Alnus acuminata*). Tecnología en Marcha 11(3):3-9.

Badji, S; Mairone, Y; Ndiaye, I; Merlin, G; Danthu, P; Neville, P; Colonna, JP. 1993. *In vitro* propagation of the gum Arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Willd.) 1. Developing a rapid method for producing plants. Plant Cell Reports 12:629-633.

UCA - CIDIA

Banko, TJ; Stefani, MA. 1989. *In vitro* propagation of *Oxidendrum arboreum* from mature trees. HortScience 24(4):683-685.

Bennett, IJ; McComb, JA; Tonkin, CM; McDavid, DAJ. 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucaliptus globules* Labill. Annals of Botany 74:53-58.

Berrios, A; Sandoval, FJ; Müller, LE. 1991. Propagación clonal *in vitro* de diferentes especies de poró. Turrialba. 41(4):607-614.

Biondi, S; Canciani, L; Bagni, N. 1984. Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured *in vitro*. Canadian Journal of Botany 62:2385-2390.

Blazich, FA. 1988. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. *In* Adventitious root formation in cuttings. Davis, TD; Hassig, BE; Sankhla, N (eds.). Portland, Oregon, U.S.A. Dioscorides Press. p. 132-149.

Blakesley, D; Constantine, D. 1992. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of a range of species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28:183-186.

Bonga, JM. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. *In* Bonga, JM; Durzan, DJ. (eds.). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff/Dr. W. Jumk Publishers. p. 387-412.

_____. 1987. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. *In* Bonga, JM; Durzan, DJ. (eds.). Cell and Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff/Dr. W. Jumk Publishers. p. 249-271.

_____; Von Aderkas, P. 1992. *In vitro* culture of trees. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. Forestry Sciences No. 38. 236 p.

Castro, D. 2001. Micropropagación de *Cedrela odorata* L. (Correo electrónico). Universidad de Colombia, CO.

Chaplin, GE. 1980. Progress with provenance exploration and seed collection of *Cedrela* spp. *In* Proceedings, Commonwealth Forestry Conference, Port of Spain, Trinidad, September . 17 p.

Cheliak, WM; Rogers, DL. 1990. integrating biotechnology into tree improvement programs. Canadian Journal of Forestry Research 20:452-463.

Chesick, EE; Mohn, CA; Hackett, WP. 1991. Plantlet multiplication from white pine (*Pinus strobes* L.) embryos *in vitro*: bud induction and rooting. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26:107-114.

BIBLIOTECA

Coleman, GD; Ernst, SG. 1989. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype. Plant Cell Reports 8:459-462.

Combe, J; Nico, JG. 1979. Guía de campo de los ensayos forestales del CATIE en Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza, Programa de Recursos Naturales Renovables, Turrialba, Costa Rica. p. 308-324.

Corchete, MP; Diez, JJ; Valle, T. 1993. Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees. Plant Cell Reports 1993. 12:534-536.

Cornelius, J. 1995. La biotecnología y los recursos genéticos forestales. *In* CATIE-FAO-IPGRI. Curso Internacional "La biotecnología y los recursos fitogenéticos". Abril 24 – Mayo 05.

Das, PK; Chakravarti, V; Maity, S. 1993. Plantlet formation in tissue culture from cotyledon of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. Indian Journal Forester 16:189-192.

Davis, TD; Potter, JR. 1987. Physiological response of *Rhododendron* cuttings to different light levels during rooting. Journal American Society Horticultural Sciences 112:256-259.

De Fossard, RA. 2000. Notes on tissue culture. (En línea). Consultado: 08 ago. 2000. Disponible en http://www.onthenet.com.au/~rfossard/Culture.html

De Klerk, GJ; Van Der Krieken, W; De Jong, JC. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant 35:189-199.

Detrez, C; Ndiaye, S; Dreyfus, B. 1994. *In vitro* regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants. Plant Cell Reports 14:87-93.

Dewan, A; Nanda, K; Gupta, SC. 1992. *In vitro* micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brenan *via* cotyledonary nodes. Plant Cell Reports 12:18-21.

Donnelly, DJ; Tisdall, L. 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In Ahuja, MR. Micropropagation of wood plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 153-166.

Dourojeanni, M. 1963. El barreno de los brotes (*Hypsipyla grandella*) en cedro y caoba. Agronomía (Perú) 30(1):35-43.

Driver, JA; Suttle, GRL. 1987. Nursery handling of propagules. *In* JM, Bonga; DJ, Durzan. (eds.). Cell and tissue culture in forestry. Vol. 2. Specific principles and methods: growth and developments. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 320-335.

Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. *In* Roca, WM; Mroginski, LA. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 576-619.

Duhox, E; Davies, D. 1985. Shoot production from cotyledonary buds of *Acacia albida* and influence of sucrose on rhizogenesis. Journal Plant Physiology 121:175-180.

Dumas, E; Monteuuis, O. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40:231-235.

D'Souza, MC; Sharon, M. 2001. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:168-172.

Eeswara, JP; Stuchbury, T; Allan, EJ. 1997. A standard procedure for the micropropagation of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). Plant Cell Reports 17(3):215-219.

Escalant, JV. 1995. Embriogénesis somática y suspensiones de células. *In* CATIE-FAO-IPGRI. Curso Internacional "La biotecnología y los recursos fitogenéticos". Abril 24 – Mayo 05.

Espinosa, OG; Engleman, EM. 1995. Breve recopilación de anatomía de semillas (notas de curso). Colegio de Posgraduados. Montecillo Estado de México. México. 44 p.

