

Método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*

Fases de desarrollo y enraizamiento¹

Julián Pérez

julperez@catie.ac.cr

Francisco Mesén

fmesen@gmail.com

Luko Hilje

CATIE. lhilje@catie.ac.cr

María E. Aguilar

CATIE. aguilar@catie.ac.cr

En las regiones tropicales y subtropicales hay gran urgencia por encontrar alternativas nuevas que permitan multiplicar y mantener el acervo genético de especies amenazadas. *Cedrela odorata* L. está incluida en la lista de especies prioritarias de la Convención para el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna en Peligro de Extinción (CITES).

Por esta razón, su conservación, estudio de la variabilidad genética, propagación y uso sostenible cobran gran importancia.



¹ Basado en Pérez, F.J. 2001. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 81 p.

Resumen

El objetivo de la investigación fue determinar las condiciones óptimas para el desarrollo y enraizamiento de brotes de *Cedrela odorata* L. *in vitro*. Para obtener un medio de desarrollo se evaluaron los medios Murashige y Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) (100, 75, 50 y 25%) combinados con sacarosa (10, 20, 30, 40 g/l). Para el enraizamiento *in vitro* se utilizó el medio MS al 50%, suplementado en la fase de inducción con α -ácido naftalenacético (ANA) (0,5 y 1,0 mg/l) combinado con ácido indol-3-butírico (AIB) (1,0 y 1,5 mg/l), además de un testigo absoluto (sin auxinas). En la fase de expresión se evaluó el efecto de carbón activado (0, 1,5, 2,0 y 3 g/l) combinado con sacarosa (15, 30, 45 g/l) y Agar o Phytigel como gelificante. El mejor medio para desarrollo de brotes fue WPM al 50% suplementado con sacarosa a 30 g/l. Además, esta combinación favoreció notoriamente el enraizamiento espontáneo de los explantes. Para la inducción de raíz se observó el efecto de ANA; para expresión, el carbón activado afectó negativamente el enraizamiento, en tanto que las altas concentraciones de sacarosa lo favorecieron; no hubo diferencia estadística entre gelificantes.

Palabras claves: *Cedrela odorata*; micropropagación; enraizamiento; cultivo *in vitro*; sustrato de cultivo.

Summary

Micropropagation method to select genotypes of *Cedrela odorata* L. Development and rooting phases. This research was carried out in order to get the optimum conditions for *in vitro* development and rooting of *C. odorata* L. shoots. Murashige and Skoog (MS) or Woody Plant Medium (WPM) media at 100, 75, 50 or 25% strength were combined each with sucrose at 10, 20, 30 or 40 mg/l, to obtain a development medium. α -naphthaleneacetic acid (NAA) (0,5, 1,0 mg/l) was combined with indole-3-butyric acid (IBA) (1,0, 1,5 mg/l), plus an absolute control without auxin in the induction phase. Active charcoal (0, 1,5, 2,0, 3,0 g/l), sucrose (15, 30,45 g/l) and gelling agent (Agar, Phytigel) were joined in the expression phase of rooting in a half strength MS medium. A half strength WPM plus sucrose 30 g/l was the best combination because it promoted the development; besides it caused a general spontaneous rooting. The NAA meaning effect was present in the induction phase and the activated charcoal affected negatively the rooting, the highest sucrose concentration favored it, and there were not statistical differences between the gelling agents in the root expression phase.

Keywords: *Cedrela odorata*; micropropagation; rooting; *in vitro* culture; culture substrate.

En las regiones tropicales y subtropicales hay gran urgencia por encontrar alternativas nuevas que permitan multiplicar y mantener el acervo genético de especies amenazadas (Valverde *et al.* 1998). *Cedrela odorata* L. está incluida en la lista de especies prioritarias de la Convención para el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna en Peligro de Extinción (CITES). Por esta razón, su conservación, estudio de la variabilidad genética, propagación y uso

sostenible cobran gran importancia (Patiño 1997). 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 la especie.

En general, los taxa leñosos son difíciles de regenerar bajo condiciones *in vitro* (Rout y Das 1993). La mayoría de brotes adventicios no crecen adecuadamente en presen-

cia de benziladenina (BA) u otra citosina, de las utilizadas en la multiplicación *in vitro*. Por tanto, una vez que los brotes tienen un tamaño suficiente para separarse y subcultivarse, deben ser transferidos a un medio carente de este regulador para que se desarrollen (Biondi *et al.* 1984).

