

Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L.

Optimización de la fase de multiplicación

La mayoría de los árboles forestales no han sido objeto de programas de domesticación, por lo cual son organismos prácticamente silvestres, que exhiben una gran variabilidad genética. Además, sus características propias, por ejemplo, sus largos periodos de vida y gran tamaño, hace más difícil el mejoramiento genético, en comparación con los cultivos agrícolas. Es aquí donde la micropropagación juega un papel importante, al permitir la propagación masiva y rápida de árboles élite.

Julián Pérez
Francisco Mesén
Luko Hilje
María E. Aguilar

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue contribuir con el desarrollo de una metodología de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela 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. 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 todas las citocininas produjeron callo en la base de los explantes.

Palabras clave: *Cedrela odorata*; micropropagación; genotipos; brotación; tallo

SUMMARY

Development of a method for the micropropagation of selected genotypes of *Cedrela odorata* L. I. Optimization of the multiplication phase. The objective of this is research was to contribute with the development of a methodology for the micropropagation of selected genotypes of cedar (*C. odorata*). Cedar seeds were sown *in vitro* and the seedlings were used as source of explants. Nodal cotyledonar explants were established on half strength MS medium supplemented with 2-iP (2,2 μM) for axillary shoot initiation. To evaluate the effects of cytokinins on shoot multiplications, the shoots obtained were sub-cultured in the same medium added with BAP, Kinetin or 2-iP at 2,2, 6,5, 13,3 or 20 μM . Explants survived at all these treatments. BAP at 2,2 or 6,5 μM produced the highest number of shoots. These treatments were also statistically higher in terms of days to shooting, shooting percentage and shoot height. High concentrations of all cytokinins induced the formation of callus in the base of the explants.

Key words: *Cedrela odorata*; micropropagation; genotype; shooting; stem.

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 de repoblación. 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).

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 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 *Cedrela odorata* de las cuales se han identificado algunas por su buen desarrollo y por presentar diferentes grados de tolerancia a *Hypsiphylla 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. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue contribuir con el desarrollo de un método de micropropagación de cedro (*C. odorata* L.), mediante la optimización de la fase de multiplicación.

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, de enero a noviembre del 2001.

Fuente de explantes. Para obtener plántulas como fuente primaria de explantes (microestacas) se utilizó semilla de *C. odorata* correspondiente a los mejores genotipos del ensayo de procedencias del proyecto "Mejoramiento genético de meliáceas", así como semilla procedente de Pococí, Costa Rica, suministrada por el Banco de Semilla Forestal del CATIE.

Se utilizaron las recomendaciones de Valverde *et al.* (1998) para la desinfección de *C. odorata*, y las de Orellana (1997) para la germinación *in vitro*.

Fase de iniciación. Se tomaron explantes de nudo cotiledonar de 3 cm de longitud de plántulas de 45 a 60 días de edad y se colocaron verticalmente en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 3% de sacarosa y 2,46 μM de 2-iP (6- γ , γ -dimethylamino purina) pa-

ra promover la brotación de las yemas cotiledonares. 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°C por 20 minutos.

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 (Bencilaminopurina), kinetina y 2-iP (2,2, 6,5, 13,3, 20 μM), bajo un diseño completamente al azar con arreglo simple de tratamientos, nueve repeticiones y un frasco "Gerber" con tres microestacas como unidad experimental.

Análisis estadístico. A cada una de las variables, tiempo a brotación en días (TB), porcentaje de supervivencia y de brotación (PS, PB), número promedio de brotes por explante (NB) y altura de brotes en cm (AB), se le realizó un análisis de varianza y prueba de Duncan ($\alpha=0,05$), utilizando el procedimiento GLM (SAS 1999), previa transformación de los datos mediante las fórmulas $\arcsin \sqrt{p}$ o $\sqrt{p+0,5}$.

Resultados

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 colecciones 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. En la germinación *in vitro* de semilla de las procedencias Mex 1-29, Mex 1-46, Mex 1-74, el porcentaje de contaminación varió entre 20-46%. Además, en la procedencia Mex 1-46 se observó un 5% de plántulas albinas (Figura 1) lo cual, aunado a las contaminadas (43%),

disminuyó considerablemente la disponibilidad de material para cultivar posteriormente *in vitro*.

Fase de multiplicación. El comportamiento de los explantes a las diferentes citocininas y concentraciones se evaluó en tres ensayos previos (datos no reportados), los cuales permitieron observar diferencias significativas en PB, NB y en AB. Las mejores concentraciones para favorecer éstas variables 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. Esto afectó en general la multiplicación de los explantes, debido a que antecedió a la formación de raíces, indeseables en esta fase (Figura 2).

Al igual que en los ensayos previos, hubo diferencias significativas entre los tratamientos para todas las variables evaluadas (Cuadro 1), pero no entre las concentraciones de BAP cuando esta citocinina se evaluó de manera independiente (Cuadro 2).

Días a brotación. El promedio de DB 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.

Porcentaje de supervivencia. El promedio de supervivencia 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%. Al evaluar solo los tratamientos con BAP, la mejor concentración fue 2,2 μM .

Porcentaje de brotación. El mayor porcentaje de brotación (60,8%), 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 concentra-

ciones de estas citocininas y de 2-iP. El PB más bajo (5,5%) se obtuvo con 2,2 μ M de 2-iP (Figura 3 a). Al repetir el experimento sólo con las concentraciones de la BAP, los mejores tratamientos fueron 2,2 μ M y 13,3 μ M con un 100 y 93% de brotación, respectivamente.