Etienne, H; Solano, W; Pereira, A; Bertrand, B; Berthouly, M. 1997. Protocole d'acclimatation de plantules de caféiers produites *in vitro*. Plantations , recherche, development. Septembre – Octobre. 304-311

Flores, VME. 1994. La planta. 2da. Ed. Editorial Tecnológica de Costa Rica. p. 231-262.

FUNDECOR. 2001. Arboles del Trópico Húmedo: usos y características físico mecánicas de la madera. (En línea). Consultado 30 oct. 2001. http://www.fundecor.or.cr/ES/bd_maderas/busqueda-U.phtml

García-Martín, G; González-Benito, ME; Manzanera, JA. 2001. *Quercus suber* L. somatic embryo germination and plant conversion: pretreatments and germination conditions. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:190-198.

Gaspar, T; Coumans, M. 1987. Root formation. *In* JM, Bonga; DJ, Durzan. (eds.). Cell and tissue culture in forestry. Vol. 2. Specific principles and methods: growth and developments. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 202-217.

Goh, DKS; Galiana, A. 1998. Vegetative propagation of teak. JIRCAS Working Report No. 16. 35-44.

Green, JF; Muir, RM. 1979. An analysis of the role of potassium in the growth effects of cytokinin, light and abscisic acid on cotyledon expansion. Physiologia Plantarum 46:19-24.

Grijpma, P. 1976. Resistance of Meliaceae against the shoot borer *Hypsipyla*, with particular reference to *Toona ciliata* M.J. Roem. var. australis (F.V. Muell.) C. DC. *In* Whitmore, JD. (ed.). Studies on the shoot borer *Hypipyla grandella* (Séller). Lep., Pyralidae. Sán José, Costa Rica. IICA Miscellaneus Publication. No. 101. v. 3. p. 90-96.

Guevara, GM. 1988. Experiencias colombianas con cedro (*Cedrela odorata* L.). Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal (CONIF). Serie Documentación No. 12. Bogotá, Colombia. 86 p.

Guevara, BE; Hidalgo, DN; Murillo, GO. 1992. Cultivo *in vitro* de cedro dulce (*Cedrela tonduzii*). Tecnología en Marcha 11(3):10-16.

Gupta, PK; Mehta, UJ; Mascarenhas, AF. 1983. A tissue culture method for rapid propagation of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. torelliana* from mature trees. Plant Cell Reports 2:296-299.

Hammatt, N; Ridout, MS. 1992. Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13:67-74.

Hartmann, HT; Kester, DE; Davies, FT. 1990. Plant propagation: Principles and practices. 5 ed. Englewood Cliffs. Prentice Hall. New Jersey. 647 p.

Holdridge, LR. 1973. Ecología de las *Meliáceas* latinoamericanas. *In* Symposium on Integrated Control of *Hypsipyla*. Turrialba, Costa Rica.

Hutzell, MJ; Durzan, DJ. 1993. Improved aseptic germination and controlled growth for micropropagation of Douglas fir. *In* Ahuja, MR. (ed.) Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 367-372.

Incoll, LD; Jewer, PC. 1987. Cytokinins and the water relations of whole plant. Brit Plant Growth Regul Group. Monograph 14. p. 85-97.

Islam, R; Zaman, A; Joarder, OI; Barman, AC. 1993. *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33-339-341.

Jaroensanti, J; Panijpan, B. 1981. Effects of hypochlorite on thiamine and its derivatives. Experientia 37:1248-1250.

Jiménez, MQ. 1999. Arboles maderables de Costa Rica en peligro de extinción. 2 ed. INCAFO, San José, C.R. p. 125-134.

Kaur, K; Verma, B; Kant, U. 1998. Plants obtained from the Khair tree (*Acacia catechu* Willd.) using mature nodal segments. Plant Cell Reports 17(5):427-429.

Kim, MK; Sommer, HE; Bongarten, BC; Merckle, SA. 1997. High frequency induction of adventitious shoots from hypocotyls segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. Plant Cell Reports 16(8):536-540.

Kirdmanee, C. 1996. Rapid acclimatization of *in vitro* eucalyptus plantlets by controlling relative humidity *ex vitro*. Acta Horticulturae 440:616-621.

Kozai, T; Koyama, Y; Watanabe, I. 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free médium under high photosynthetic phoyon flux. Acta Horticulturae 230:121-127.

Kunneman, BPAM; Faaij-Groenen, GPM. 1988. Elimination of bacterial contaminants: a matter of detection and transplanting procedures. Acta Horticulturae 225:183-188.

Lange, JHde. 1989. Significance of autoclaving-induced toxicity from hydrolysis of carbohydrates in in vitro studies of pollen germination and tube growth. South African Journal botany 55:1-5.

Lardet, L; Aguilar, ME; Michaux-Ferriere, N; Berthouly, M. 1998. Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured *in vitro*. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 34:34-40.

Leakey, RRB; Mesén, F. 1994. Métodos de propagación vegetativa en árboles tropicales: enraizamiento de estacas suculentas. *In* Mejoramiento genético forestal con referencia especial a América Central. Cornelius, JP; Mesén, JF; Corea, EA. (eds.) CATIE, Turrialba, C.R. p. 147-167.

Le Roux, JJ; Van Staden, J. 1991. Micropropagation of *Eucalyptus* species. HortScience 26(2):199-200.

Liew, TK; Teo, KH. 1998. Multiple shoot production *in vitro* of the tropical timber tree, Sentang (*Azadirachta excelsa* Linn.). HortScience 33(6):1073-1075.