La fase de desarrollo de los brotes obtenidos en multiplicación es de suma importancia, ya que en este periodo debe alcanzar el tamaño adecuado y desarrollar raíces, para que cuando pase a aclimata-

ción se garantice una alta supervivencia. Sin embargo, muchas especies leñosas son renuentes a formar raíces adventicias, ya sea *in vitro* o *in vivo* (Arrillaga *et al.* 1991); esto constituye un problema serio que limita la micropropagación exitosa con propósitos comerciales. El objetivo del presente estudio fue contribuir con el desarrollo de un método para la micropropagación de cedro (*C. odorata* L.) mediante la determinación de las condiciones óptimas para el desarrollo y el enraizamiento *in vitro* de brotes micropropagados.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica, entre enero y noviembre del 2001.

Fase de desarrollo.- Con explantes epicotiledonares de 2-3 cm obtenidos de plántulas de 45-60 días de edad y provenientes de semilla germinada *in vitro*, se evaluaron los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962) y Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown 1980) al 100, 75, 50 y 25%. Los medios de cultivo se suplementaron con sacarosa (10, 20, 30 y 40 g/l) para establecer un diseño experimental completamente al azar, en arreglo factorial 2×4^2 , con cuatro repeticiones para MS, tres repeticiones para WPM y un frasco 'Gerber' con tres brotes, como unidad experimental.

Fase de enraizamiento.- En tubos de ensayo de 25 x 150 mm se colocaron brotes individuales obtenidos de explantes de nudo cotiledonar que medían 1-2 cm. Cada tubo de ensayo contenía 15 ml de medio de cultivo MS al 50% con pH de 5,7 suplementado con los reguladores y reactivos correspondientes para cada etapa.

a) Inducción: se evaluó el efecto de

auxinas (α -ácido naftalenacético (ANA): 0,5 y 1,0 mg/l y ácido indol-3-butírico (AIB): 1,0 y 1,5 mg/l) y de un medio sin reguladores en oscuridad mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo de tratamientos $T_A + 2^2$, diez repeticiones y cuatro microestacas como unidad experimental.

b) Expresión: se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de carbón activado (0, 1,5, 2,0 y 3,0 g/l), de sacarosa (15, 30 y 45 g/l) y del gelificante (Agar 7 g/l y Phytigel 2 g/l) bajo un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial $4 \times 3 \times 2$, cuatro repeticiones y dos microestacas como unidad experimental.

c) Desarrollo: los brotes se subcultivaron en un medio suplementado con sacarosa (15 g/l), el cual contenía carbón activado (1,5 g/l) y agar (7 g/l).

Análisis estadístico.- A cada una de las variables: altura de brote (cm), porcentaje de enraizamiento, número promedio de raíces por explante y longitud de raíz (cm), se le realizó un análisis de varianza y prueba de Duncan ($\alpha=0,05$) mediante el procedimiento General Linear Model (GLM) (SAS 1999), previa transformación de los datos por las fórmulas

$$\arcsin\sqrt{(y)} \text{ o } \sqrt{(y+0,5)}.$$

Resultados

Fase de desarrollo

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

Altura del brote. El medio WPM mostró efecto de la interacción; el 25% formó la mejor combinación

con sacarosa a 10 g/l, aunque no fue estadísticamente diferente de otras combinaciones (Cuadro 1).

Porcentaje de enraizamiento. La mejor interacción para favorecer el enraizamiento se obtuvo de la combinación de medio al 25% más sacarosa a 20 g/l; sin embargo, la misma concentración de medio más sacarosa a 30 g/l produjo el más bajo porcentaje de enraizamiento (Cuadro 1).

Número promedio de raíces por explante. El valor más alto de número de raíces se obtuvo en el medio al 50% con 30 g/l de sacarosa, pero el número de raíces se redujo conforme se disminuyó la concentración del medio (Cuadro 1).

Longitud de raíz. La interacción entre el medio al 100% y la sacarosa a 40 g/l fue la mejor para promover una mayor longitud de raíz. Con 30 g/l de sacarosa, la longitud de raíz aumentó a medida que disminuyó la concentración del medio hasta alcanzar el máximo al combinarse con el medio al 50%; ninguna de las otras combinaciones tuvo el valor máximo observado para esta variable, pero sí el mínimo al combinarse con el medio al 25% (Cuadro 1).

Fase de enraizamiento

a) Inducción de raíces

Para la inducción de raíz inicialmente se estableció un experimento en diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×2 . 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.

Porcentaje de enraizamiento. La comparación de medias señaló al tratamiento 1 como estadísticamente superior al testigo. Según el análisis de varianza, la interacción de las auxinas no fue significativa; no obstante, la combinación de ANA

0,5 mg/l + AIB 1 mg/l tuvo un mayor efecto sobre el porcentaje de enraizamiento (Cuadro 2).

Número promedio de raíces por explante. La concentración de 0,5 mg/l de ANA (datos no tabulados) fue estadísticamente superior. La interacción también fue significativa; ANA 0,5 mg/l + AIB 1 mg/l fue la mejor combinación.