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 μ M de BAP con 2,2 μ M de kinetina y 6,5 y 13,3 μ M de 2-iP, pero sí entre 2,2 μ M de BAP (NB = 1,0) con los demás tratamientos (Figura 3 b).



Figura 1. Plántulas albinas que disminuyeron la disponibilidad de material vegetal como fuente de explantes.

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

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

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

Cuadro 2. Efecto de la benzilaminopurina (BAP) en la brotación de explantes nodales de cedro.

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

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



Figura 2. Producción de callo y raíz, observado en altas concentraciones de citocinina.

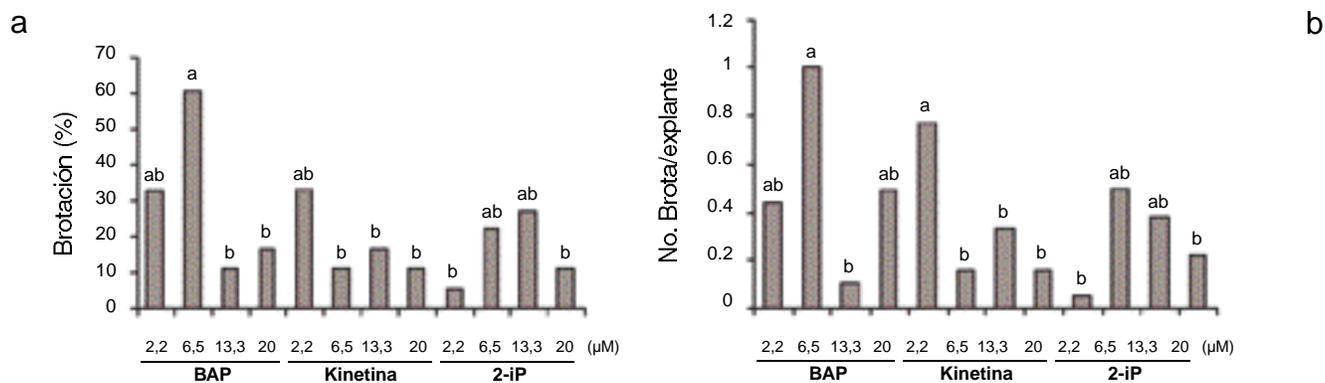


Figura 3. Efecto de diferentes citocininas sobre el porcentaje de brotación (a) y el número promedio de brotes (b) en explantes nodales de cedro.

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.

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. Al repetir el experimento sólo con los tratamientos de BAP, nuevamente se observó una mayor altura del brote con 2,2 y 6,5 µM.

Discusión

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, tal y como observaron Berrios *et al.* (1991) en la micropropagación de diferentes especies de poró (*Erythrina* spp.). 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 ger-

minación, pero que representan un factor limitante para los trabajos *in vitro* (Castro, 2001).

La supervivencia más baja (33%) se registró 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, número de brotes y altura del brote 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).

Las bajas concentraciones de la BAP fueron más eficaces para promover la brotación de los explantes nodales de cedro y pueden señalarse como potencialmente útiles para la micropropagación de *C. odorata*, al igual que se han señalado para *Eucalyptus globulus* (Bennett *et al.* 1994), *Alnus acuminata* (Badilla *et al.* 1992) y *Croton sublyratus* (Shibata *et al.* 1996) entre otras especies. No obstante, los brotes obtenidos fueron muy pequeños y dificultaron su separación posterior para pasar a desarrollo (Trujillo *et al.* 1994, Orellana 1997). Por otro lado, la presencia de callo en la base de los explantes, más frecuen-

temente observada a altas concentraciones de citocinina, corresponde con lo observado por Puddephat *et al.* (1997) en *Quercus robur* 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 morfogénico y con ello mayor facilidad para emitir estructuras como brotes nuevos y raíces, o en su defecto callo (Bonga 1982).

Aunque el genotipo influye en la respuesta de los cultivos *in vitro* (Bonga y Von Aderkas 1992) 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 *Cedrela tonduzii*, 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 (2000) al mencionar que especies diferentes de un mismo género pueden responder igual a una misma citocinina.

Conclusiones

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*. Sin embargo, el 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), para favorecer el alargamiento de los brotes obtenidos. 

La presente investigación fue realizada gracias al apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México). El primer autor también agradece todo el apoyo recibido, por parte del personal del laboratorio de biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

Julián Pérez
 Máster en Agricultura Ecológica
 Tel.(506)556 5016, Fax 556 0914
 Correo electrónico: pere0873@uidaho.edu
 julperez@catie.ac.cr

Francisco Mesén
 Correo electrónico: fmesen@catie.ac.cr

Luko Hilje
 Correo electrónico: lhilje@catie.ac.cr

María E. Aguilar
 Correo electrónico: aguilmarm@catie.ac.cr

Literatura citada

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 (2, 1999, Santo Domingo, República Dominicana). Memorias. Coordinador Rodolfo Salazar. Turrialba, Costa Rica. p. 145-150.

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

Bennett, IJ; McComb, JA; Tonkin, CM; McDavid, DAJ. 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus 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.

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*. Dordrecht, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. p. 387-412.

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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.

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

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.

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 Biología Tropical* 46(2):225-228.