_____; Chan, LK; Teo, KH. 1999. *In vitro* rooting of sentang (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. –Plant 35:396-400.

Lineberger RD. 2000a. Care and handling of micropropagated plants. (En línea). Consultado 08 ago. 2000. Disponible en: http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/microprop/micropro.html

_____. 2000b. Tissue culture of woody plants. (En línea). Consultado 08 ago. 2000. Disponible en: http://aggie-horticulture. tamu.edu/tisscult/microprop/woodypl.html

Lloyd, G; McCown, B. 1980. Comercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.

López, J; Jara, LF; Mesén, F. 1997. Variación en resistencia de *Cedrela odorata* al ataque de *Hypsipyla grandella*. Revista Forestal Centroamericana 19(6):20-25.

Lowe, A. 1999. Distribution of genetic diversity in tree species from the neotropics based on DNA fingerprint assays: Implications for conservation, sustainable utilization and management. European Commission DGX11: INCO-DC Living resources, International role. 5 p.

Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Madrid. Mundi Prensa, 232 p.

Martorell, LF. 1943. Forests and forest entomology. Caribbean Forester (Puerto Rico) 4(3):132-134.

Mascareñas, AF; Kendurkar, SV; Khuspe, SS. 1993. Micropropagation of teak. *In* Ahuja, MR (Ed.). Micropropagation of woody plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 247-258.

McCown, BH. 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. *In* Davis, TM; Haissig, BE; Sankhla, N. (eds.). Adventitious root formation in cuttings. Dioscorides Press, Portland. U.S.A. p. 289-302.

Mesén, F; Newton, AC; Leakey, RRB. 1997. The effects of propagation environment and foliar area on the rooting physiology of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken cuttings. Trees 11:404-411.

_____; Trejos, E. 1997. Propagación vegetativa del San Juan (Vochysia guatemalensis Donn.Smith) mediante enraizamiento de estacas juveniles. Revista Forestal Centroamericana No. 21:19-24.

_____. 1998. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de sub-irrigación. CATIE. PROSEFOR. Serie Técnica. Manual Técnico No. 30. 36 p.

Mihaljevic, S; Stipkoviv, S; Sibila, J. 1996. Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria. Plant Cell Reports 15:610-614.

Minocha, SC. 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. *In* Bonga, JM; Durzan, DJ. (eds.). Cell and tissue culture in forestry. Vol. 1. General principles and biotechnology. Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. p. 50-66.

Mittal, A; Agarwal, R, Gupta, SC. 1989. *In vitro* development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* – a leguminous tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19:65-70.

Mohammed, GH; Patel, KR. 1989. Tissue culture micropropagation of Douglas-fir. New Forests 3:125.139.

Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:53-58.

Murthy, BNS; Saxena, PK. 1994. Somatic embryogenesis in peanut (*Arachys hypogaea* L.): stimulation of direct differentiation of somatic embryogenesis by forchlorfenuron (CPPU). Plant Cell Reports 14:145-150.

Navarro, C; Vásquez W. 1986. Variabilidad genética en semillas y plántulas de *Cedrela odorata* L. CATIE. Departamento de Recursos Naturales Renovables. Turrialba, Costa Rica. 12 p.

_____. 2000. Mejoramiento genético de meliáceas. (Comunicación personal). CATIE. Turrialba, Costa, Rica.

Newton, AC; Baker, P; Ramnarine, S; Mesén, JF; Leakey, RRB. 1993. The mahogany shoot borer: prospects for control. Forest Ecology and Management 57:301-328.

_____; Cornelius, JP; Mesén, JF; Corea, EA; Watt, AD. 1998. Variation in attack by the mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (*Lepidoptera: Pyralidae*), in relation to host growth and phenology. Bulletin of Entomological Research 88: 319-326.

_____; Watt, AD; López, F; Cornelius, JF; Mesen, JF; Corea, EA. 1999. Genetic variation in host susceptibility to attack by the mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Zeller). Agricultural and Forest Entomology 1(1):11-18.

Nissen, SJ; Sutter, EG. 1990. Stability of AIA and AIB in nutrient medium to several tissue culture procedures. HortScience 25(7):800-802.

Normanly, J. 1997. Auxin metabolism. Physiologia Plantarum 100:431-442.

Orellana, NMA. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King). Tesis (Mag. Sc.). CATIE. Turrialba, Costa Rica. 94 p.

_____; Vásquez, N; Cote, F; Aguilar, ME. 2000. Micropropagation of mahogany (*Swietenia macrophylla* King.) from seedling nodal segments. En proceso.

Ostry, ME; Michler, CH. 1993. Use of biotechnology for tree improvement in *Populus* model systems. *In* Ahuja, MR. (ed.). Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 471-483.

Pasqualetto, PL; Zimmerman, RH; Fordham, I. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14:31-40.

Patiño, VF. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotrópicos: Propuestas para acciones coordinadas. Dirección de Recursos Forestales. Departamento de Montes. FAO, Roma-Italia. 58 p.

Peña, A; Montalvo, JM. 1986. Condiciones ambientales para pruebas de germinación en cinco especies forestales. Revista Forestal Baracoa 16(1):7-20.

Perez-Parron, MA; Gonzalez–Benito, ME; Perez, C. 1994. Micropropagation of *Frazinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. Plant Cell, Tissue and organ Culture 37:297-302.

Pinto, PJEB; Arello, EF; Pinto, PCAB; Barbosa, PMH. 1994. Uso de diferentes explantes e concentracoes de benzilaminopurina na multiplicacao *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia 29(6):867-873.