Longitud de raíces. El tratamiento 1 tuvo mayor efecto, en comparación con el resto de los tratamientos y el testigo. Los tratamientos 3 y 4 mostraron efectos similares, pero menores que el testigo. La interacción tampoco tuvo efecto en la longitud de raíces (cm), pero se observó una tendencia a disminuir con las combinaciones de las concentraciones más altas (Cuadro 2).

b) Expresión de raíces.

No se observó efecto de la interacción entre los factores. En los efectos individuales, en la concentración de 3 g/l de carbón activado se observaron los valores más bajos en todas las variables. Los valores más altos para el porcentaje de enraizamiento y para el número de raíces se obtuvieron en los tratamientos sin carbón activado, mientras que para la longitud de raíz el valor más alto se obtuvo con este mismo reactivo a una concentración de 2 g/l. La concentración más alta de sacarosa produjo los valores más altos en el porcentaje de enraizamiento, número promedio de raíces por explante y longitud de raíz, mientras que entre los dos tipos de gelificante prácticamente no hubo diferencia numérica ni estadística (Cuadro 3).

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, este permitió la aclimatación posterior de las plántulas (Foto 1).

Cuadro 1.

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

Medio de cultivo (%)	Azúcar (g/l)	Altura de brote (cm)	Porcentaje de enraizamiento	No. de raíces por explante	Longitud de raíz (cm)
100	10	2,13 abc	55,63 ab	1,54 ab	4,83 ab
100	20	1,94 abc	66,63 ab	1,65 ab	6,50 ab
100	30	1,79 c	66,67 ab	2,33 ab	4,83 ab
100	40	2,21 abc	77,77 ab	2,67 ab	11,83 a
75	10	2,36 abc	88,87 ab	1,55 ab	3,67 ab
75	20	1,89 bc	66,63 ab	2,22 ab	3,50 ab
75	30	2,11 abc	77,77 ab	2,99 ab	6,00 ab
75	40	2,26 abc	66,63 ab	1,89 ab	6,67 ab
50	10	2,00 abc	88,87 ab	2,44 ab	4,00 ab
50	20	2,15 abc	66,63 ab	1,66 ab	6,00 ab
50	30	2,46 ab	88,87 ab	3,89 a	8,27 a
50	40	2,02 abc	66,63 ab	2,55 ab	7,17 ab
25	10	2,59 a	55,53 ab	1,44 ab	4,33 ab
25	20	2,14 abc	100,00 a	2,44 ab	9,30 a
25	30	2,22 abc	22,20 b	0,22 b	0,83 b
25	40	2,02 abc	77,67 ab	2,67 ab	7,17 a

Valores con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (Duncan 0,05).

Cuadro 2.

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

Tratamiento	Factor y nivel (mg/l)		Porcentaje de enraizamiento	Número de raíces	Longitud de raíz (cm)
	ANA	AIB			
1	0,5	1,0	31,818 a	1,023 a	0,652 a
2	0,5	1,5	15,000 ab	0,564 ab	0,595 a
3	1,0	1,0	11,111 ab	0,228 ab	0,277 a
4	1,0	1,5	15,625 ab	0,375 ab	0,244 a
5	0	0	9,375 b	0,172 b	0,465 a

Valores con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (Duncan 0,05).

Discusión

Los nutrientes del medio de cultivo y la cantidad de sacarosa utilizados influyeron en el desarrollo de los brotes. Las bajas concentraciones del medio WPM (25 o 50%), al

igual que las concentraciones de 10 o 30 g/l de sacarosa, fueron las que más favorecieron la altura del brote. Resultados similares se obtuvieron con *Croton sublyratus* (Shibata *et al.* 1996). Lo anterior puede atribuirse

a que las especies leñosas requieren una formulación de nutrimentos baja en concentraciones de sales (Margara 1988) y a que las bajas concentraciones de sacarosa pueden inducir un metabolismo autotrófico y favorecer una morfología normal de brotes (García-Martín *et al.* 2001).

El enraizamiento espontáneo observado en la fase de desarrollo se favoreció más acentuadamente en el medio WPM, al 50% más sacarosa a 30 o 40 g/l, en comparación con el medio MS a cualquier combinación. Este resultado podría atribuirse a que la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de tejidos de especies leñosas prefieren concentraciones bajas de sales y a que la sacarosa es fuente de energía para que las plantas desarrollen tejidos y órganos, como por ejemplo las raíces (Veirskov 1988).

La ausencia de efecto estadístico no impide señalar a la combinación de medio WPM al 50% más sacarosa a 30 g/l como la mejor para la fase de desarrollo, a partir de la tendencia general observada para las cuatro variables evaluadas, lo cual coincide con lo observado en *Eucalyptus tereticornis* (Subbaiah y Minocham 1990) y en *Acacia nilotica* (Dewan *et al.* 1992).