_____; Arello, EF; Barbosa, PMH. 1995. Efeito do pH, de concentracoes de sais e de agra no enraizamento *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. Guttiferae. Revista Ceres 42(242):331-343.

Philips, S; Dewan, A; Nanda, K; Gupta, SC. 1998. Optimization of *in vitro* seed germination and seedling growth of *Acacia* species. Forest, Farm and Community Tree Research Reports 3:26-28.

Podwyszynska, M; Olszewski, T. 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordelyne and homalomena. Scientia Horticulturae 64:77-84.

Puddephat, IJ; Alderson, PG; Wright, NA. 1997. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. Journal of Experimental Botany 48(309):951-962.

Purohit, SD; Tak, K. 1992. *In vitro* propagation of an adult tree *Feronia limonia* (L.) through axillary branching. Indian Journal Experimental Biology 30:377-379.

Quraishi, A; Koche, V; Mishra, SK. 1997. Micropropagation of *Lagerstroemia parviflora* through axillary bud culture. Silvae Genetica 46(4):242-245.

_____; Mishra, SK. 1997. Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*.

Raha, S; Roy, SC. 2001. *In vitro* plant regeneration in *Holarrhena antidysenterica* Wall., through high frequency axillary shoot proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:232-236.

Rodríguez, JdeM. 1980. Contribucao ao estudo do cedro –*Cedrela fissilis* Vell. Instituto de Pesquisas de Rec. Naturais Renováreis "AP". Porto Alegre, Brasil. p. 3.

Rosero, P. 1976. Zonificación y silvicultura de *Meliaceas*. *In* Whitmore, JL. (ed.) Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* Séller Lep. *Pyralidae*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Miscellaneus Publication 1. 3:21-35

Rout, GR; Das, P. 1993. Micropropagation of *Madhuca longifolia* (Koenig) MacBride var. latifolia Roxb. Plant Cell Reports 12:513-516.

Roy, PK; Rahman, M; Roy, SK. 1996. Mass propagation of *Zysygium cuminii* from selected elite trees. Acta Horticulturae 429:489-495.

Rugini, E; Jacoboni, A; Luppino, M. 1993. Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. Scientia Horticulturae 53:63-72.

Sansberro, S; Rey, H; Mroginski, L; Collavino, M. 1999. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (*Aquifoliaceae*). *In Vitro* Cell. Dev. Biol. –Plant 35:401-402.

SAS Institute Inc. 1999. SAS for windows. Version 8 edition. Cary, NC. U.S.A.

Schiefelbein, JW; Benfey, PN. 1991. The development of plant roots: new approaches to underground problems. The Plant Cell 3:1147-1154.

Scholten, HJ; Pierik RLM. 1997. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. Plant Cell Reports 17(3):230-235.

Selvakumar, V; Anbudural, PR; Balakumar, T. 2001. *In vitro* propagation of the medicinal plant *Plumbago zeylanica* L. through nodal explants. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:280-284.

Shibata, W; Murai, F; Akiyama, T; Siriphol, M; Matsunaga, E; Morimoto, H. 1996. Micropropagation of *Croton sublyratus* Kurz – a tropical tree of medicinal importance. Plant Cell Reports 16(3-4):147-152.

Singha, S; Townsend, EC; Oberly, GH. 1985. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars. Journal American Society Horticultural Sciences 110:407-411.

Smith, CE. 1960. A revision of *Cedrela* (*Meliaceae*). Fieldiana Botany 29(5): 295-341.

Sol, SA; Jasso, MJ; Pérez, FJ. 1998. Selección en cedro (*Cedrela odorata* L.) con fines comerciales: I. Caracterización de árboles y frutos de tres poblaciones naturales en el estado de Tabasco. *In* Memoria XVII Congreso Nacional de Fitogenética. Acapulco, Guerrero. México. p. 48.

Standardi, A; Romani, F. 1990. Effects of some antioxidants on *in vitro* rooting of apple shoots. HortScience 25(11):1435-1436.

Subbaiah, MM; Minocham SC. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Reports 9:370-373.

Taiz, L; Zeiger, E. 1998. Plant physiology. 2 edition. Sinauer Associates, Publishers. Massachusetts. p. 317-320.

Thakur, R; Rao, PS; Bapat, VA. 1998. *In vitro* plant regeneration in *Melia azedarach*. Plant Cell Reports 18:127-131.

Tiburcio, AF; Gendy, CA; Tran Thanh Van, K. 1989. Morphogenesis in tobacco subepidermmal cells: putrescine as marker of root differentiation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19:45-54.

Trujillo, R; Escalona, M; Daquinta, M; Borroto, CG; Cobo, I. 1994. Cultivo *in vitro* de tres clones de *Ficus benjamina*. Centro agrícola 21(2):82-87.

Valverde, CL; Dufour, M; Villalobos, VM. 1998. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). Revista de Biologia Tropical 46(2):225-228.

Vásquez, N. 2000. Histología de semilla de *Cedrela odorata*. Prácticas del curso de Morfología Vegetal. (Comunicación personal). Laboratorio de Citología. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Veierskov, B. 1988. Relation between carbohydrates and adventitious root formation. In Davis, TD; Haissig, BE; Sankhla, N. Adventitious root formation in cuttings. Advances in Plant Sciences Series. Vol. 2. Dioscorides Press. Portland, Oregon. p. 70-78.

Von Adernold, S; Erikson, T. 1984. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* L. Karst. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3:257-264.

Villalobos, VM; Torpe, TA. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In* Roca, WM; Mroginski LA. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 127-141.

Welander, M. 1993. Micropropagation of birch. *In* Ahuja, MR. (ed.) Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 223-246.

Whitmore, JL. 1971. *Cedrela* provenance trial in Puerto Rico and St. Croix; nursery phase assessment. Turrialba 21(3):343-349.

Yamasaky, S; Taketani, A; Fujita, K; Vásquez, C; Ikeda, T. 1990. Ecology of *Hypsipyla grandella* and its seasonal changes in population density in Peruvian amazon forest. JARQ (Japan). 24(2):149-155.

ANEXOS

Anexo 1. Composición química (mgl^{-1}) de los medios de cultivo básicos, empleados en las diferentes etapas de la micropropagación de cedro.

Sales	MS (1962)	WPM (1980)
Macroelementos		
NH_4NO_3	1650	400
KNO_3	900	-
Ca_4Cl_2	-	-
$CaCl_2.2H_2O$	440	96
$Ca(NO_3)_2$	-	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	556
$MgSO_4$	-	-
$MgSO_4.7H_2O$	370	370
KH_2PO_4	170	170
$FeSO_4.7H_2O$	37,3	27,8
Microelementos		
KI	0,83	-
H_3BO_3	6,2	6,2
$MnSO_4.H_2O$	-	22,3
$MnSO_4.4H_2O$	22,3	-
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6	8,6
$CuSO_4.5H_2O$	0,025	250*
$Na_2MoO_42H_2O$	0,25	250*
$CoCl_2.6H_2O$	0,025	-
$Na_2MEDTA.2H_2O$	37,3	37,3
Gelificantes		
Agar	0,7%	
Phytagel	0,2%	

*µM

Anexo 2. Efecto de diferentes citocininas y concentraciones sobre porcentaje de brotación, número promedio de brotes por explante y altura de brotes en tres ensayos (E1, E2, E3) de multiplicación de cedro.

		Porcentaje de brotación (*pb*)		Número promedio de brotes por explante (*nb*)			Altura de brotes (*ab*) (mm)		
Tratamiento	(µM)	E 2	E 3	E 1	E 2	E 3	E 1	E 2	E 3
BAP									
1	2,2	33,3 a	91,5 a	5,5 a	0,5 b	1,9 a	2,7 a	0,3 a	1,2 a
2	6,5	100 a	83,0 ab	1,7 bc	2,5 a	1,6 ab	3,0 a	1,0 a	1,0 ab
3	13,3	66,7 a	58,2 abc	2,2 b	1,0 ab	1,3 abc	1,7 abcd	0,7 a	0,7 ab
4	20,0	66,7 a	24,7 c	2,7 b	1,7 ab	0,4 cd	1,0 abcd	0,7 a	0,2 b
Kinetina									
5	2,2	33,3 a	41,2 abc	0,3 cd	0,3 b	1,1 abcd	0,3 cd	0,5 a	0,7 ab
6	6,5	50,0 a	33,0 c	0,2 cd	1,0 ab	0,4 cd	0,7 bcd	0,7 a	0,7 ab
7	13,3	33,3 a	41,2 bc	0,3 cd	0,3 bc	0,6 cd	1,0 abcd	1,0 a	0,7 ab
8	20,0	16,7 a	58,0 abc	1,2 bcd	0,2 b	0,7 bcd	2,0 abc	0,3 a	1,0 ab
2-iP									
9	2,2	50,0 a	41,2 bc	0,7 bcd	0,5 b	0,4 cd	1,0 abcd	0,7 a	0,7 ab
10	6,5	33,3 a	41,2 bc	0,0 d	0,8 b	0,7 bcd	0,0 d	0,7 a	0,7 ab
11	13,3	50,0 a	24,7 c	2,2 b	0,5 b	0,3 d	2,3 ab	0,7 a	0,5 ab
12	20,0	50,0 a	24,7 c	1,5 bc	1,0 ab	0,2 d	1,7 abcd	0,7 a	0,7 ab

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas con base en la prueba de Duncan al 0,05.

Anexo 3. Análisis de varianza para las diferentes variables evaluadas en la etapa de multiplicación *in vitro* de cedro.

Variable	Factor de variación	gl	Cuadrado Medio	Valor de F	Pr > F
Días a brotación	Tratamiento	11	11,1363636	1,36	0,2139
% de brotación	Tratamiento	11	0,33761918	1,72	0,0907
Número de brotes	Tratamiento	11	0,10456493	1,41	0,1932
Altura de brote	Tratamiento	11	0,08391569	1,15	0,3373
% de sobrevivencia	Tratamiento	11	0,95677827	2,41	0,0150

Anexo 4. Efecto de la benzilaminopurina (BAP) en la brotación de explantes nodales de cedro.

Tratamiento	µM		Porcentaje de brotación	Porcentaje de sobrevivencia	No. de brotes por explante	Altura de brotes (cm)
1	2,2		100 ab	100 ab	4,06 ab	0,7 a
2	6,5		79,8 a	93,2 a	3,06 a	0,7 ab
3	13,3		93,2 b	93,2 b	3,93 b	0,5 b
4	20,0		86,4 b	93,2 a	2,53 ab	0,4 ab

Medias seguidas por letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Duncan 0,05).

Anexo 5. Análisis de varianza para las variables evaluadas en la etapa de desarrollo *in vitro* de cedro.