La poca respuesta de los explantes en la fase de inducción de raíz 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, tal como se observó también en micropropagación de *Ulmus pumila* (Corchete *et al.* 1993). Otra causa podría ser la condición de oscuridad en la cual se realizó el experimento, la cual provocó clorosis y defoliación en los explantes (von Arnold y Eerikson 1984), o también debido a toxicidad, dado que los brotes jóvenes se caracterizan por un alto contenido interno de auxinas que bien

Cuadro 3.

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

Factor y concentración (g/l)	Porcentaje de enraizamiento	Número promedio de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)
Carbón activado			
0,0	16,66 a	0,72 a	0,46 a
1,5	10,41 a	0,27 a	0,30 a
2,0	14,58 a	0,35 a	0,57 a
3,0	9,52 a	0,16 a	0,14 a
Sacarosa			
15	9,37 a	0,22 a	0,24 a
30	9,67 a	0,31 a	0,46 a
45	20,00 a	0,65 a	0,45 a
Gelificante			
Agar 7,0	13,54 a	0,40 a	0,43 a
Phytigel 2,0	12,22 a	0,37 a	0,33 a

Valores diferentes para cada variable y factor indican diferencia estadística significativa (Duncan 0,05).



Foto 1. Micropropagación de explantes nodales de cedro: Producción de raíces en fase de enraizamiento (sup. izq.). Enraizamiento espontáneo en fase de desarrollo (sup. der.). Plantas aclimatadas (inferior).

Fotos: Julián Pérez.

puede ser suficiente para inducir el enraizamiento, tal como ocurrió en la fase de desarrollo y que coincide con resultados similares obtenidos con *Azadirachta indica* (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 lo mejoró y más bien tuvo un efecto perjudicial conforme se incrementó su concentración. Este hecho puede atribuirse a que, además de absorber exudados indeseables, también elimina algunos químicos esenciales del medio, como el hierro en forma compleja y el zinc (Nissen y Sutter 1990).

La expresión de raíz se favoreció con las altas concentraciones de sacarosa, aspecto igualmente señalado en el enraizamiento de brotes de *Acacia albida* (Duhox y Davies 1985). El porcentaje de enraizamiento y el número promedio de raíces por explante aumentaron con la concentración de sacarosa; el mayor efecto se observó con 45 g/l, 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 (Veierskov 1988), las raíces en este caso.

El efecto mínimo de los gelificantes se puede atribuir a que tanto el tipo de gelificante como su concentración pudieron haber afectado la disponibilidad de nutrientes (Podwyszynska y Olszewski 1995).

Conclusiones

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: 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 incrementar 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.

A pesar de que las fases de desarrollo y enraizamiento *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, las plantas obtenidas garantizan el éxito de la metodología y la disponibilidad de material vegetal para evaluar su comportamiento en el campo, con el fin de determinar su tolerancia al barrenador de las meliáceas (*H. grandella*), lo que sin duda apoyaría los esfuerzos que se están realizando para la conservación y el mejoramiento genético de la especie. 🌱

Literatura citada

- Arnold, S. von; 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.
- Arrillaga, I; Marzo, T; Segura, J. 1991. Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27:341-348.
- 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.
- Corchete, MP; Diez, JJ; Valle, T. 1993. Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees. *Plant Cell Reports* 12:534-536.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lloyd, G; McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Madrid, Mundi Prensa. 232 p.
- 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.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:53-58.
- Nissen, SJ; Sutter, EG. 1990. Stability of AIA and AIB in nutrient medium to several tissue culture procedures. *HortScience* 25(7):800-802.
- Patiño, VF. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotrópicos: Propuestas para acciones coordinadas. Roma, Italia, FAO. Dirección de Recursos Forestales. Departamento de Montes. 58 p.
- 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.
- Rout, GR; Das, P. 1993. Micropropagation of *Madhuca longifolia* (Koenig) MacBride var. *latifolia* Roxb. *Plant Cell Reports* 12:513-516.
- SAS. 1999. The SAS System for Windows Version 8. NC. USA, Institute Inc. Cary.
- 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.
- Subbaiah, MM; Minocham SC. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. *Plant Cell Reports* 9:370-373.
- Valverde, CL; Dufour, M; Villalobos, VM. 1998. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). *Revista de Biología Tropical* 46(2):225-228.
- Veierskov, B. 1988. Relation between carbohydrates and adventitious root formation. In Davis, TD; Haissig, BE; Sankhla, N. *Adventitious root formation in cuttings*. Portland, Oregon, Dioscorides Press. *Advances in Plant Sciences Series Vol. 2*. p. 70-78.