Altura de brote

Factor de variación	gl	Cuadrado Medio	Valor de F	Pr > F
Medio	1	9,98271489	1062,19	<0,0001
Concentración de medio	3	0,01315703	1,40	0,2489
Concentración de azúcar	3	0,00939891	1,00	0,3973
Interacción	24	0,01506270	1,60	0,0616

Porcentaje de supervivencia

Factor de variación	gl	Cuadrado Medio	Valor de F	Pr > F
Medio	1	0,55364213	4,51	0,0369
Concentración de medio	3	0,02742617	0,22	0,8800
Concentración de azúcar	3	0,02872353	0,23	0,8726
Interacción	24	0,07331789	0,60	0,9231

Anexo 6. Valores promedio para las variables y factores evaluados en la etapa de desarrollo de brotes de cedro.

Variable	Medio		Concentración de medio (%)		Concentración de azúcar (gl^{-1})	
Altura de brote (cm)	MS	0,54688 b	100	1,17143 a	10	1,27964 a
	WPM	2,13875 a	75	1,19500 a	20	1,16679 a
			50	1,28214 a	30	1,22214 a
			25	1,26786 a	40	1,24786 a
Porcentaje de sobrevivencia	MS	91,134 b	100	92,857 a	10	96,429 a
	WPM	100 a	75	92,857 a	20	91,643 a
			50	96,429 a	30	96,429 a
			25	97,593 a	40	95,236 a

Medias con letras iguales en cada factor y variable no son estadisticamente diferentes (Duncan 0,05).

Anexo 7. Interacción entre medio-concentración de medio-concentración de azúcar en altura de brote.

Tratamiento	Medio de cultivo	Concentración de medio (%)	Concentración de azúcar (gl^{-1})	Altura de brote (cm)
1	MS	100	10	0,65 def
2	MS	100	20	0,72 de
3	MS	100	30	0,40 ef
4	MS	100	40	0,42 ef
5	MS	75	10	0,37 f
6	MS	75	20	0,42 ef
7	MS	75	30	0,57 def
8	MS	75	40	0,52 def
9	MS	50	10	0,65 def
10	MS	50	20	0,42 ef
11	MS	50	30	0,60 deff
12	MS	50	40	0,82 d
13	MS	25	10	0,52 def
14	MS	25	20	0,50 def
15	MS	25	30	0,55 def
16	MS	25	40	0,57 def
17	WMP	100	10	2,06 abc
18	WMP	100	20	1,94 bc
19	WMP	100	30	1,78 c
20	WMP	100	40	2,21 abc
21	WMP	75	10	2,36 abc
22	WMP	75	20	1,88 c
23	WMP	75	30	2,10 abc
24	WMP	75	40	2,26 abc
25	WMP	50	10	1,99 abc
26	WMP	50	20	2,15 abc
27	WMP	50	30	2,46 ab
28	WMP	50	40	2,02 abc
29	WMP	25	10	2,58 a
30	WMP	25	20	2,14 abc
31	WMP	25	30	2,21 abc
32	WMP	25	40	2,02 abc

Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes en base a la prueba de Duncan al 0,05.

Anexo 8. Valores promedio, para los tratamientos con WPM, en las diferentes variables evaluadas en la fase de desarrollo de cedro.

Tratamiento	Altura de brote (cm)	% de enraizamiento	No. de raíces por explante	Longitud de raíz (cm)	No. de raíces secundarias
17	2,13 abc	55,63 ab	1,54 ab	4,83 ab	0,00 b
18	1,94 abc	66,63 ab	1,65 ab	6,50 ab	1,33 ab
19	1,79 c	66,67 ab	2,33 ab	4,83 ab	2,20 ab
20	2,21 abc	77,77 ab	2,67 ab	11,83 a	1,63 ab
21	2,36 abc	88,87 ab	1,55 ab	3,67 ab	0,22 b
22	1,89 bc	66,63 ab	2,22 ab	3,50 ab	0,67 ab
23	2,11 abc	77,77 ab	2,99 ab	6,00 ab	0,44 ab
24	2,26 abc	66,63 ab	1,89 ab	6,67 ab	2,10 ab
25	2,00 abc	88,87 ab	2,44 ab	4,00 ab	0,11 b
26	2,15 abc	66,63 ab	1,66 ab	6,00 ab	2,87 ab
27	2,46 ab	88,87 ab	3,89 a	8,27 a	0,00 b
28	2,02 abc	66,63 ab	2,55 ab	7,17 ab	6,43 a
29	2,59 a	55,53 ab	1,44 ab	4,33 ab	0,87 ab
30	2,14 abc	100,00 a	2,44 ab	9,30 a	4,30 ab
31	2,22 abc	22,20 b	0,22 b	0,83 b	0,33 b
32	2,02 abc	77,67 ab	2,67 ab	7,17 a	0,00 b

Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes (Duncan al 0,05).

Anexo 9. Valores promedio, para los niveles de medio WPM y de azúcar, en las diferentes variables evaluadas en la fase de desarrollo de cedro.

Factor	Nivel	Altura de brote (cm)	Porcentaje de enraizamiento	No. de raíces por explante	Longitud de raíz (cm)	No. de raíces secundarias
Medio %						
	100	2,00 a	66,65 a	2,05 a	7,00 a	1,29 a
	75	2,15 a	74,98 a	2,16 a	4,95 a	0,86 a
	50	2,15 a	77,75 a	2,63 a	6,36 a	2,35 a
	25	2,07 a	63,88 a	1,69 a	5,40 a	1,37 a
Azúcar gl^{-1}						
	10	2,25 a	72,20 a	1,74 a	4,20 b	0,29 a
	20	2,03 a	74,98 a	1,99 a	6,32 ab	2,29 a
	30	2,14 a	63,88 a	2,35 a	4,98 b	0,74 a
	40	2,12 a	72,20 a	2,44 a	8,20 a	2,54 a

Valores seguidos por letras iguales en la misma columna y para cada factor, no son estadísticamente diferentes (Duncan 0,05)

Anexo 10. Prueba de medias de cuadrados mínimos (LSMEANS) para la interacción entre concentración de medio WPM y concentración de azùcar, evaluada en la fase de desarrollo de brotes de cedro.

Medio de cultivo (%)	Azúcar (gl^{-1})	Altura de brote (cm)	% de enraizamiento	No. de raíces	Longitud de raíz (cm)	No. de raíces secundarias	Número de LSMEAN
100	10	2,13	55,63	1,54	4,83	0,00	17
100	20	1,94	66,63	1,65	6,50	1,33	18
100	30	1,79	66,67	2,33	4,83	2,20	19
100	40	2,21	77,77	2,67	11,83	1,63	20
75	10	2,36	88,87	1,55	3,67	0,22	21
75	20	1,89	66,63	2,22	3,50	0,67	22
75	30	2,11	77,77	2,99	6,00	0,44	23
75	40	2,26	66,63	1,89	6,67	2,10	24
50	10	2,00	88,87	2,44	4,00	0,11	25
50	20	2,15	66,63	1,66	6,00	2,87	26
50	30	2,46	88,87	3,89	8,27	0,00	27
50	40	2,02	66,63	2,55	7,17	6,43	28
25	10	2,59	55,53	1,44	4,33	0,87	29
25	20	2,14	100,00	2,44	9,30	4,30	30
25	30	2,22	22,20	0,22	0,83	0,33	31
25	40	2,02	77,67	2,67	7,17	0,00	32

Altura de brote Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	17	18	19	20	21	22	23	24
27	0,1454	0,0568	0,0145	0,3457	0,6943	0,0336	0,1881	0,4694
29	0,0690	0,0243	0,0055	0,1877	0,4378	0,0137	0,0925	0,2705

i/j	25	26	27	28	29	30	31	32
29	0,0395	0,1329	0,6997	0,0479		0,1105	0,1858	0,0490
32	0,9208	0,6174	0,1073	0,9912	0,0490	0,6882	0,4925	

Porcentaje de enraizamiento Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	17	18	19	20	21	22	23	24
31	0,3179	0,1444	0,1441	0,0565	0,0318	0,1444	0,0565	0,1444

i/j	25	26	27	28	29	30	31	32
31	0,0318	0,1444	0,0318	0,1444	0,2275	0,0103		0,0565

Número de raíces Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	17	18	19	20	21	22	23	24
31	0,2334	0,1765	0,0844	0,0347	0,1652	0,0975	0,0198	0,1299

i/j	25	26	27	28	29	30	31	32
31	0,0414	0,1615	0,0051	0,0507	0,2032	0,0465		0,0391

Longitud de raíces Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	17	18	19	20	21	22	23	24
20	0,0409	0,1708	0,0300		0,0319	0,0264	0,1531	0,1543
21	0,9105	0,4058	0,9778	0,0319		0,9338	0,4412	0,4385
22	0,8451	0,3613	0,9560	0,0264	0,9338		0,3942	0,3917
25	0,9600	0,5023	0,8491	0,0456	0,8709	0,8061	0,5422	0,5392
29	0,9757	0,4529	0,9126	0,0383	0,9347	0,8690	0,4906	0,4878
31	0,1465	0,0338	0,1875	0,0010	0,1787	0,2059	0,0388	0,0384

i/j	25	26	27	28	29	30	31	32
31	0,1337	0,0928	0,0093	0,0250	0,1548	0,0047		0,0184

Raíces secundarias Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	17	18	19	20	21	22	23	24
28	0,0115	0,0822	0,1172	0,1249	0,0187	0,0350	0,0264	0,1521

i/j	25	26	27	28	29	30	31	32
28	0,0151	0,1660	0,0115					
29	0,6454	0,4972	0,5686	0,0433				
30	0,0549	0,4064	0,0433	0,5686	0,1363			
31	0,8649	0,3346	0,7790	0,0225	0,7714	0,0780		
32	0,9119	0,2158	1,0000	0,0115	0,5686	0,0433	0,7790	

Anexo 11. Tratamientos evaluados para la fase de inducción de raíz de brotes de cedro.

Tratamiento	Acido naftalenacético (ANA) mgl^{-1}	Acido Indolbutírico (AIB) mgl^{-1}
1	0,5	1,0
2	0,5	1,0
3	1,0	1,5
4	1,0	1,5
5	0	0

Anexo 12. Comparación de medias para los tratamientos evaluados en la fase de inducción de raíz en brotes de cedro

Tratamiento	ANA mgl^{-1}	AIB mgl^{-1}	Porcentaje		Número de raíces	Longitud de raíz
			Enraizamiento	Sobrevivencia		
1	0,5	1,0	31,818 a	70,454 a	1,023 a	0,652 a
2	0,5	1,5	15,000 ab	75,000 a	0,564 ab	0,595 a
3	1,0	1,0	11,111 ab	65,733 a	0,228 ab	0,277 a
4	1,0	1,5	15,625 ab	68,750 a	0,375 ab	0,244 a
5	0	0	9,375 b	84,380 a	0,172 b	0,465 a

Medias seguidas por letras diferentes en la misma columna, indican diferencia estadística significativa (Duncan 0,05).

Anexo 13. Análisis de varianza para las diferentes variables evaluadas en la fase de inducción de raiz de brotes de cedro.

Factor de variación	gl	Cuadrado Medio	Valor de F	Pr > F
Porcentaje de enraizamiento				
ANA	1	0,14547259	1,53	0,2252
AIB	1	0,08548583	0,90	0,3504
ANA*AIB	1	0,33840296	3,55	0,0681
Porcentaje de sobrevivencia				
ANA	1	0,12102201	1,07	0,3083
AIB	1	0,01041226	0,09	0,7635
ANA*AIB	1	0,00005396	0,00	0,9827
Número de raíces				
ANA	1	1,09839520	5,08	0,0257
AIB	1	0,15639726	0,72	0,3965
ANA*AIB	1	0,37545371	1,74	0,1897
Longitud de raíces				
ANA	1	0,59360530	3,22	0,0749
AIB	1	0,02857735	0,15	0,6944
ANA*AIB	1	0,00956195	0,05	0,8202

Anexo 14. Promedios para las diferentes variables y factores evaluados en la etapa de inducción de raíz de brotes de cedro.

Factor y nivel		Porcentaje		Número de	Longitud de
	(mgl^{-1})	Supervivencia	Enraizamiento	raíces	Raíces (cm)
ANA	0,5	72,619 a	23,810 a	0,7892 a	0,6313 a
	1,0	67,153 a	13,235 a	0,2985 b	0,2612 a
AIB	1,0	68,330 a	22,500 a	0,6519 a	0,4924 a
	1,5	72,222 a	15,278 a	0,4789 a	0,4366 a

Valores seguidos por letras iguales en cada factor no son estadísticamente diferentes (Duncan 0,05).

Anexo 15. Prueba de medias de cuadrados minimos (LSMEANS) para la interacción entre ANA y AIB sobre las diferentes variables evaluadas en inducción de raiz de cedro.

ANA mgl^{-1}	AIB mgl^{-1}	% de enraizamiento	% de sobrevivencia	Número de raíces	Longitud de raíz	No. LSMEAN
0,5	1,0	31,8181	70,4545	0,9886	0,6636	1
0,5	1,5	15,0000	75,0000	0,5641	0,5948	2
1,0	1,0	11,1111	65,7333	0,2285	0,2771	3
1,0	1,5	15,6250	68,7500	0,3750	0,2437	4

Porcentaje de enraizamiento Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	1	2	3	4
1				
2	0,0417			
3	0,0298	0,8388		
4	0,1342	0,6578	0,5328	

Porcentaje de sobrevivencia Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	1	2	3	4
1				
2	0,8345			
3	0,4479	0,3482		
4	0,6106	0,4903	0,8282	

Número de raíces Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	1	2	3	4
1				
2	0,1071			
3	0,0105	0,3232		
4	0,0296	0,5196	0,7538	

Longitud de raíces Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

i/j	1	2	3	4
1				
2	0,6429			
3	0,1443	0,3242		
4	0,1236	0,2819	0,9113	

Anexo 16. Tratamientos evaluados en la fase de expresión de raiz.

Concentración gl^{-1}	Gelificante y número de tratamiento					
	Agar			Phytagel		
Sacarosa / Carbón activado	15	30	45	15	30	45
0,0	1	5	9	13	17	21
1,5	2	6	10	14	18	22
2,0	3	7	11	15	19	23
3,0	4	8	12	16	20	24

Anexo 17. Análisis de varianza para las diferentes variables evaluadas en la fase de expresión de raíz en brotes de cedro.

Factor de variación	gl	Cuadrado Medio	Valor de F	Pr > F
Porcentaje de supervivencia				
Carbón activado	3	0,50078288	1,97	0,1264
Azúcar	2	0,08873438	0,35	0,7064
Gelificante	1	0,03314217	0,13	0,7191
Carbón activado*azúcar	6	0,15529314	0,61	0,7205
Carbón activado*gelificante	3	0,03243360	0,13	0,9434
Ca. activ.*azúcar*gelificante	8	0,19640280	0,77	0,6275
Porcentaje de enraizamiento				
Carbón activado	3	0,07914613	0,49	0,6891
Azúcar	2	0,21219265	1,32	0,2742
Gelificante	1	0,02434935	0,15	0,6985
Carbón activado*azúcar	6	0,10792454	0,67	0,6736
Carbón activado*gelificante	3	0,15992415	0,99	0,4010
Ca. activ.*azúcar*gelificante	8	0,20658665	1,28	0,2464
Número de raíces				
Carbón activado	3	0,17998661	1,42	0,2450
Azúcar	2	0,22237096	1,75	0,1811
Gelificante	1	0,01873906	0,15	0,7020
Carbón activado*azúcar	6	0,06477908	0,51	0,7985
Carbón activado*gelificante	3	0,05141659	0,41	0,7498
Ca. activ.*azúcar*gelificante	8	0,17111570	1,35	0,2352
Longitud de raíces				
Carbón activado	3	0,12156295	0,92	0,4336
Azúcar	2	0,10075213	0,77	0,4686
Gelificante	1	0,04831327	0,37	0,5464
Carbón activado*azúcar	6	0,07635130	0,58	0,7444
Carbón activado*gelificante	3	0,04363192	0,33	0,8023
Ca. activ.*azúcar*gelificante	8	0,19227963	1,46	0,1871

Anexo 18. Tratamientos evaluados para el enraizamiento *ex vitro* de microestacas cedro.

Concentración de auxina (mgl^{-1})		Tiempo de exposición (horas) y número de tratamiento		
ANA	AIB	8	16	24
11,5	43,0	1	2	3
	86,0	4	5	6
23,0	43,0	7	8	9
	86,0	10	11	12